

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Es gibt kaum ein pathologisches Ereignis im Zentralen Nervensystem (ZNS) an dem gliale Zellen unbeteiligt sind. Die neurowissenschaftliche Forschung hat sich deshalb in jüngerer Zeit vermehrt mit diesen Zellen beschäftigt.

Makrophagen und Mikrogliazellen spielen bei Schadensprozessen im ZNS eine zentrale Rolle. Diese Zellen mesodermaler Herkunft werden nach Läsion unmittelbar aktiviert, migrieren zum Ort des Schadens und sind hier für den sekundären Zellschaden von herausragender Bedeutung. Das Verständnis der genauen molekularen Mechanismen hierfür ist bisher nur lückenhaft vorhanden.

Der Makrophagen/Mikroglia Aktivierungsfaktor (Macrophage Activation Factor, MAF) wurde erstmals als Monozyten/Makrophagen Differenzierungsassoziierter Faktor unbekannter Funktion beschrieben (Rehli et al., 1995). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde eine differentielle Gen-Expressionsanalyse von mRNA lädierter versus unlädierter Hippocampi nach entorhinaler Kortexläsion (entorhinal cortex lesion, ECL) durchgeführt (Brauer et al., 2003). MAF zeigte eine konsistente Hochregulation nach Läsion (Brauer et al., 2004).

Ziel dieser Dissertation war die Charakterisierung der Regulation und des Expressionsmusters von MAF nach ZNS-Läsion. In einer Northern-Blot-Analyse wurde die differenzierungsassozierte Expression von MAF in Makrophagen und die CD11b- Abhängigkeit derselben überprüft. Da die eigentlichen Geschehnisse *in vivo* auf Proteinebene ablaufen, habe ich polyklonale MAF-spezifische Antikörper generiert, deren Spezifität in verschiedenen Modellen überprüft und das Expressionsmuster des MAF-Proteins im läsionierten Gehirn mit Hilfe unterschiedlicher immunohistochemischer Methoden untersucht. In einer Genbankanalyse wurde MAF auf sequentielle und strukturelle Homologien geprüft. Schließlich wurde in zusätzlichen Experimenten das hämolytische Potential von MAF überprüft.

Da Mikrogliazellen und Makrophagen aktiv zum Ort des Geschehens migrieren und als erste Zellen die immunologische Abwehrkaskade in Gang setzen, galt

der MAF-Expression nach Läsion besonderes Augenmerk. In Zukunft könnte die Manipulation von MAF unter Umständen ein Schlüssel zur Entwicklung erfolgreicher Behandlung verschiedenster pathologischer ZNS Prozesse sein.

1.2 Historischer Hintergrund

Glia sind die nicht-neuronalen Zellen des ZNS. Erstbeschrieben wurde diese Zellgruppe 1846 von dem Berliner Pathologen Rudolf Virchow, der auch den Begriff Gliazelle (von griechisch *γλῖα*: Leim) prägte (Virchow, 1846). Im Jahre 1899 wurde die Mikrogliazelle dann von Nissl als „Stäbchenzelle“ beschrieben und der reaktiven Neuroglia zugeordnet. Nissl vertrat außerdem die Ansicht, dass sie das Potential hat aktiv zu migrieren und zu phagozytieren (Nissl, 1899). Eine sich morphologisch von Neuronen und Astrozyten unterscheidende Zellpopulation im adulten nativen Zentralnervensystem (ZNS) wurde dann erstmals 1913 von dem spanischen Neuroanatomen Ramon y Cajal unter der Bezeichnung *el tercer elemento*, „das dritte Element“, zusammengefasst (y Cajal, 1913; y Cajal, 1913). Pio del Rio Hortega differenzierte diese Zellen schließlich aufgrund von Morphologie, Funktion und Herkunft in zwei unterschiedliche Zellpopulationen, die er Oligodendroglia und Mikroglia nannte (del Rio Hortega, 1919). Er fasste seine Vorstellungen von Mikroglia 1932 zu einem in den Grundzügen bis heute gültigen Konzept zusammen: Danach sind Mikrogliazellen durch „einen kleinen Kern, wenig Zytoplasma und mehrere dünne, verzweigte, nicht-anastomosierende Fortsätze“ charakterisiert. Sie „repräsentieren das retikulo-endotheliale System im Gehirn“ und transformieren „unter inflammatorischen und nekrotisierenden Bedingungen zu phagozytierenden Fettkörnchen- und Stäbchenzellen“ (del Rio Hortega, 1932). Diese Erkenntnisse basierten auf Beobachtungen an mit Ammoniak-Silberkarbonat gefärbten Hirngewebe diverser Tierspezies zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. Hortega war der Meinung, dass Mikrogliazellen von „embryonic corpuscles“ abstammen, die während der Entwicklung des ZNS von der Pia mater in das Hirn migrieren. Nach Hortega haben Mikroglia ihren Ursprung in mononukleären Zellen des zirkulierenden Blutes, sind somit also mesodermaler Herkunft - im Gegensatz zu

Oligodendrozyten, von denen er glaubte, dass sie neuroektodermaler Abstammung seien. Basierend auf Beobachtungen in tierexperimentellen Läsionsmodellen an erwachsenen Tieren verschiedener Spezies beschrieb er als Erster, dass Mikrogliazellen die Fähigkeit besitzen eine morphologische Transformation zu vollziehen: Eine ramifizierte "ruhende" Mikrogliazelle, wie man sie im adulten, gesunden Gehirn findet, wird dabei zu einem amoeboiden Makrophagen, der aktiv zum Ort der Läsion migriert und seiner Ansicht nach sehr stark den Zellen gleicht, die während der Embryonal- und frühen Postnatalphase im ZNS detektiert werden können (del Rio Hortega, 1932).

1.3 Makrophagen und Mikroglia im ZNS

Makrophagen und Mikrogliazellen sind hämatopoetischen Ursprungs und entstammen damit im Gegensatz zu Neuronen und anderen Gliazellen dem Mesoderm und nicht dem Neuroektoderm (Jordan und Thomas, 1988). Im gesunden Zentralen Nervensystem (ZNS) gibt es verschiedene nicht-neuronale Zellpopulationen, die der myeloiden Reihe, also dem Monozyten-Makrophagen-System, angehören, wie man aus der Expression bestimmter Markerproteine wie CD11b/CD18 (auch bekannt als Mac-1 Rezeptor), IgG Rezeptoren (CD16/CD32), ionisierendem Calcium-bindenden Adaptorprotein 1 (Iba1) und anderen ableiten kann (Raivich und Banati, 2004). Insgesamt beträgt der Anteil dieser Zellpopulation im ZNS etwa 12% (Benveniste, 1997). Zellen der myeloiden Reihe sind damit etwa genauso häufig wie Neurone (van Rossum und Hanisch, 2004).

Unterschieden werden die einzelnen Typen nach ihrer Lokalisation und Morphologie: (i) Die residente Mikrogliazelle macht den größten Anteil dieser Zellpopulationen aus. Sie ist *innerhalb* des neuronalen Parenchyms lokalisiert. In ihrem normalen ruhenden Zustand sind Mikroglia hochgradig ramifizierte Zellen mit Fortsätzen, die 30-50µm Diameter abdecken können.

(ii) Der perivaskuläre Makrophage befindet sich in den Virchow-Robinschen Räumen (= perivaskuläre Räume) zwischen dem Endothel der Blutgefäße und der *Membrana glia limitans perivascularis*, welche das Blutgefäß vom

neuronalen Parenchym trennt, und damit *außerhalb* des Hirnparenchyms. Typischerweise schlanke, langgestreckte Zellen mit breiten, kurzen Fortsätzen, zeigen perivaskuläre Makrophagen nicht die elaborierte ramifizierte Struktur residenter Mikroglia. Das könnte an dem begrenzten Platz liegen, es kann aber auch durch die unterschiedliche Mikroumgebung bedingt sein. Perivaskuläre Makrophagen unterscheiden sich auch in manchen molekularen Markern, wie dem Haupt-Gewebehistokompatibilitäts-Komplex Klasse II (MHCII), Cyclooxygenase oder Scavenger Rezeptoren, die nicht von ruhenden Mikroglia exprimiert werden (Linehan et al., 1999).

(iii) Eine dritte Gruppe, die meningealen Makrophagen, besteht aus großen abgerundeten Zellen, die sich zwischen den meningealen Epithelzellen und der Basalmembran befinden, die die *Glia limitans* umgibt, also der Astroglia, die das neuronale Parenchym umrahmt. Damit befinden sie sich auch *außerhalb* des neuronalen Parenchyms. Immunohistochemisch sind meningeale Makrophagen dementsprechend mehr den perivaskulären Makrophagen nahe und weniger den hochramifizierten Mikroglia im neuronalen Parenchym (Raivich und Banati, 2004).

Trotz dieser klaren anatomischen Unterscheidung zwischen Mikroglia und Makrophagen, gibt es Austausch und Plastizität zwischen den Gruppen. Perivaskuläre Makrophagen werden nach und nach von dem Pool an zirkulierenden Monozyten ersetzt, wobei etwa die Hälfte nach 1-2 Monaten ersetzt ist. Eine kleine Population von Makrophagen migriert durch die Basalmembran in das neuronale Parenchym und differenziert sich dort zu ramifizierten Mikrogliazellen (Priller et al., 2001; Streit et al., 1989), ein Prozess der bei entzündlichen Veränderungen und anderen Schäden im ZNS verstärkt wird (Flugel et al., 2001; Flugel et al., 2001).

Residente Mikroglia entstammen zwei Einwanderungswellen von Makrophagen in das neuronale Parenchym, einer sehr frühen vom umgebenden mesodermalen Gewebe (Alliot et al., 1999; Cossmann et al., 1997; Kurz und Christ, 1998; Navascues et al., 1995) und dann der zweiten Welle als Mikrogliafontänen ("fountains of microglia") im ZNS während der axonalen Entwicklung im späten Fetus und im Neugeborenen (Brockhaus et al., 1996;

Leong und Ling, 1992). In beiden Fällen ist die Einwanderung von einer unmittelbaren Differenzierung und Beruhigung gefolgt, so dass die Zellen sich in ruhende, ramifizierte Mikrogliazellen umwandeln. Andererseits kann dieselbe residente Mikrogliazelle durch verschiedenste Schadensprozesse im ZNS rapide aktiviert werden, die Fortsätze verlieren und sich in amoeboiden Makrophagen umwandeln (Streit et al., 1988).

Der Übergang zwischen den einzelnen Gruppen ist insofern jederzeit möglich, weshalb die Grenzen zwischen ihnen fließend bleiben. Es gibt bisher keine Zellmarker, um sie eindeutig zu unterscheiden. In dieser Arbeit habe ich nicht zwischen Makrophagen und Mikrogliazellen im ZNS differenziert, weshalb ich mich in dieser Dissertation für den Gebrauch des Terms "Makrophage/Mikroglia" entschieden habe.

1.4 Rolle von Makrophagen/Mikroglia bei Schadensprozessen im ZNS

Mikrogliazellen spielen als residente immunkompetente und phagozytierende Zellen eine zentrale Rolle bei Schadensprozessen im ZNS (Kreutzberg, 1996; Perry und Gordon, 1988). Mithilfe der Zweiphotonen-Mikroskopie konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mikrogliazellen auch in ihrem so genannten ruhenden Zustand höchst aktiv sind. Sie überwachen fortwährend ihre Mikroumgebung mit extrem motilen Fortsätzen und Ausstülpungen (Nimmerjahn et al., 2005). Mikrogliazellen werden durch sämtliche Arten der Gehirnläsion aktiviert (Miller et al., 1995). Diese Aktivierung ist mit einer Transformation der ramifizierten Mikrogliazelle zu einer phagozytierenden Zelle verbunden, die fähig ist, zytotoxische Substanzen, wie Sauerstoffradikale, Proteasen und proinflammatorische Zytokine zu sezernieren (Banati et al., 1993; Colton und Gilbert, 1987).

Generell zielt die Immunantwort darauf ab, die Integrität des Gewebeverbandes wiederherzustellen, der Zerstörung von Gewebe entgegenzuwirken und Reparaturprozesse einzuleiten. Makrophagen/Mikroglia werden physiologischerweise durch die Schäden im ZNS rasch aktiviert, proliferieren

und migrieren zum Ort des Geschehens, transformieren dort in phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen, sezernieren Mediatoren, räumen den vorhandenen Debris ab und wandeln sich dann wieder in ramifizierte Mikroglia um, die wieder als Wächter des ZNS funktionieren (Kreutzberg, 1996; Nimmerjahn et al., 2005; Raivich und Banati, 2004). In Abhängigkeit von dem auslösenden Reiz, der Anzahl und Aktivierung von Mikrogliazellen/Makrophagen, anderer eingewanderter Immunzellen sowie spezifischer Wirtsfaktoren wie beispielsweise des Regenerationspotential geschädigten Nervengewebes, kann die neuroinflammatorische Reaktion jedoch anhalten und zu sekundärem neuronalen Zellschaden führen (Danton und Dietrich, 2003; Emsley und Tyrrell, 2002; Morganti-Kossmann et al., 2002).

1.5 Die entorhinale Kortexläsion

Sämtliche Traumata des ZNS, wie beispielsweise der Schlaganfall oder direkter mechanischer Schaden, induzieren substantielle Reparaturprozesse der neuronalen Strukturen und Verschaltungen (Frotscher et al., 1997). Die entorhinale Kortexläsion (entorhinal cortex lesion, ECL) ist ein sehr gut etabliertes Modell um diese Prozesse zu untersuchen. Bei der ECL wird der Tractus perforans durchtrennt, der in den Schichten 2 und 3 des entorhinalen Kortex entspringt und in den distalen Segmenten der granulären Zelldendriten in mittleren und äußeren molekularen Schichten des Gyrus dentatus terminiert. Die ECL führt dadurch zu einer gut definierten, akuten Degeneration der Axone des glutaminergen Tractus perforans. Dieser Prozess führt zu einer rapiden und ausgeprägten Reaktion von Astrozyten und Mikroglia im deafferenzierenden Gyrus dentatus (Bechmann und Nitsch, 2000; Kwizinski et al., 2003). Die Reaktion von Mikroglia auf Schadensprozesse im ZNS lässt sich in diesem Modell deshalb sehr gut und standardisiert untersuchen. Nach der ECL werden Mikroglia umgehend aktiviert und migrieren zum Ort der Schädigung, ein Verhalten, das sie beispielsweise auch bei neurodegenerativen Erkrankungen zeigen (Kreutzberg, 1996; Streit, 2000). Diese Aktivierung ist mit verstärkter Phagozytose und der Hochregulation verschiedener immunmodulatorischer Faktoren (Bechmann und Nitsch, 1997; Kreutzberg, 1996) sowie der Sekretion

inflammatorischer und zytotoxischer Moleküle verbunden (Giulian und Tapscott, 1988). Diese Prozesse können dann insgesamt zum so genannten sekundären Zellschaden führen.

Man kann durch die ECL also Mikrogliazellen in ihrer Rolle bei Schadensprozessen im ZNS in einem gut definierten, standardisierten Modell charakterisieren.

1.6 Mikroglia und Makrophagen Marker

Da zur Darstellung von Mikroglia im ZNS lange nur die relativ unspezifische Silberkarbonatfärbung zur Verfügung stand, wurde die Existenz von Mikroglia bis in die achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts immer wieder angezweifelt. Erst durch die Entwicklung spezifischer Färbemethoden konnte ihr Vorhandensein gesichert werden.

So färben die Lektine Ricinus communis agglutinin-I (RCA-1, (Mannoji et al., 1986)) und das aus dem afrikanischen Strauch *Griffonia simplicifolia* gewonnene Isolektin B4 (IB4, (Streit und Kreuzberg, 1987)) komplexe Kohlenhydrate in der Glykokalix von Mikrogliazellen und Makrophagen im Parenchym spezifisch an, wobei allerdings auch das Gefäßendothel markiert wird. Weiterhin sind in der Literatur die Färbung von Thiaminpyrophosphatase (Murabe und Sano, 1981) und von Nukleosid-diphosphatase (Murabe und Sano, 1982) in der Plasmamembran als hochspezifisch beschrieben. Die angefärbten Proteine verlieren jedoch leicht ihre Aktivität, so dass für diese Färbung eine spezielle Aldehyd-Fixierung erfolgen muss.

Die immunologischen Besonderheiten der Mikrogliazelle können ebenfalls zur spezifischen Anfärbung genutzt werden. Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene sind hierzu verbreitet. Der wohl bis heute gebräuchlichste Mikrogliazellnachweis ist die Verwendung von Antikörpern gegen den Komplement Rezeptor Typ 3 (Synonyme: CR3, Mac-1, OX-42; (Perry et al., 1985)) der aus den Untereinheiten CD11b und CD18 besteht. CD11b ist nicht nur ein verbreiteter Makrophagen/Mikroglia marker, sondern hat auch eine sehr wichtige Funktion in der Immunantwort dieser Zellen. Die Differenzierung

entlang des Monozyten/Makrophagen Weges ist von einer Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Adhäsion begleitet (Tushinski et al., 1982). Diese Differenzierung vom Monozyten zum Makrophagen ist von der Expression der Integrine CD11a, CD11c sowie besonders ausgeprägt von CD11b begleitet (Hass et al., 1989) die Blockade von Mac-1 mittels eines CD11b- Antisensekonstrukts verhindert die Differenzierung zum Makrophagen (Prudovsky et al., 2002). Diese Integrine repräsentieren die α -Untereinheiten, die sich mit der β -Untereinheit CD18 zusammenlagern und drei unterschiedliche Heterodimere bilden, die an dem Ausbilden von Zell-Zell-Kontakt und interzellulären Kommunikationsprozessen beteiligt sind (Bohbot et al., 1993).

Das CD11b/CD18-Heterodimer ist der Komplement-Rezeptor 3 (complement receptor 3, CR3) und wird auch als Mac-1 Rezeptor (Mac-1) bezeichnet. Mac-1 spielt eine besonders herausragende Rolle bei Zell-Zell-Kontakt- und Zell-Substrat-Kontakt-Prozessen (Prudovsky et al., 2002). Mac-1 vermittelter Zellkontakt ist von besonderer Relevanz, um intrazelluläre Signale zu induzieren, die zu einer Monozyten/Makrophagen Differenzierung führen (Prudovsky et al., 2002). Mac-1 stimuliert außerdem die Phagozytose, wenn er durch den Liganden iC3b (inaktiviertes C3b) des Komplementsystems stimuliert wird, der bei pathologischen Prozessen im ZNS produziert wird (Janeway, 2001).

In der Maus lässt sich weiterhin das für Monozyten und Makrophagen spezifische Antigen F4/80 auf der Oberfläche ramifizierter Mikroglia anfärben (Austyn und Gordon, 1981; Hume et al., 1984) und der Plasminogen Aktivator Typ II, der im Zytosol von Zellen des Monozyten/Makrophagen Systems vorkommt (Akiyama et al., 1993). Noch ein weiteres Zielmolekül für Monozyten, Makrophagen und Mikroglia ist das ionisierte Calcium bindende Adaptermolekül 1 (Iba1), das im Gehirn spezifisch in ramifizierten Mikrogliazellen der grauen und weißen Substanz, in perivaskulären Zellen sowie in Makrophagen in den weichen Hirnhäuten und im Plexus choroideus exprimiert wird (Ito et al., 1998).

All diesen Markern ist gemein, dass sie auch von hämatogenen Makrophagen exprimiert werden. Wegen der nahen Verwandtschaft der Zellen des Monozyten/Makrophagen Systems unterscheiden sich diese, wie bereits

erwähnt (s. Kap. 1.3), nur in sehr geringem Masse in ihrer Antigenexpression.

Neben ihrer charakteristischen Morphologie unterscheiden sich Mikroglia in der Expression ihres Ionenkanalmusters von peripheren Monozyten und Makrophagen (Banati et al., 1991). Es gibt bis heute allerdings keinen Antikörper, der spezifisch Mikroglia, nicht aber Makrophagen anfärbt.

1.7 Identifizierung des Makrophagen Aktivierungsfaktors (MAF)

Der Makrophagen Aktivierungsfaktor (Macrophage Activation Factor, MAF) wurde in einem „differential display“ zur Ermittlung der differentiellen Genexpression in Monozyten aus dem peripheren Blut gegen diejenige in ausdifferenzierten Makrophagen erstmalig identifiziert (Rehli et al., 1995). In unserem Labor wurde in Vorarbeiten zu dieser Arbeit ein differential display von lädierten versus unlädierten Hippocampi nach ECL durchgeführt (Brauer et al., 2003). Hierbei zeigte MAF eine Hochregulation nach Läsion (Brauer et al., 2004).