

2 ZIEL UND FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

2.1 Allgemeines

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Regulation und des Expressionsmusters von MAF in Makrophagen/Mikrogliazellen im geschädigten Zentralen Nervensystem (ZNS).

Dazu wurde die differenzierungsabhängige MAF-Expression mittels Northern Blot überprüft und untersucht, ob die Regulation CD11b abhängig erfolgt. In einem nächsten Schritt sollte die Expression im ZNS auf Proteinebene untersucht werden. Hierzu produzierte ich einen MAF-spezifischen polyklonalen Antikörper. Die Spezifität wurde in Dot Blots, Western Blots und in Gehirnschnitten gezeigt. Durch immunohistochemische Färbungen von Einzelzell- und Kokulturen sollte MAF weiter charakterisiert werden. Anhand des gut definierten entorhinalen Kortexläsionsmodells sollte MAF dann in aktivierten Zellen *in vivo* weiter untersucht werden. Das Augenmerk galt hierbei der Frage, wo MAF nach einer Läsion im Gehirn exprimiert wird.

Die durchgeführte Genbankanalyse sollte die entwicklungsgeschichtliche Einordnung und Verwandtschaften mit anderen Molekülen klären und führte zu einer Zusatzfrage: Hat MAF hämolytische Fähigkeiten?

2.2 MAF in verschiedenen myeloiden Zellpopulationen

2.2.1 Wie zeigt sich MAF in Monozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen?

Um die differenzierungsabhängige Expression von MAF zu bestätigen, wurde ein Northern Blot mit zu Makrophagen differenzierten und undifferenzierten Monozyten der humanen Zelllinie U937 durchgeführt. Mittels eines Western Blots wurde die Expression im gleichen Zellmodell dann auf Proteinebene untersucht. Der Western Blot von murinen BV-2 Zellen überprüfte die Expression in diesem mikroglialen Zelltyp.

In BV-2 Einzelzellkulturen und der folgenden Einzelzellfärbungen wurde MAF in Mikrogliazellen weiter untersucht. Um die Expression auch auf intrazellulärer

Ebene zu charakterisieren, wurden die Zellen mittels konfokaler Zwei-Photonen-Mikroskopie dargestellt.

2.2.2 Wird die MAF-Expression CD11b-abhängig reguliert?

Um diese Frage zu beantworten, wurde in dem Northern Blot von differenzierten und undifferenzierten U937 Zellen (s. auch 2.2.1) zusätzlich die CD11b-Abhängigkeit der MAF-Hochregulation überprüft. Hierzu wurden mit einem Antisensekonstrukt gegen CD11b transfizierte Zellen auf ihre MAF-mRNA-Expression untersucht.

2.2.3 MAF in primären Makrophagen/Mikroglia

MAF wurde auch in primären Makrophagen/Mikrogliazellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Kokulturen von Mikroglia mit Neuronen und Astrozyten mittels Doppelfärbungen gegen MAF und den Neuronenmarker Neurofilament, den Astrozytenmarker GFAP und den Mikroglia marker CD11b charakterisiert.

Vor allem die exklusive Expression von MAF durch Makrophagen/Mikroglia in Umgebung von Zellen des ZNS konnte hierdurch überprüft werden.

2.3 MAF-Expressionsmuster nach Läsion

Die entorhinale Kortexläsion (ECL) ist ein sehr gut charakterisiertes, streng definiertes Schadensmodell des ZNS. Um das MAF-Expressionsmuster im ZNS nach Läsion zu untersuchen, bediente ich mich dieses etablierten Modells. Mit verschiedenen histochemischen Methoden wurde die MAF-Expression, sowie die Expression der klassischen Mikroglia marker CD11b und IB4 nach ECL untersucht. Um die intrazelluläre Expression auch in primären Mikrogliazellen in ihrer *in vivo* Umgebung zu untersuchen, wurde diese mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie dargestellt werden (s. auch Darstellung in BV-2 Zellen, 2.2.1).

2.4 MAF in anderen Spezies und Verwandtschaft zu anderen Molekülen

2.4.1 Wie lässt sich MAF einordnen?

Wie sich MAF in den evolutionshistorischen Kontext einordnen lässt, sowie eventuelle funktionelle Implikationen durch Verwandtschaft mit anderen bekannten Molekülen wurde durch die durchgeführte Genbankanalyse ermittelt. Es wurde eine Analyse mithilfe der cDNA Sequenz sowie ein so genannter "CD Search", der strukturelle Homologien anzeigt, mit der Proteinsequenz durchgeführt. Zusätzlich wurden die Kyte-Doolittle-Algorithmen einiger der vorhergesagten hochgradig strukturell homologen Proteine verglichen.

2.4.2 Besitzt MAF hämolytisches Potential?

Um mögliche hämolytische Fähigkeiten von MAF zu untersuchen, wurde ein so genannter Hämolyse-Assay durchgeführt. Zu diesem Zweck amplifizierte ich das MAF Gen aus cDNA mittels PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase Ketten Reaktion), klonierte das Amplifikat in den TOPO TA Vektor (Invitrogen, Karlsruhe), transformierte *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli*) und plattierte diese auf Blutagar aus. Nach der Übernachtinkubation wurde das hämolytische Potential durch Vorhanden- oder Nichtvorhandensein lytischer Höfe rundum die Bakterien abgelesen.