

4. Diskussion

Chemokine werden hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen exprimiert und führen zur Anlockung von Immunzellen in das geschädigte Gewebe (Karpus & Ransohoff, 1998). Chemokine sind also Signalmoleküle, die als Reaktion auf eine zelluläre Invasion durch pathologische Organismen produziert werden. Mikrogliazellen, die professionellen Makrophagen des zentralen Nervensystems, werden unter pathologischen Bedingungen aktiviert (Gehrmann et al., 1995; Kreutzberg, 1996; Benveniste, 1997). Die Aktivierung von Mikrogliazellen läuft in mehreren Stufen ab und stellt die erste zelluläre Reaktion (innerhalb von wenigen Stunden) im Gehirn auf eine neuronale Verletzung dar. Dabei wandern Mikrogliazellen aus den umliegenden Gebieten zum Ort der Schädigung. Daher müssen schnelle und direkte Interaktionen zwischen Neuronen und Mikrogliazellen im Gehirn existieren, obwohl bisher keine spezifischen Signalmoleküle gefunden werden konnten (Aschner et al., 1999; Streit et al., 1999). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob das Chemokin CCL21 ein solches spezifisches Signalmolekül darstellt und somit zur Wanderung von Mikrogliazellen führt.

Mit Hilfe der elektrophysiologischen Patch-clamp-Methode wurde in dieser Arbeit die funktionelle Expression von Chemokinrezeptoren für das Chemokin CCL21 in kultivierten Mikrogliazellen und in Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt nachgewiesen. Eine kurze Applikation von CCL21 führte zur Öffnung von Chloridkanälen, die in einer langanhaltenden Leitfähigkeitsänderung dieser Zellen resultierte. Um den Einfluß von CCL21 auf den Status der Aktivierung der Mikroglia zu untersuchen, wurden Migrations- und Proliferationsversuche durchgeführt und die Freisetzung von NO und Zytokinen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß CCL21 die Migration von Mikrogliazellen auslöst, jedoch keinen Einfluß auf die anderen untersuchten Aktivierungsmerkmale in kultivierten Mikrogliazellen besaß.

Das CC-Chemokin CCL21 wurde zuerst als ein Ligand von CCR7 identifiziert (Campbell et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Lediglich in einer Arbeit konnte eine Bindung von CCL21 an CXCR3 nachgewiesen werden (Soto et al., 1998). Soto und Mitarbeiter (1998) zeigten, daß Maus-CCL21 in Maus-CXCR3-transfizierten Zellen ein Kalziumsignal bewirkten. Mit Hilfe von zwei Knockout-Mauslinien und elektrophysiologischen und Migrationsexperimenten wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, daß CXCR3 der mikrogliale Rezeptor für CCL21 darstellt. Das hier gefundene Ergebnis unterstützt das Ergebnis von Soto und Mitarbeitern (1998) und zeigt weiterhin, daß CCL21 bei einer

natürlich vorkommenden Zellart der Maus nicht an den klassischen Rezeptor CCR7, sondern an CXCR3 bindet. In diesen CXCR3 Knockout Mäusen konnte drei Tage nach ECL eine veränderte Mikrogliaaktivierung festgestellt werden. Weiterhin konnte eine Beeinflussung auf den De- oder Regenerationsprozess von Neuronen acht Tage nach ECL in CXCR3 Knockout Mäusen festgestellt werden. In den CXCR3 Knockout Mäusen wurden die Dendriten Parvalbumin-positiver Interneurone im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen nicht zurückgezogen. Nach der Läsion des Nervus facialis, die zu einer starken Proliferation von Mikrogliazellen führt, konnten in den Knockout Mäusen keine Veränderung in der Mikrogliaaktivierung im Vergleich zu Wildtyp Mäusen gefunden werden.

4.1 Mikrogliazellen in Kultur und im akuten Hirnschnitt verfügen über Rezeptoren für das Chemokin CCL21, das die Öffnung eines Chloridkanals bewirkt

Im ZNS wurde die Induktion von inflammatorischen Chemokinen wie CCL2, CCL3 und CCL4, CXCL10 und CXCL9 für verschiedene Gehirnerkrankungen beschrieben (Glabinski et al., 1995; Lahrtz et al., 1998; Xia & Hyman, 1999; Simpson et al., 2000a, 2000b). Da Mikroglia Chemokinrezeptoren exprimieren, könnten Chemokine Signalstoffe darstellen, die der Mikroglia eine neuronale Verletzung signalisieren. Neurone produzieren zum Beispiel das membrangebundene Chemokin CX3CL1. Der entsprechende Rezeptor CX3CR1 für CX3CL1 wird in Mikrogliazellen exprimiert (Harrison et al., 1998). Die Aktivierung von Mikrogliazellen in CX3CR1 Knockout Mäusen blieb unverändert (Flügel et al., 2001). Dies könnte bedeuten, daß CX3CL1/CX3CR1 nicht in pathologische Prozesse involviert ist.

Biber und Mitarbeiter (2001) fanden heraus, daß verletzte Neurone *in vivo* und *in vitro* CCL21 exprimieren. Mit Hilfe von Kalziumexperimenten und Migrationstests zeigten sie, daß kultivierte Mikrogliazellen Rezeptoren für CCL21 besitzen (Biber et al., 2001). Die Vermutung liegt nahe, daß CCL21 ein Signalmolekül darstellt, das Mikrogliazellen eine neuronale Schädigung signalisiert.

In dieser Arbeit konnte durch Patch-clamp-Untersuchungen in primären kultivierten Mikrogliazellen der Maus die Expression von funktionellen Rezeptoren für das Chemokin CCL21 nachgewiesen werden. Stimulation mit CCL21 bewirkte eine langanhaltende Leitfähigkeitsänderung in Mikrogliazellen und veränderte so die physiologischen Eigenschaften der Zelle für viele Minuten. Kultivierte Mikrogliazellen stellen jedoch kein

gutes Modell für die ruhende, ramifizierte Mikroglia im Gehirngewebe dar. Der Kultivierungsprozess und die Kulturbedingungen lösen einen Aktivierungsprozess in Mikrogliazellen aus (Aschner et al., 1999). Ramifizierte Mikrogliazellen werden als die nicht aktivierten Zellen angesehen, die mögliche Signale von verletzten Neuronen empfangen. Daher wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von elektrophysiologischen Experimenten überprüft, ob ramifizierte Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt ebenfalls funktionelle Rezeptoren für CCL21 besitzen.

Die ramifizierten Mikrogliazellen im Schnittmodell können durch ihr charakteristisches elektrophysiologisches Profil von allen anderen bisher untersuchten Zellen des Gehirns unterschieden werden. Mikrogliazellen im Schnitt besitzen keine Natrium- und Kaliumkanäle, wie sie auf Neuronen vorkommen und dort an der Generierung von Aktionspotentialen beteiligt sind. Auch die passive Kaliumleitfähigkeit der ausdifferenzierten Astrozyten (Sontheimer und Waxman, 1993) und Oligodendrozyten (Berger et al., 1991) findet man bei Mikrogliazellen nicht. Ramifizierte Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt besitzen lediglich eine geringe Leitfähigkeit und nur selten kann man das Öffnen von einwärtsrektifizierenden Kaliumkanälen erkennen. Anhand dieser Eigenschaften können die Mikrogliazellen von den peripheren Makrophagen, von denen sie mit großer Wahrscheinlichkeit abstammen, unterschieden werden (Gallin, 1984). Makrophagen besitzen neben einwärtsgerichteten Kaliumkanälen auch verzögert-öffnende auswärtsgerichtete Kaliumkanäle (Nörenberg et al., 1994). Diese kann man auch in kultivierten Mikrogliazellen durch die Stimulation mit Substanzen wie LPS induzieren (Visentin et al., 1995).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß eine Stimulation mit CCL21 zu einem langanhaltenden Anstieg in der Leitfähigkeit in ramifizierten Mikrogliazellen im akut isolierten Gehirngewebe führt. Die Leitfähigkeitsänderung in der ramifizierten Mikroglia nach CCL21 Stimulation erhärtet die Hypothese, daß das von verletzten Neuronen produzierte CCL21 über einen mikroglialen Chemokin Rezeptor den Mikrogliazellen neuronale Verletzung signalisieren könnte.

CCL21 löste sowohl in Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt als auch in Kultur einen Anstieg in der Leitfähigkeit aus. Für die weiteren Experimente wurden daher kultivierte Mikrogliazellen verwendet, weil diese elektrophysiologisch leichter zugänglich waren. Nach Auslösen des CCL21-induzierten Stroms wurde untersucht, welche Ionen zu diesem Strom führen. Der CCL21-induzierte Strom besaß ein Umkehrpotential von 0 mV, was

eine Chloridionenselektivität nahelegt. Dieses konnte durch pharmakologische Experimente bestätigt werden: eine Reduzierung der extrazellulären Chloridkonzentration oder Applikation von Chloridkanalblockern führte zu einer reversiblen Reduktion des CCL21-induzierten Stroms. Somit stellt der CCL21-induzierte Strom einen Chloridstrom dar. Weiterhin konnte eine chemotaktische Reaktion in Antwort auf eine CCL21 Stimulation bei Mikrogliazellen gefunden werden. Die Beobachtung, daß der Chloridkanalblocker DIDS die CCL21-induzierte Chemotaxis der Mikrogliazellen verringerte, legte einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Chloridkanäle und der chemotaktischen Aktivität der Mikroglia nahe. Somit könnte die CCL21-induzierte Chloridleitfähigkeit eine Möglichkeit darstellen, um das Verhalten von Mikrogliazellen nach neuronaler Verletzung zu verändern.

Es gibt in der Literatur bereits Hinweise darauf, daß Chloridkanäle das zelluläre Verhalten von Mikrogliazellen beeinflussen können. Ein langanhaltender Chloridstrom konnte durch mechanischen Zug an der Membran der kultivierten Mikroglia ausgelöst werden (Eder et al., 1998). Die Autoren vermuteten, daß der Chloridstrom für die Induktion der Ramifizierung von Mikrogliazellen verantwortlich ist, jedoch nicht für die Aufrechterhaltung der ramifizierten Morphologie der Mikrogliazellen. Weiterhin scheinen Chloridkanäle wichtig für die „Colony-stimulating factor-1“ (CSF-1)-stimulierte Proliferation von Mikrogliazellen der Ratte zu sein (Schlichter et al., 1996). Eine ähnliche Rolle besitzen Chloridkanäle bei der Proliferation von Lymphozyten (Phipps et al., 1996).

4.2 CXCR3 stellt den mikroglialen Rezeptor für CCL21 dar

Die Aminosäuresequenz des Chemokins CCL21 bei Mäusen, Schweinen und Menschen ist konserviert (Hedrick & Zlotnik, 1997). In der Literatur findet man hingegen bei den verschiedenen Spezies gegensätzliche Ergebnisse, an welchen Rezeptor CCL21 binden kann. Wie bereits erwähnt, wurde CCR7 als CCL21 Rezeptor beschrieben (Campbell et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Später zeigten Soto und Mitarbeiter (1998), daß CCL21 ebenfalls an CXCR3 binden kann und CCL21 aus der Maus - wie die CXCR3 Rezeptor Liganden CXCL10 und CXCL9 - angiostatische Aktivität besitzt. In transfizierten Zellen bindet humanes rekombinantes CCL21 jedoch weder an den humanen- noch an den Maus-CXCR3 Rezeptor (Jenh et al., 1999). Es wurde vermutet, daß CCL21 ein Beispiel für ein Chemokin darstellt, dessen Rezeptor-Bindungseigenschaften Spezies-abhängig sind. Maus-CCL21 kann sowohl an den CCR7 wie auch an den CXCR3 binden, humanes CCL21

hingegen nur an den CCR7 Rezeptor. In diesen Arbeiten wurden jedoch ausschließlich transfizierten Zellen verwendet. Im Gegensatz dazu fanden Biber und Mitarbeiter heraus, daß CCL21 in primären kultivierten humanen Mikrogliazellen eine Migration und einen Anstieg in der Kalziumkonzentration auslöst (unveröffentlichte Beobachtungen von Knut Biber). Diese humanen Mikrogliazellen exprimieren ebenfalls CXCR3 (Biber et al., 2002). In der Literatur findet man wenig zur Pharmakologie von Chemokinrezeptoren und man findet widersprüchliche Ergebnisse zur Pharmakologie von einzelnen Rezeptoren. Dies könnte auf die unterschiedlichen verwendeten Expressionssysteme zurückzuführen sein. Je nachdem welche Zellen bei der Transfektion verwendet wurden, konnten unterschiedliche Eigenschaften des untersuchten Rezeptors gefunden werden (Blanpain et al., 1999; Oppermann et al., 1999, Nibbs et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Verwendung von Knockout Mäusen herausgefunden, daß die Wirkung von Maus-CCL21 bei kultivierten Mikrogliazellen über den Chemokinrezeptor CXCR3 vermittelt wird und nicht über CCR7. In den elektrophysiologischen Experimenten führte eine Stimulation mit CCL21 bei Mikrogliazellen aus CXCR3 Knockout Mäusen nicht zu einer Veränderung der Membranleitfähigkeit. Im Gegensatz dazu konnte in Mikrogliazellen von CCR7 Knockout Mäusen eine elektrophysiologische Antwort nach Stimulation mit CCL21 gefunden werden. Diese entsprach in ihren Eigenschaften der Antwort, die in Wildtyp Mäusen gefunden wurde. Der CXCR3 Ligand CXCL10 bewirkte ebenfalls eine vergleichbare Leitfähigkeitsänderung wie CCL21. Der CCR7 Ligand CCL19 induzierte hingegen keine Effekte wie CCL21. Dieses Ergebnis konnte in Migrationsversuchen bestätigt werden; nach Stimulation mit CCL21 oder CXCL10 konnte keine Migration von Mikrogliazellen aus CXCR3 Knockout Mäusen gefunden werden. CCL21 und CXCL10 lösten hingegen in Mikrogliazellen aus CCR7 Knockout Mäusen eine vergleichbare Migration wie in Wildtyp Mikroglia aus.

Diese Ergebnisse unterstützen die früheren Ergebnisse im rekombinanten System (Soto et al., 1998) sowie die Beobachtung, daß der klassische Rezeptor für CCL21, der Chemokinrezeptor CCR7, nicht in Mikrogliazellen exprimiert wird (Biber et al., 2001). Zum ersten Mal konnte nachgewiesen werden, daß ein CC-Chemokin in primären Zellen einen CXC-Chemokin Rezeptor aktiviert. Im Gehirn signalisiert CCL21 somit über ein anderes Rezeptorsystem als im peripheren Immunsystem.

Für CCL21 existieren zwei unterschiedliche Gene (Vassileva et al., 1999). Klonierungsversuche zeigten, daß das CCL21 Gen in Neuronen (Rappert et al., 2002) identisch ist zu den entsprechenden Genen in Lymphknoten (Nagira et al., 1997; Vassileva et al., 1999). Das Chemokin CCL21, das bisher als ein konstitutiv exprimiertes Chemokin in der Peripherie beschrieben wurde (Mantovani, 1999), stellt im ZNS ein induzierbares Chemokin dar. Somit liegt nahe, daß sich der CCL21 Chemokinsignalweg im ZNS deutlich von dem peripheren Immunsystem unterscheidet, und daß die aus dem peripheren Immunsystem gewonnenen Daten nicht generell auf das ZNS zu übertragen sind.

4.3 Wirkung von CCL21 auf typische Parameter der Mikrogliaaktivierung

Aktiviert Mikrogliazellen proliferieren und produzieren eine Reihe von Zytokinen (Prinz et al., 1999; Hanisch et al., 2001) und zytotoxischen Molekülen wie NO (Bonfoco et al., 1995). Durch zytotoxische Zytokine wie zum Beispiel TNF- α werden benachbarte Zellen geschädigt (Downen et al., 1999). Dadurch können aktivierte Mikrogliazellen eine inflammatorische Antwort auslösen. NO ist ein physiologischer Botenstoff im zentralen Nervensystem, besitzt aber in hohen Konzentrationen eine toxische Wirkung (Leist & Nicotera, 1997). Die toxische Wirkung von NO basiert auf der Schädigung der DNS und irreversiblen Proteinmodifikationen, wie der S-Nitrosylierung (Leist & Nicotera, 1998).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob CCL21 zu einer Mikroglia proliferation und Produktion von NO oder Zytokinen führt. Es konnte jedoch kein Einfluß von CCL21 auf die typischen Parameter der Mikrogliaaktivierung wie basale oder LPS-induzierte Synthese von inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-6, IL-12), oder NO gefunden werden. Dies unterstützt die Ergebnisse von Biber und Mitarbeitern (2001), die ebenfalls nach CCL21 Stimulation keine mRNA Expression von BDNF, NGF, IL-10, IL-1 β und TNF- α finden konnten. Dieses Fehlen des Einflusses von CCL21 auf die genannten Faktoren könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, daß kultivierte Mikrogliazellen bereits aktiviert sind (Aschner et al., 1999). Auch auf die Proliferation von primären Mikrogliazellen konnte kein Einfluß von CCL21 gefunden werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß das CCL21/CXCR3 Signalsystem eher ein Indikator für neuronale Verletzung für Mikrogliazellen zu sein scheint, als ein Induktionssystem für die mikrogliale Aktivierung.

In der Literatur findet man einige wenige Hinweise, daß Chemokine zu einer Zellaktivierung im Sinne von Proliferation und Sekretion führen. In primären humanen Makrophagen führte die Stimulation mit CCL4 und CXCL12 zur Öffnung von

Chloridkanälen und Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen (Liu et al., 2000), die eine Rolle bei der Phagozytose und Sekretion dieser Zellen spielen (Ince et al., 1988; Kakuta et al., 1988; Holevinsky & Nelson, 1995). Auch CCL21 kann zelluläre Prozesse beeinflussen. Hromas und Mitarbeiter (2000) stellten eine Unterdrückung der Proliferation von humanen Rückenmark-Vorläuferzellen nach CCL21 Stimulation fest.

4.4 Bedeutung des Chemokinrezeptors CXCR3 nach Fazialisläsion oder ECL

4.4.1 Der CXCR3 Rezeptor ist an der Aktivierung der Mikroglia nach ECL, jedoch nicht nach einer Fazialisläsion beteiligt

Im normalen Gehirngewebe besitzen Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie mit einer geringen Expression von immunrelevanten Oberflächenmolekülen wie zum Beispiel dem MHC-II Molekül (Hart & Fabry, 1995; Lassmann, 1997). Nach einer Verletzung, Pathologie oder einem traumatischen Prozess transformieren die Zellen zu ameboiden Zellen. Diese Transformation der Mikroglia ist gekennzeichnet durch den Verlust der verzweigten Morphologie, einer Vergrößerung des Zellkörpers und einer veränderten Expression von immunologisch wichtigen Molekülen, wie dem Komplement Rezeptor 3 (Graeber et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit wurden die pathologischen Modelle der ECL und der Fazialisläsion verwendet, um den Einfluß des Chemokinrezeptors CXCR3 auf die Aktivierung der Mikroglia *in vivo* zu untersuchen. Die ECL führt zu einer anterograden, eine Fazialisläsion hingegen zu einer retrograden Degeneration von Neuronen.

Nach einer Fazialisläsion in Ratten konnten die morphologischen Veränderungen der Mikroglia mit Änderungen in der Membrankapazität korreliert werden (Boucsein et al., 2000). Die morphologischen Veränderungen der Mikroglia unter pathologischen Bedingungen gehen also mit einer funktionellen Veränderung der Zellen einher. Weiterhin führt die Läsion zu einer starken Proliferation der Mikroglia im Nucleus nervi facialis (Blinzinger & Kreutzberg, 1968).

Nach ECL kommt es ebenfalls zu morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen und zu einer deutlichen Zunahme ihrer Anzahl in der mittleren und äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus (Gall et al., 1979; Gehrman et al., 1991; Jensen et al., 1994; Fagan & Gage, 1994). Diese Zunahme der Zellzahl wird auf eine Einwanderung der Mikrogliazellen zurückgeführt, da in anderen Bereichen des Gyrus dentatus, wie zum Beispiel dem Hilus, die Dichte der Mikrogliazellen abnimmt. Bisher ist nicht bekannt,

welche Signale zu den morphologischen Veränderungen beziehungsweise zur Migration der Mikroglia führen.

Drei Tage nach ECL konnte in der vorliegenden Arbeit durch immunzytochemische Färbungen mit Mac-1 Unterschiede in der Morphologie der Mikroglia zwischen CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen gefunden werden. Der Antikörper Mac-1 markiert Makrophagen. Folglich können neben der Mikroglia auch eingewanderte Makrophagen aus dem peripheren Immunsystem gefärbt sein. Allerdings geht aus der Literatur hervor, daß CCL21 keine Wirkung auf Monozyten oder Makrophagen besitzt (Nagira et al., 1997; Williman et al., 1998). Eine CCL21-induzierte Chemotaxis von Monozyten oder Makrophagen nach der ECL ist also unwahrscheinlich. Auf der anderen Seite kann durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke nach ECL ein Einfluß der eindringenden Immunzellen des peripheren Immunsystems nicht ausgeschlossen werden. In einem tierexperimentellen Modell von MS wird CCL21 in den Venolen im ZNS produziert und führt dort zum Einwandern von T-Zellen (Alt et al., 2002). In einer transgenen Maus, in der Astrozyten direkt CXCL10 produzieren, konnte eine Einwanderung von Leukozyten in den perivaskulären, meningealen und ventrikulären Raum des Gehirns gefunden werden (Boztug et al., 2002). CXCL10 bewirkt ebenfalls, wie CCL21, eine Anlockung von T-Zellen und darüber hinaus lockt es natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten/Makrophagen an (Taub et al., 1993; Loetscher et al., 1996). Es ist bekannt, daß CXCL10 während der Alzheimer Erkrankung (Xia et al., 2000) und MS produziert wird (Sorensen et al., 1999). Auch nach einer ECL konnte eine Expression von CXCL10 gefunden werden (Rappert et al., eingereicht). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß periphere Immunzellen einen direkten oder durch Sekretion von anderen inflammatorischen Substanzen indirekten Einfluß auf die Mikrogliaaktivierung nach einer ECL ausübten.

In CXCR3 Knockout Mäusen konnten nach einer ECL Mikrogliazellen lediglich in der MML gefunden werden, jedoch nicht wie in Wildtyp Mäusen auch in der OML des Gyrus dentatus. Weiterhin war es in den Knockout Mäusen möglich, einzelne deutlich voneinander getrennte Mikrogliazellen zu identifizieren. Eine deutliche Abgrenzung und Quantifizieren der Mikrogliazellen in den Wildtyp Tieren war hingegen nicht möglich, da einzelne Mikrogliazellen nur schwer durch Durchfokussieren des Schnittes erkennbar waren. Die Zellen fielen durch ihre für aktivierte Zellen typische runde Morphologie auf. Dies ließ sich im Bild nicht darstellen, da die Schnitte zu dick waren. Die

darunterliegenden Ebenen störten im Bild. Eine bessere Darstellbarkeit lies sich auch nicht erreichen, wenn mehrere Ebenen eines Schnittes digital aufgenommen und übereinander projiziert wurden. Ein Vergleich der Schnitte von Wildtyp und Knockout Mäusen legt aber nahe, daß in den Knockout Tieren weniger Mikrogliazellen in der Molekularschicht vorhanden sind. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß in den Knockout Mäusen mehr Zellen in dem Hilus des Gyrus dentatus zu finden waren, während dieser Bereich bei Wildtyp Mäusen fast frei von Mikrogliazellen war. In der Literatur wird davon ausgegangen, daß nach ECL Mikrogliazellen aus dem Hilus in die Molekularschichten einwandern. Eine stärkere Proliferation als Ursache für eine größere Zellzahl in Wildtyp Tieren kann ausgeschlossen werden, da in den hier vorliegenden Untersuchungen die Proliferation in CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen vergleichbar war (siehe 4.4.2 der Diskussion). Die unterschiedliche Verteilung der Mikrogliazellen in Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen kann ebenfalls nicht durch eine unterschiedliche Produktion des Ligands CXCL10 erklärt werden. In beiden Tiergruppen wird nach einer ECL der Ligand CXCL10 gleichermaßen exprimiert (Rappert et al., eingereicht), jedoch findet der Ligand in den CXCR3 Knockout Tieren anscheinend keinen Rezeptor, über den er agieren kann. Somit scheint CXCR3 der einzige Rezeptor für CXCL10 auf Mikrogliazellen zu sein, und dieser Rezeptor scheint eine wichtige Rolle in der Anlockung der Mikroglia als Antwort auf die axonale Degeneration zu spielen. Dies bestätigt die große Bedeutung des Chemokin-Chemokinrezeptor Systems in der Kommunikation zwischen verletzten neuronalen Strukturen und der Mikroglia.

Mikroglia in CXCR3 Knockout Tieren besaßen eine verzweigte Morphologie, wobei man jedoch im Vergleich zu scheinoperierten Tieren eine Reduzierung der Ramifizierung feststellen konnte. Dies spricht dafür, daß auch im CXCR3 Knockout Tier eine gewisse Aktivierung der Mikrogliazellen stattfindet. Der über CXCR3 vermittelte Signalweg stellt also offenbar nicht den einzigen Weg für eine Aktivierung der Mikroglia dar, da ansonsten in den Knockout Mäusen ebenfalls ramifizierte Mikrogliazellen - wie in scheinoperierten Tieren - vorhanden sein müßten. Dies wird durch die in dieser Arbeit gefundenen Erkenntnisse an der kultivierten Mikroglia unterstützt. Hier führten die Liganden des CXCR3 Rezeptors, CCL21 und CXCL10, zu einer Wanderung der Zellen, jedoch nicht zu einer Synthese von zytotoxischem NO oder von proinflammatorischen Zytokinen. Die Synthese solcher Moleküle findet man jedoch in aktivierten Mikrogliazellen. Für eine vollständige Mikrogliaaktivierung sind also weitere Signale notwendig.

Aus der Literatur ist bekannt, daß eine Verletzung von Neuronen zu einer Erhöhung von Kaliumionen im Extrazellulärraum führt, welches wiederum Mikrogliazellen aktivieren könnten (Abraham et al., 2001). ATP, was in hohen Konzentrationen von verletzten oder sterbenden Zellen freigesetzt wird (Phillis et al., 1993), kann ebenfalls zu einer Aktivierung und Migration von Mikrogliazellen führen (Ferrari et al., 1997; Honda et al., 2001). Die ECL induziert die Apoptose von Neuronen (Kovac et al., eingereicht), die anderthalb Tage nach der Läsion durch eine immunzytochemische Färbung gegen aktivierte Caspase-3 sichtbar gemacht werden kann. Zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen konnte kein Unterschied in der Caspase-3-Expression in Neuronen im Hippocampus festgestellt werden. Anderthalb Tage nach ECL konnten die Schnitte von Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen aufgrund der Mac-1 Färbung unterschieden werden. Im Vergleich zu scheinoperierten CXCR3 Knockout Mäusen, konnte jedoch auch in den CXCR3 Knockout Mäusen nach einer ECL eine Veränderung in der Morphologie der Mikroglia festgestellt werden. Da der neuronale Apoptoseprozess unverändert zwischen CXCR3 Knockout und Wildtyp war, scheint der neuronale Apoptoseprozess unabhängig von der Mikrogliaaktivierung zu sein. Das von verletzten oder sterbenden Zellen freigesetzte ATP (Phillis et al., 1993) oder Kalium nach ECL könnte jedoch das Signal darstellen, daß zur morphologischen Veränderungen der Mikroglia in den CXCR3 Knockout Mäusen führt. Diese Signale reichen eventuell nicht aus, um eine vollständige Aktivierung der Mikroglia in den CXCR3 Knockout Mäusen, wie in den Wildtyp Mäusen beobachtet, zu erreichen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Astrozyten und Mikrogliazellen über verschiedene Signalwege miteinander „kommunizieren“ (Bernhardi & Ramires, 2001). Astrozyten könnten nach einer ECL möglicherweise Signale produzieren, die Mikrogliazellen „alarmiert“, jedoch nicht vollständig aktiviert. Astrozyten werden im Vergleich zu Mikrogliazellen nach einer ECL zeitlich später aktiviert. Ihre Aktivierung drückt sich in einer Hypertrophie und erhöhten GFAP Expression, Proliferation und Phagozytose aus (Gall et al., 1979; Poirier et al., 1991; Jensen et al., 1994; Hailer et al., 1999; Bechmann & Nitsch, 2000). Acht Tage nach ECL konnte man aufgrund der Mikroglia/Makrophagen Färbung mit Mac-1 nicht mehr zwischen Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen unterscheiden. Die Aktivierung der Mikrogliazellen in den CXCR3 Knockout Mäusen hatte zu dem Zeitpunkt ein vergleichbares Niveau wie in den Wildtyp Mäusen erreicht. Die Aktivierung der Mikroglia scheint somit in den Knockout Mäusen verzögert, jedoch nicht

vollständig unterdrückt zu werden. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Mikrogliazellen zu diesem späteren Zeitpunkt durch die Astrozyten aktiviert werden.

Nach einer Läsion des Nervus facialis konnten in der mikroglialen Aktivierung in Bezug auf die Morphologie keine Unterschiede zwischen Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen festgestellt werden. Es scheint also, daß in diesem Modell einer anterograden Degeneration andere Signale eine Rolle spielen als nach einer retrograden Degeneration. Für Astrozyten zum Beispiel ist bekannt, daß sie in Modellen retrograder Degeneration nicht an der Phagozytose von geschädigtem neuronalem Material teilnehmen (Gehrmann et al., 1991; Thanos, 1991; Streit & Graeber, 1993; Sorensen et al., 1996), jedoch sind Astrozyten an der Phagozytose anterograd degenerierender Axone beteiligt. Weiterhin führt die Fazialisläsion nicht zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und lediglich wenige Leukozyten wandern in den Nucleus nervi facialis des lädierten Nerven (Raivich et al., 1998). Die extrakraniale, vom Nucleus nervi facialis entfernte Läsion führt zu einer inflammatorischen Reaktion, die hauptsächlich durch die verletzten Zellen selbst bewirkt wird. Nach einer Fazialisläsion konnte eine neuronale Expression von CCL2 gezeigt werden, jedoch konnte keine Regulation der Expression von CXCL10 gefunden werden (Flügel et al., 2001). Die CXCL10 Expression hängt mit der Produktion von Interferon- γ zusammen, welches jedoch nach einer Fazialisläsion ebenfalls nicht induziert wird (Ohmori & Hamilton, 1995). Des weiteren ist CCL21 nach Fazialisläsion nicht detektierbar (unveröffentlichte Beobachtungen von Dr. Biber). Diese in der Literatur beschriebenen Unterschiede in der Expression von Chemokinen und die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede in der Funktion von CXCR3 in den beiden untersuchten Läsionsmodellen könnten erklären, wie Immunzellen zwischen unterschiedlichen Gehirnerkrankungen beziehungsweise Verletzungen differenzieren können.

4.4.2 Die Aktivierung des CXCR3 Rezeptors führt zur Migration und nicht zur Proliferation von Mikrogliazellen

Die regionenspezifische Zunahme der Mikrogliazellen kann die Folge von Proliferation oder Migration sein. Beide Möglichkeiten werden in der Literatur diskutiert (Gall et al., 1979; Fagan & Gage, 1994; Hailer et al., 1999; Bechmann & Nitsch, 2000). Eine erhöhte Proliferation von Mikrogliazellen konnte drei Tage nach ECL festgestellt werden, ein Zeitpunkt, zu dem ebenfalls eine Anhäufung von Mikrogliazellen in der Molekularschicht des Gyrus dentatus vorzufinden ist. Dies könnte bedeuten, daß die Anhäufung der

Mikrogliazellen in der Molekularschicht durch Proliferation von Mikrogliazellen bedingt wird. Auf der anderen Seite findet man drei Tage nach ECL eine Reduktion von Mikrogliazellen im Hilus des Gyrus dentatus, was auf eine Migration von Mikrogliazellen aus diesen Gebieten in die Molekularschicht spricht. Obwohl die Mikrogliaaktivierung durch das Eliminieren des CXCR3 Rezeptors beeinflusst wurde, war das Ausmaß der Proliferation drei Tage nach ECL nicht unterschiedlich zwischen Wildtyp und CXCR3 Knockout Mäusen. Daraus kann man schließen, daß die CXCR3 vermittelte Mikrogliaaktivierung nach einer ECL und die Proliferation der Mikroglia unabhängige Prozesse sind. Die Aktivierung von CXCR3 durch CCL21 oder CXCL10 führte auch bei Mikrogliazellen *in vitro* nicht zu einer verstärkten Proliferation.

4.4.3 CXCR3 spielt keine Rolle in der Aktivierung von Astrozyten nach ECL

Acht Tage nach einer ECL setzt eine Aktivierung der Astrozyten ein. Bei ihrer Aktivierung werden Astrozyten stärker GFAP-reaktiv (Nörenberg, 1994), und ihre Morphologie und Verteilung im Hippocampus ändert sich (Gall et al., 1979; Jensen et al., 1994; Bechmann & Nitsch, 1997). Jedoch kommt es nach der Läsion nicht zur Zunahme der Astrozytenzahl, obwohl eine gesteigerte Proliferation nachgewiesen wurde (Hailer et al., 1999). Astrozyten exprimieren ebenfalls den CXCR3 Rezeptor (Biber et al., 2002) und sind ebenfalls zur Migration fähig. In der vorliegenden Arbeit konnte nach einer ECL zwischen CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäusen kein Unterschied in der Aktivierung der Astrozyten festgestellt werden. Eine verstärkte GFAP Expression sowie eine Veränderung der Morphologie trat in beiden Tiergruppen gleichermaßen auf.

Die Aktivierung von Astrozyten scheint im Gegensatz zu Mikrogliazellen unabhängig von der CXCR3-Aktivierung zu sein. Kultivierte Astrozyten zeigten ebenfalls keine elektrophysiologischen Reaktionen nach Stimulation mit CCL21 oder CXCL10 (Daten nicht dargestellt).

Möglicherweise spielt CXCR3 eine Rolle während der Entwicklung von Astrozyten. Es gibt bereits mehrere Hinweise, daß Chemokine nicht nur in der Immunantwort, sondern auch in der Entwicklung eine Rolle spielen. CXCR4 und dessen Ligand CXCL12 konnte zum Beispiel in der neuronalen Entwicklung des Kleinhirns gefunden werden (Nagasawa et al., 1996; Ma et al., 1998; Zou et al., 1998). Das Chemokin CXCL3 spielt eine Rolle in der Proliferation von Oligodendrozyten Vorläufern (Roinson et al., 1998), und CXCL8 bewirkt eine verstärkte Überlebensfähigkeit von kultivierten Neuronen (Araujo & Cotman,

1993). Diese Ergebnisse zeigen, daß CXC-Chemokine und ihre Rezeptoren Einfluß auf die Entwicklung von Zellen ausüben können. Inwieweit CXCR3 in dem Entwicklungsprozess wichtig ist oder nicht, muß erst in weiteren Experimenten geklärt werden.

4.4.4 Funktion von CXCR3 und dessen Liganden

Die Expression von CCL21, einem Liganden des CXCR3 Rezeptors (Biber et al., 2001; Rappert et al., 2002), konnte sowohl in kultivierten Neuronen als auch sechs Stunden nach einer MCAO in Neuronen nachgewiesen werden (Biber et al., 2001). Sechs Stunden nach ECL wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbung ebenfalls eine Expression von CXCL10 festgestellt (Rappert et al., eingereicht). CXCL10-positiven Zellen konnten vor allem im entorhinalen Kortex und in geringer Zahl im Hippocampus gefunden werden. Die Morphologie und Größe dieser Zellen lassen vermuten, daß es sich bei diesen Zellen um Neurone handelt. Nach beiden Läsionen werden also die Liganden des CXCR3 Rezeptors von Neuronen exprimiert. Die Liganden induzieren die Migration von Mikrogliazellen zum Ort der Expression. Ob dieses Signal jedoch zur Neuroprotektion oder zum Abtöten der Neurone durch die „gerufene“ Mikroglia führt, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden. CCL21 bewirkt nicht die Freisetzung von NO oder zytotoxischen Zytokinen in kultivierten Mikrogliazellen. Dies spricht eher dafür, daß CCL21 ein Signal zur Migration der Mikrogliazellen zu den verletzten Neuronen darstellt, und nicht zur vollständigen Aktivierung und somit auch nicht zur Phagozytose der Neurone führt. Ob dies auch *in vivo* zutrifft, muß in weiteren Experimenten geklärt werden. In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob die nach ECL verbleibenden GABAergen Neurone in CXCR3 Knockout Tieren einen positiven oder störenden Einfluss auf den später einsetzenden Regenerationsprozeß besitzen. Mit diesem Versuch könnte man klären, ob die Aktivierung des Rezeptors auf Mikrogliazellen die zur Migration führt, förderlich oder eher störend auf die Regeneration von Neuronen wirkt.

In diesem Zusammenhang sind weitere Chemokine bekannt, die nach einer Läsion in der Mikroglia/Neuron Kommunikation involviert sind. Das Chemokin CX3CL1 wird in Neuronen konstitutiv exprimiert (Harrison et al., 1998). Eine Axotomie des Nervus facialis in der Peripherie führt zu einer verringerten Expression von CX3CL1 mRNA im Nucleus nervi facialis. Der Rezeptor von CX3CL1 wird hingegen in Mikrogliazellen nach der Transektion des Nerven verstärkt exprimiert. Dies wurde als ein mögliches neuronales Signal für die Aktivierung der Mikroglia interpretiert. Da das Chemokin jedoch konstitutiv exprimiert wird und unter pathologischen Bedingungen die Expression reduziert wird,

könnte dieses Chemokin als permanentes Signal für intakte Neurone interpretiert werden. Ob die Expression des Chemokins nach einer ECL reduziert und die des Rezeptors auf Mikrogliazellen verstärkt wird, ist bisher nicht untersucht worden und somit auch nicht die Frage, inwieweit die CX3CL1/CX3CR1 und CXCL10/CXCR3 Signalsysteme miteinander verbunden sind.

Der entorhinale Kortex und seine Projektionen zum Hippocampus stellen die ersten Gehirnregionen dar, die durch die Alzheimer Erkrankung betroffen sind (Hyman et al., 1984). Parvalbumin-positive GABAerge Interneurone besitzen Synapsen mit den entorhinalen Neuronen in der mittleren und äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus (Nitsch et al., 1990). Die Dendriten dieser GABAergen Neurone werden acht Tage nach einer ECL zurückgezogen (Nitsch & Frotscher, 1991). Die dauerhafte dendritische Retraktion Parvalbumin-positiver Neurone nach ECL konnte durch systemische Gabe des selektiven NMDA Rezeptor Antagonisten MK-801 unterdrückt werden (Nitsch & Frotscher, 1991). NMDA Rezeptoren kommen auf Mikrogliazellen vor (Gottlieb & Matute, 1997), jedoch konnte durch den Inhibitor MK-801 kein Einfluß auf die Aktivierung der Mikroglia gefunden werden (Bechmann & Nitsch, 2000). Die Autoren schlossen daraus, daß die GABAergen Neurone einen spezifischen Input vom entorhinalen Kortex benötigen (Zipp et al., 1989; Nitsch & Frotscher, 1991). Nachdem die GABAergen Neurone ihren Input nicht erhalten haben, ziehen sie ihre Dendriten zurück, wodurch die Mikroglia aktiviert werden würde. Die Phagozytose der degenerierenden Axone nach einer ECL durch die Mikroglia konnte bereits gezeigt werden (Bechmann & Nitsch, 1997).

Die Parvalbumin-positiven Dendriten wurden jedoch in den CXCR3 Knockout Mäusen nicht wie bei den Wildtyp Mäusen zurückgezogen. In beiden Tiergruppen wurden die Läsionen auf die gleiche Art und Weise gesetzt. Die Parvalbumin-positiven Neurone besaßen also sowohl in den CXCR3 Knockout Tieren wie auch in den Wildtyp Mäusen keinen Input aus dem entorhinalen Kortex. Der Verlust der Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex, kann also nicht der Grund sein, daß die GABAergen Neurone ihre Dendriten in den Wildtyp Mäusen reduzieren.

Wie bereits diskutiert, wurde durch die Deletion des CXCR3 Rezeptors die Mikrogliaaktivierung verringert. Der geringere Verlust der Dendriten von Parvalbumin-positiven Interneuronen in den CXCR3 Knockout Mäusen scheint seine Ursache in der reduzierten Aktivierung der Mikrogliazellen zu haben. Mikrogliazellen könnten also die aktiven Elemente darstellen, die ein Zurückziehen der denervierten distalen Dendriten

bewirken. Astrozyten scheinen für diesen Rückzug der Dendriten nicht verantwortlich zu sein, da sie in Wildtyp wie auch in CXCR3 Knockout Mäusen gleich stark aktiviert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Umbauprozesse nach einer ECL durch die Mikrogliaaktivierung beeinträchtigt wurden. Ob dies zu einer besseren Regeneration nach ECL führt oder die Situation verschlechtert, muß in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.5 Potentielle klinische Aspekte

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob Chemokine und ihre Rezeptoren als therapeutische Werkzeuge in ZNS Erkrankungen dienen könnten. Hierfür ist es notwendig, das Verhältnis und das Zusammenspiel der verschiedenen Chemokine und ihrer Rezeptoren in der Entstehung von Erkrankungen zu verstehen und die Frage zu klären, ob Chemokine und ihre Rezeptoren protektive oder destruktive Eigenschaften besitzen. Es wird immer deutlicher, daß Chemokine eine wichtige Rolle bei Gehirnerkrankungen wie MS, AIDS, Gehirntumoren, Schlaganfall und Gehirntrauma spielen. Chemokine bewirken eine Infiltration von Leukozyten in das geschädigte Gehirn. Weiterhin beeinflussen sie den Aktivierungsprozess der intrinsischen Immunzellen des Gehirns, das heißt der Mikroglia und Astrozyten.

Auch für das humane System gibt es Hinweise, daß der Chemokinrezeptor CXCR3 während Gehirnerkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Goldberg et al., 2001). Die Expression von CXCR3 in Purkinje Neuronen des Kleinhirns und in Astrozyten aller Gehirnregionen konnte unter nicht pathologischen Bedingungen gefunden werden. Weiterhin wurde CXCR3 in Mikroglia und Oligodendrozyten nachgewiesen (Goldberg et al., 2001). Die Aktivierung dieses Rezeptors in humanen Mikrogliazellen führte zur Migration (Biber et al., 2002). Die Zahl von CXCR3-positiven Astrozyten stieg in HIV-positiven Patienten im Vergleich zu nichtinfizierten Patienten. Weitere Studien sind notwendig, um die Funktion des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu klären.

Durch die Verwendung von Antikörper gegen CCL3 konnte der Beginn einer EAE verhindert werden, und Antikörper gegen CCL2 bewirkte eine Verbesserung in dem weiteren Verlauf dieser Krankheit in Mäusen (Karpus & Ransohoff, 1998). Untersuchungen an Rezeptor-Knockout Mäusen bestätigten die Funktion von CCL3 und CCL2 in der EAE (Fife et al., 2000; Rottman et al., 2000). Der Ausbruch der Krankheit

wurde entweder verhindert oder aber der Verlauf abgeschwächt. Die Produktion von CXCL10 im ZNS korreliert mit der Entwicklung von klinischen Erkrankungen. Antikörper gegen CXCL10 bewirkten eine Abnahme in dem klinischen und histologischen Erkrankungsbild der EAE (Fife et al., 2001). Obwohl das Chemokinsystem redundant ist, zeigen diese Ergebnisse, wie spezifisch sie wirken können. Durch die therapeutische Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen diese Chemokine oder deren Rezeptoren ist es vielleicht in der Zukunft möglich, den Krankheitsverlauf von Gehirnerkrankungen positiv zu beeinflussen.