

Aus der Klinik für Neuropathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Repopulations-Phänomen –  
Austausch ortständiger Mikrogliazellen mit peripher rekrutierten  
myeloischen Zellen am HSVTK-Mausmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Sebastian Hendrik von Büren  
aus Heidelberg

Datum der Promotion: .....02.03.2018.....

Für meine Tante

Ramona Bienlein

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>7</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>11</b>
2.1 Mikrogliazellen.....	11
2.2 Herkunft der Mikrogliazellen und deren Interaktion mit zirkulierenden Monozyten.....	11
2.3 Durchtritt peripherer Monozyten durch die Blut-Hirn-Schranke im Kontext der letalen Hirnbestrahlung.....	12
2.4 Die Alzheimersche Erkrankung.....	13
2.5 Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher rekrutierten myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie.....	14
2.6 HSVTK-Tiermodell zur Untersuchung der Mikrogliafunktion und von peripher rekrutierten myeloischen Zellen.....	15
2.7 Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
3.1 Verwendete Geräte und Software.....	18
3.2 Tierexperimentelles Material und Methoden.....	19
3.2.1 Haltung.....	19
3.2.2 Erzeugung von Knochenmark-Chimären.....	19
3.2.3 Intracerebroventrikuläre Gabe von Ganciclovir.....	21
3.2.4 Transkardiale Perfusion.....	22
3.3 Histologie – Material und Methoden.....	22
3.3.1 Organentnahme und -fixierung.....	22
3.3.2 Herstellung von Gefrierschnitten.....	23
3.3.3 Immunhistochemie.....	24
3.3.4 Aufnahmen mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern Iba-1/GFP.....	25
3.3.5 Kongorot-Färbung nach Puchtler.....	26
3.3.6 Stereologische Analyse von Iba-1 und GFP positiven Zellen.....	27
3.3.7 Morphometrische Analyse der in Kongorot bedeckten Fläche.....	27
3.4 Experimentelles Design und Gruppenübersicht.....	28
3.4.1 Versuchsabläufe der nicht rekonstituierten Mausmodelle.....	28
3.4.2 Versuchsabläufe der rekonstituierten Mausmodelle.....	29
3.4.3 Versuchsabläufe des Alzheimer-Mausmodells.....	32
3.5 Statistik.....	33
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
4.1 Mikrogliazelldepletion gefolgt von Repopulation Iba-1+ Zellen.....	34

4.2	Repopulations-Phänomen – Austausch ortständiger Mikroglia mit peripher rekrutierten myeloischen Zellen.....	37
4.2.1	Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen .....	37
4.2.2	Repopulations-Phänomen in Abwesenheit des CCL2/CCR2-Signalweges.....	48
4.2.3	Einfluss von Chimärismus und CCR2-Defizienz auf den Repopulationsprozess .....	52
4.2.4	Repopulation des ZNS bei kontinuierlicher GCV-Behandlung ..	54
4.3	Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher einwandernden myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell .....	57
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>60</b>
5.1	Mikrogliazelldepletion gefolgt von Repopulation Iba-1+ Zellen.....	60
5.2	Repopulations-Phänomen – Austausch ortständiger Mikroglia mit peripher rekrutierten myeloischen Zellen.....	62
5.2.1	Herkunft der wiederbesiedelten Iba-1+ Zellen bei nicht rekonstituierten Mäusen.....	65
5.2.2	Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen .....	67
5.2.3	Einfluss des CCL2/CCR2-Signalweges und des Chimärismus auf den zeitlichen Verlauf des Repopulationsprozesses.....	68
5.3	Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher einwandernden myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell .....	71
5.4	Limitationen und methodische Einschränkungen .....	73
5.5	Ausblick.....	74
<b>6.</b>	<b>VERZEICHNISSE.....</b>	<b>76</b>
6.1	Literaturverzeichnis .....	76
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	84
6.3	Tabellenverzeichnis .....	85
<b>7.</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>89</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A $\beta$	A-beta
Abb	Abbildung
AD	Abkürzg engl. <i>Alzheimer's disease</i>
AK	Antikörper
AP	Anterior-posterior
APP	Abkürzg engl. <i>Amyloid-Precursor-Protein</i>
APPPS1	Alzheimermäuse mit APP- (schwedische Mutation) und mit PSEN1- Mutation (L166P Mutation)
BHS ( <i>BBB</i> )	Blut-Hirn-Schranke engl. <i>blood-brain barrier</i>
C57/BL6	Charles River 57/Black 6
°C	Celcius
CCL2	Abkürzg engl. <i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCR2	Abkürzg engl. <i>Chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
CD	Abkürzg engl. <i>cluster of differentiation</i>
cGy	<i>Centigray</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<sup>137</sup> Cs	radioaktives Isotop Caesium
<sup>137</sup> Cs-Quelle	Gamma-Strahlenquelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dest.	Destillata
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Donor	Spender
DV	Dorso-ventral
E	Embryonaler Tag nach Fecundatio
EAD	Abkürzg engl. <i>Early onset Alzheimer disease</i>
EMP	Erythromyeloide Vorläuferzelle (Abkürzg engl. <i>Erythromyeloide Progenitorzelle</i> )
FAD	Abkürzg engl. <i>Familial Alzheimer disease</i>
g	Gramm
GCV	Ganciclovir
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (Abkürzg engl. <i>green fluorescent protein</i> )
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
Gy	<i>Gray</i>
h	Stunde
HSCs	Hämatopoetische Stammzellen (Abkürzg engl. <i>hematopoietic stem cells</i> )
HSVTK	Abkürzg engl. <i>Herpes simplex virus Thymidine Kinase</i> (engl.)
HSVTK+/-	TK
HSVTK-/-	wt
Iba-1	Abkürzg engl. <i>Ionized calcium binding adapter molecule 1</i>
icv	Intracerebroventrikulär (Abkürzg engl. <i>intracerebroventricular</i> )
kg	Kilogramm
l	Liter
LOAD	Abkürzg engl. <i>Late onset Alzheimer disease</i>
M	Molar (mol/l)
MCP-1	Abkürzg engl. <i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
mg	Milligramm

ml	Milliliter
min	Minute
µl	Microliter
µm	Micrometer
MNC	Mononukleare Zelle
myb	Abkürzg engl. <i>Myeloblastosis</i> (Transkriptionsfaktor; wichtige Rolle in der Hämatopoese und Tumorgenese)
NaCl	Natriumchlorid
ns	nicht signifikant
NZS	Normales Ziegen Serum
PBS	Abkürzg engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
%	Prozent
PSEN1	Presenelin 1
PSEN2	Presenelin 2
PU.1	Transkriptionsfaktor; wichtig in der Genexpression während der Entwicklung von myeloiden Zellen und B-Lymphozyten
PU.1 <sup>-/-</sup> -Maus	Knockout-Maus, bei der PU.1 deaktiviert wurde
RUNX1	Transkriptionsfaktor; reguliert Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in reife Blutzellen
Tab	Tabelle
Tie2	Abkürzg engl. <i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like &amp; EGF-like domains 2</i>
Trem2	Abkürzg engl. <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
TYROBP(DAP12)	Abkürzg engl. <i>TYRO protein tyrosine kinase binding protein</i> (Adapter-Protein)
wt	Abkürzg engl. <i>Wildtype</i>
ZNS (CNS)	Zentrales Nervensystem (engl. <i>central nervous system</i> )

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund/Ziel:** Unter physiologischen Bedingungen stellen Mikrogliazellen eine sich langsam selbstreplizierende Zellpopulation dar, die weitestgehend unabhängig von äußeren Einflüssen ihren Bestand aufrechterhält. Bei bestimmten Pathologien können monozytäre Zellen die BHS durchtreten und an einer neuroimmunologischen Antwort mitwirken. Beispielsweise tragen periphere Immunzellen zur Pathologie der Multiplen Sklerose bei. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimerschen, können monozytäre Zellen aufgrund einer defekten BHS ins Gehirn eindringen. Die pathophysiologische Rolle dieser ins Gehirn einwandernden Zellen ist allerdings nicht detailliert erforscht.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der CD11b-HSVTK-Maus die Mikrogliazelldepletion zu etablieren, um den Vorgang der sich anschließenden Wiederbesiedlung des Gehirns genauer zu untersuchen. Anschließend wird die Anwendbarkeit dieser neuartigen Methode zum Studium von ZNS-Pathologien aufgezeigt. Dafür untersuchen wir den Einfluss dieses Eingriffs in die Mikrogliaphysiologie auf die cerebrale Amyloid-Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell.

**Methoden:** Die 10tägige intracerebroventrikuläre Ganciclovir (GCV)-Gabe („Depletion“) mit sich anschließender zweiwöchiger Unterbrechung („Repopulation“) wurde bei CD11b-HSVTK-Mäusen etabliert. Ferner wurde das Knochenmark von HSVTK-Mäusen durch Knochenmark von actin-eGFP+-Mäusen ersetzt. Die Knochenmark-Chimären wurden in Gruppen entsprechend ihrer GCV-Behandlungs-Protokolle mit anschließender Tötung eingeteilt:

- 10tägige Gabe; („Depletion“)
- 10tägige Gabe, 14tägige Behandlungsunterbrechung; („Repopulation“)
- 10tägige Gabe, 50tägige Behandlungsunterbrechung; („Langfristige Repopulation“)

Zuletzt wurden APPPS1-HSVTK-Mäuse Gruppen zugewiesen, um folgendermaßen mit GCV behandelt zu werden: „Depletion“; „Repopulation.“

Hirngewebe wurde immunhistochemisch angefärbt und stereologisch quantifiziert.

**Ergebnisse:** Ortständige Mikrogliazellen sind nach 10tägiger GCV-Gabe bei HSVTK+/- (TK)-Mäusen zu 70 % depletiert. Danach erfolgt die ZNS-Repopulation Iba-1+ wiederbesiedelnder Zellen, indem die GCV-Behandlung für zwei Wochen unterbrochen wird (90%ige Zunahme Iba-1+ Zellen, verglichen mit Kontrollmäusen). Diese wiederbesiedelten Zellen weisen einen monozytären Phänotyp auf.

Um die Herkunft wiederbesiedelter Zellen zu untersuchen, werden HSVTK-Tiere mit GFP-exprimierenden Knochenmarkszellen rekonstituiert und mit dem GCV-„Repopulations“-Protokoll behandelt. Die stereologische Analyse markiert eine 88%ige Erhöhung Iba-1+ Zellen bei rekonstituierten TK- verglichen mit wt-Mäusen. Zudem sind bei rekonstituierten TK-Mäusen annähernd alle Iba-1+ Zellen, auch GFP+, was die periphere Herkunft dieser Zellen verdeutlicht. Ferner verändert sich die Morphologie eingewanderter Zellen: der zu Wiederbesiedlungsbeginn monozytäre Phänotyp gleicht sich nach längerfristiger, 50tägiger ZNS-Anwesenheit der Mikrogliazellmorphologie an.

Auch werden APPPS1-TK-Mäuse mit dem GCV-„Depletions“ und „Repopulations“-Protokoll behandelt. Bei der Kongorot bedeckten Fläche zeigt sich kein signifikanter Unterschied an APPPS1-TK-Mäusen, versus Kontrollen in den zwei Gruppen.

**Schlussfolgerung:** Mit Hilfe der CD11b-HSVTK-Maus wird das endogene Immunsystem des Säugergehirns ausgetauscht: Unterbrechung der Ganciclovir-Behandlung führt nach Mikrogliazelldepletion zur ZNS-Wiederbesiedlung durch peripher rekrutierte myeloische Zellen. Allein die Existenz des sogenannten Repopulations-Phänomens verdeutlicht, wie essentiell Mikrogliazellen im Gehirnmilieu des Tieres sind. Diese neuartige Methode kann beispielsweise verwendet werden, um zu untersuchen, ob sich von peripher rekrutierte myeloische Zellen und Mikrogliazellen in ihrer Fähigkeit unterscheiden, A $\beta$ -Plaques im Alzheimer-Mausmodell zu beseitigen.



## ABSTRACT

**Introduction:** Under normal physiological conditions, the microglia population is maintained by self-replication of existing cells independent of external influences. Certain diseases are characterized by monocyte recruitment into the CNS. For instance, peripheral cells contribute to the pathology in MS. Also in neurodegenerative diseases, e.g. AD, circulating monocytes enter the CNS due to BBB defects. The impact of peripheral macrophages on many disease states remains unknown.

The aim of this study is to establish microglia depletion in order to further investigate the subsequent repopulation of the brain with peripherally-derived myeloid cells utilizing CD11b-HSVTK-mice. Subsequently we show the applicability of this novel experimental method by examining the impact of peripherally-derived macrophages on cerebral A $\beta$  plaque load in an AD mouse model.

**Methods:** Intracerebroventricular delivery of GCV to HSVTK-mice for 10d (“depletion”), following cessation of GCV-treatment for 14d (“repopulation”) was established. HSVTK-bone marrow chimeras harboring GFP+ bone marrow were randomly divided into groups regarding GCV-treatment and subsequent sacrifice:

- 10d GCV-treatment; “depletion”
- 10d GCV-treatment, 14d cessation of treatment; “repopulation”
- 10d GCV-treatment, 50d cessation of treatment; “long-term repopulation”

APPPS1-HSVTK-mice were treated with identical “depletion”/ “repopulation”-protocols.

Brain tissues were stained with immunohistochemistry and stereologically quantified.

**Results:** After 10d of GCV-treatment 70 % of resident microglia were depleted in HSVTK+/- (TK)-mice. Cessation of GCV-treatment for 14d resulted in repopulation of the microglia-depleted CNS with Iba-1+ repopulating cells that were 90 % more numerous than in identically treated *wt*-control-mice. The repopulating cells displayed a distinct morphologic phenotype, characteristic of macrophages.

In order to investigate the source of repopulating cells HSVTK-bone marrow chimeras harboring GFP<sup>+</sup> bone marrow were treated with the GCV-“repopulation”-protocol. Iba-1<sup>+</sup> cells were 88 % more numerous in TK-mice than in identically treated wt-control-mice. In contrast to identically treated controls nearly all Iba-1<sup>+</sup> cells were also GFP<sup>+</sup> in TK-mice, underscoring the peripheral source of repopulating cells. The distinct monocyte phenotype of freshly invaded cells adopted a more “microglia-like” morphology in TK-mice treated with the “long-term repopulation”-protocol.

Morphometric quantification of the congo red covered area did not reveal any significant difference in APPPS1-TK-mice versus identically treated controls in all treatment-groups.

**Conclusion:** This work describes the exchange of the endogenous immune system in the mammalian brain: following cessation of GCV-treatment, peripheral myeloid cells rapidly repopulate the CNS after depletion of resident microglia in CD11b-HSVTK-mice. The existence of this repopulation-phenomenon underlines the crucial importance of microglia within the brain environment. For instance, this novel method can be used to examine, if microglia versus peripheral myeloid cells differ in their capability to clear A $\beta$  plaque load in an AD mouse model.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Mikrogliazellen

Mikrogliazellen sind die ortsansässige Makrophagenpopulation des ZNS [1-3] und nehmen als solche eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Homöostase des Gehirns ein [4]. Mikrogliazellen bilden als sogenannte Gehirnmakrophagen den wesentlichen Teil des ortständigen Immunsystems des ZNS, dessen Funktionen durch sie koordiniert werden [5]. Sie befinden sich im Parenchym und in perivaskulären Zwischenräumen, um ständig mit ihren weit ausgebreiteten Zytoplasmafortsätzen das Milieu des umgebenden ZNS-Gewebes zu überwachen [6, 7]. Mikrogliazellen reagieren auf Veränderungen der Homöostase des ZNS-Milieus mit Zeichen der zellulären Aktivierung, wie typischen Modulationen der Zellmorphologie, der Zelloberflächenproteine und der Interaktionen mit anderen Immunzellen, sowie der Zellproliferation [8]. Sowohl ausgeprägte als auch subtile pathologische Reize bewirken eine Aktivierung der Mikrogliazellen [6].

### 2.2 Herkunft der Mikrogliazellen und deren Interaktion mit zirkulierenden Monozyten

Lange ist irrtümlich von einer gemeinsamen, hämatopoetischen Herkunft mit zirkulierenden Monozyten ausgegangen worden. Im Zentralen Nervensystem ansässige Mikroglia stellen jedoch eine eigenständige Zellpopulation dar. Während die meisten hämatopoetischen Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen, stammen Mikrogliazellen von Myb\*-unabhängigen, PU.1<sup>†</sup>-abhängigen Vorläuferzellen im extraembryonalen Dottersack ab und besiedeln bei Mäusen das sich entwickelnde Gehirn um den embryonalen Tag 8.5 (E8.5) [12, 13]. Gerade erst kürzlich ist gezeigt worden, dass Gewebemakrophagen des Gehirns, der Leber, der Lunge und der Haut eine gemeinsame Herkunft haben und von Tie2-

---

\* Myb ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) eine wichtige Rolle einnimmt; entdeckt worden ist Myb an Orten der HSCs-Entstehung in der aortogonadalenmesonephrischen Region (AGM) [9, 10].

† PU.1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Mikroglialgenese im extraembryonalen Dottersack eine wichtige Rolle einnimmt [11].

exprimierenden erythromyeloiden Vorläuferzellen (EMP) herrühren [14]. Passend dazu sind Mikroglia langlebige Zellen, dessen Populationsgröße im Wesentlichen durch Selbstvervielfältigung ortständiger Zellen erhalten wird [2, 15]. Im Gegensatz zu peripheren Monozyten und Makrophagen haben ortständige Mikrogliazellen einen vergleichsweise geringen Umsatz (engl. „turnover“) [16, 17]. Es wird davon ausgegangen, dass Monozyten unter physiologischen Bedingungen eine intakte Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, um ins gesunde Parenchym einzudringen [15, 18]. Wichtig ist jedoch die Erkenntnis, dass unter bestimmten pathologischen Bedingungen zirkulierende Monozyten ins Zentrale Nervensystem einbrechen können und damit zu einer neuroimmunologischen Antwort beitragen können [19]. Dieser Vorgang geschieht abhängig vom CCL2/CCR2-Signalweg [18, 20]. In einem Autoimmun-Enzephalitis-Mausmodell ist z. B. beschrieben worden, dass aus dem Blut stammende Myelomonozyten aktiv das Gehirn besiedeln. Interessanterweise bleiben diese Zellen jedoch, nachdem die Verletzung abgeklungen ist, nicht im ZNS, um dauerhaft zum Mikroglia-pool beizutragen [21]. Zusammenfassend kann also die Anwesenheit von aus der Peripherie stammenden Knochenmarksmakrophagen im Gehirn als eine vorübergehende Gewebereaktion auf unterschiedlichste Arten von Entzündungen und/oder Verletzungen beschrieben werden, die unter physiologischen Bedingungen nicht stattfindet.

### **2.3 Durchtritt peripherer Monozyten durch die Blut-Hirn-Schranke im Kontext der letalen Hirnbestrahlung**

Letale Hirnbestrahlungen können die Integrität der Blut-Hirn-Schranke erheblich beeinträchtigen [22, 23]. Diese These wird insbesondere dadurch gestützt, dass ein Helmschutz der Empfängertiere während der Myeloablation den Durchtritt von Mikroglia-vorläuferzellen durch die BHS bei einer Knochenmarkstransplantation verhindern kann [18]. Obwohl also eine letale Hirnbestrahlung benötigt wird, damit Donor-Zellen in das ZNS eintreten können, genügt sie allein nicht, diesen Prozess auszulösen: Auch die Sammlung von Knochenmark mittels Durchspülung oder Zerstörung des Donor-Knochens und anschließendes Injizieren in die Blutzirkulation wird in Verbindung mit der Bestrahlung benötigt, damit sich eindringende Zellen im ZNS verankern können [15]. Was die monozytäre Infiltration in einem Autoimmun-Enzephalitis-Mausmodell unter Verwendung der neuartigen Parabiose-Technik anbelangt, so kann bei ihr auf die Gewinnung von Knochenmark mit anschließender Injektion verzichtet werden; es handelt sich in diesem Fall um eine

vorübergehende Besiedlung des ZNS durch periphere Zellen, ohne langfristige Beteiligung am Mikrogliabestand [21]. Im Gegensatz dazu beteiligen sich periphere Zellen im Kontext einer klassischen Knochenmarkstransplantation dauerhaft am Mikroglia-pool. Dies ist wohl auf die Injektion von undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen in den Blutkreislauf des Empfängertieres zurückzuführen; sie werden bei der Gewinnung des Knochenmarks zwangsweise herausgespült [16, 21].

## 2.4 Die Alzheimersche Erkrankung

Von der Alzheimerschen Erkrankung sind momentan weltweit 35 Millionen Menschen betroffen. Damit ist die Erkrankung die häufigste Ursache von mit Neurodegeneration assoziierter Demenz [24]. Fortschreitendes Alter ist der wichtigste Risikofaktor: Während im Alter von 65-69 Jahren erst ungefähr 1% der Bevölkerung betroffen ist, sind es im Alter von 90 Jahren und älter bereits 30-40% [25, 26]. Die Prävalenz der Erkrankung erhöht sich also exponentiell mit dem Alter [27]. Stadien spezifische Aggregation von A-beta [28] und neurofibrillären Tangles [29] sind die pathologischen Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung. Neurotoxische A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> Peptide, die durch die von  $\beta$ -Sekretasen und  $\gamma$ -Sekretasen durchgeführten, aufeinander folgenden proteolytischen Spaltungen des transmembranen Amyloid-Precursor-Proteins (APP) entstehen, akkumulieren und formen lösliche Oligomere, die über Zeit aggregieren, um extrazelluläre, unlösliche A $\beta$  Plaques zu formen [30].

Um die Ursache der Alzheimerschen Erkrankung zu erklären, ist die vorherrschende Theorie die sogenannte Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Dieser Theorie zufolge ist ein fehlerhafter Spaltmechanismus des APP und die sich anschließende Aggregation von toxischem A $\beta$  der primäre Auslöser der Alzheimer-Pathologie [31, 32]. Die Hypothese schlägt infolgedessen vor, dass die Ablagerung von A $\beta$  Auswirkungen auf die Tau-Pathologie hat, bzw. sogar Auslöser dafür sein könnte [33, 34]. Jedoch ist aktuell noch keine molekulare Verbindung zwischen A $\beta$  und Tau-Protein bei der Alzheimer-Erkrankung *nachgewiesen*. Der Theorie zu Folge würde ja allein die Verminderung von A $\beta$  im Säugergehirn zu einer Besserung der Symptomatik führen. Viele Therapieansätze setzen auch genau dort an.

## 2.5 Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher rekrutierten myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie

Das Fortschreiten der Alzheimerschen Erkrankung verdeutlicht augenscheinlich, dass die Wirkung von Mikrogliazellen nicht ausreichend ist, um die Pathologie aufzuhalten [35]. Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Alzheimerschen, kommt es im Krankheitsverlauf zu einer ausgeprägten Mikrogliaaktivierung und schließlich auch zu einer zellulären Dysfunktion. Sie werden z. B. durch eine chronische Entzündung [36] oder auch durch A $\beta$  selbst verursacht [37]. Dies wiederum führt zu einem zellulären Alterungsprozess [38]. Zudem dürften Mikroglia assoziierte Gendefekte durch ähnliche Mechanismen für einen bestimmten Anteil der Gesamtmenge an Alzheimerpatienten verantwortlich sein. Ein spezifisch funktionaler Zelldefekt ist die Folge von Mikroglia assoziierten Mutationen. Er kann a) sowohl der primäre Auslöser der Erkrankung sein, als auch b) der sekundär bestimmende Faktor, der die existierende Pathologie verschlechtert, oder schließlich c) primärer und sekundärer Beweggrund gleichzeitig [39]. In zwei GWAS Studien sind beispielsweise Mutationen im *Trem2* Gen, das einen auf myeloischen Zellen vorkommenden Rezeptor exprimiert, als Risikofaktor für die Alzheimersche Erkrankung entdeckt worden [40, 41]. Darüber hinaus ist TYROBP/DAP12 als kodierendes Gen für das *TREM2* Adaptor-Protein eng mit der Pathophysiologie der spätmanifesten Form der AD (LOAD) verbunden [42]. In Gehirnen von Alzheimerpatienten und auch in denen entsprechender Mausmodelle werden Mikrogliazellen aktiviert und erhöhen ihre Zahl als Antwort auf Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid. Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten zur Funktion der Mikrogliazellen bei pathologischen Gehirnprozessen ist deren Rolle bei der Krankheitsentstehung und -progression der Alzheimerschen noch weitgehend unbekannt [43]. In Anlehnung an die Hypothese, wonach Mikrogliazellen im Verlauf der Alzheimerschen Erkrankung dysfunktional werden, könnten frische, peripher rekrutierte myeloische Zellen den Krankheitsverlauf verlangsamen. Bekanntlich weisen vom Knochenmark abstammende Zellen, die ins Gehirn eines Alzheimermausmodells rekrutiert worden sind, eine spezifische Immunreaktion auf A $\beta$  auf. Als Hinweis darauf enthalten diese myeloischen Zellen A $\beta$  in Lysosomen. Dies deutet darauf hin, dass diese Zellen möglicherweise effizienter in der ihnen eigenen Fähigkeit A $\beta$  Plaques zu phagozytieren sind als endogene Mikroglia [44]. Um festzustellen, ob in das ZNS einwanderende myeloische Zellen dabei helfen können, die Menge an A $\beta$  Plaques konstant zu halten, bzw. zu vermindern, haben wir und andere [45] ein experimentelles Modell entwickelt, das es uns erlaubt, fast vollständig alle im Gehirn

ortständigen Mikrogliazellen durch von peripher rekrutierte myeloische Zellen zu ersetzen. Wir haben die im Folgenden beschriebene experimentelle Herangehensweise verwendet, um das Potential von knochenmarksabstammenden Zellen zu untersuchen, A $\beta$  Plaques in Säugergehirnen zu beseitigen. Dafür haben wir die CD11b-HSVTK-Maus, mit deren Hilfe wir das endogene Immunsystem des Gehirns mit peripher rekrutierten myeloischen Zellen ersetzt haben, mit APPPS1 transgenen Mäusen gekreuzt. Dieses Alzheimer-Mausmodell ist dafür gut geeignet, da es eine robuste Amyloid Pathologie bereits im Alter von 2 Monaten entwickelt, welche von einer starken Mikrogliaaktivierung begleitet wird [46].

## **2.6 HSVTK-Tiermodell zur Untersuchung der Mikrogliafunktion und von peripher rekrutierten myeloischen Zellen**

Dem Labor von Prof. Dr. Heppner steht ein genetisch verändertes Mausmodell – die CD11b-HSVTK-Maus – zur Verfügung [47]. Diese transgene Maus exprimiert eine Herpes-simplex Virus Thymidinkinase (kodiert durch das HSVTK-Gen), das unter Kontrolle des CD11b Promotors steht. CD11b, kodiert durch das Gen *itgam*, ist die alpha Kette vom Mac-1 Integrin und wird in Zellen mit ihrer Herkunft im Knochenmark – Makrophagen und Mikrogliazellen – exprimiert. HSVTK ist ein Selbstmord-Gen, das antivirale Nukleotide – analoge Wirkstoffvorläufer, wie z.B. Ganciclovir – in eine monophosphorylierte Form überführt, welche dann von endogenen, zellulären Kinasen in ein toxisches Triphosphat transformiert wird [48]. Die HSVTK Expression macht sich vor allem in sich schnell teilenden, Ganciclovir-sensitiven Zellen bemerkbar, da der aktive Metabolit mit Thymin bei der DNA Synthese konkurriert [49, 50]. Aber auch sich nicht teilende HSVTK-positive Zellen reagieren auf Ganciclovir empfindlich – in diesem Fall kommt es wohl zu Interaktionen in der mitochondrialen DNA Synthese [51].

Mit diesem Mausmodell konnte das Labor von Prof. Dr. Heppner in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jucker (Tübingen) zeigen, dass eine nahezu vollständige Depletion von ortständigen Mikrogliazellen in genetisch veränderten Alzheimer-Mausmodellen keinen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung und den Fortbestand der pathologischen  $\beta$ -Amyloid Plaques besitzt [52]. Ganciclovir wurde hierbei auf zwei unterschiedliche Arten verabreicht – mittels systemischer Gabe im Trinkwasser und mittels intracerebroventrikulärer Injektion mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe. Die erste Möglichkeit führt zu einer ca. 30%igen Reduktion der Mikrogliazellen. Allerdings bewirkt

diese systemische Behandlung der Mäuse auch eine Depletion von CD11b-positiven Zellen im Knochenmark und im Blut; die Folge ist eine tödliche aplastische Anämie. Um dies zu vermeiden, ist eine Knochenmarkstransplantation notwendig. Mit der zweiten Methode kann eine bis zu 90%ige Depletion der ortständigen Mikrogliazellen ohne wesentliche periphere Nebenwirkungen erreicht werden. Diese Methode erlaubt es, die Rolle der Mikrogliazellen bei zahlreichen pathologischen Prozessen (z. B. Gehirntumore, Schlaganfall, Epilepsie, Neurodegeneration) zu untersuchen.

## 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Mikroglia sind eine einzigartige Zellpopulation und konstituieren das endogene Immunsystem des Gehirns. Sie besiedeln das ZNS früh in der Entwicklung, wo sie auch ein Leben lang bleiben. Unter physiologischen, krankheitsfreien Bedingungen handelt es sich um eine sich langsam selbstreplizierende Zellpopulation, die weitestgehend unabhängig von äußeren Einflüssen ihren Bestand aufrechterhält. Das Parenchym wird von ihren langen Fortsätzen überwacht. Bei bestimmten Pathologien, z. B. bei Multipler Sklerose, kommt es zu einer Aktivierung der Mikroglia. Zusätzlich können dann auch zirkulierende monozytäre Zellen die BHS überwinden und zu einer neuroimmunologischen Antwort beitragen. Bemerkenswerterweise verschwinden diese Zellen nach Abklingen einer Entzündung und/oder Verletzung wieder. Im Mausmodell sind traditionell Bestrahlungsprozeduren verwendet worden, um die Integrität der Blut-Hirn-Schranke zu beeinträchtigen. Dies ermöglicht es, die Monozyten artifiziell ins Gehirn rekrutieren und deren Einfluss auf bestimmte Pathologien erforschen zu können. Limitiert wird diese Methode nun aber durch folgendes: Die eingewanderten monozytären Zellen wandern nur in marginaler Anzahl ein und verschwinden auch schnell wieder – all das bei weiterhin bestehendem endogenem Immunsystem. Die pathophysiologische Rolle dieser neu ins Gehirn einwandernden Zellen und deren Einfluss auf ZNS-Pathologien ist daher noch nicht detailliert erforscht.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der CD11b-HSVTK-Maus die fast vollständige Depletion von Mikrogliazellen zu erreichen, um den Vorgang, der sich anschließenden Wiederbesiedlung des Gehirns, genauer untersuchen zu können:



1. Die 10tägige intracerebroventrikuläre Ganciclovir (GCV)-Gabe („Depletion“) mit sich anschließender zweiwöchiger Unterbrechung („Repopulation“) wird bei nicht rekonstituierten HSVTK-Mäusen etabliert.

2. Im gleichen Mausmodell soll die Herkunft (ob endogene versus periphere) dieses Repopulations-Phänomens eruiert werden. Dafür wird das Knochenmark von HSVTK-Mäusen mit Spenderzellen von actin-eGFP-Mäusen ersetzt. Anschließend werden die Knochenmark-Chimären in Gruppen entsprechend ihrer GCV-Behandlungs-Protokolle mit anschließender Tötung eingeteilt:

- 10tägige Gabe; („Depletion“)
- 10tägige Gabe, 14tägige Behandlungsunterbrechung; („Repopulation“)
- 10tägige Gabe, 50tägige Behandlungsunterbrechung; („Langfristige Repopulation“)

Daraufhin werden wir den Ablauf des Repopulations-Vorganges bei Knochenmark-Chimären und nicht rekonstituierten Mäusen (siehe 1.) vergleichen, sowie die morphologischen Veränderungen der wiederbesiedelten Zellen im Verlauf betrachten.

3. Die Hypothese, ob der Wiederbesiedlungsvorgang in das von Mikroglia befreite Gehirn durch den CCL2/CCR2-Signalweg explizit vermittelt wird, und weiter, um festzustellen, ob der zeitliche Repopulations-Ablauf steuerbar ist, soll geprüft werden. Dafür werden wir das Knochenmark von HSVTK-Mäusen mit CCR2-defizientem austauschen. Danach werden diese Knochenmark-Chimäre mit dem GCV- „Depletions-“ und „Repopulations-Protokoll“ behandelt.

4. Abschließend soll die Anwendbarkeit dieser neuartigen Methode zum Studium von ZNS Pathologien aufgezeigt werden. Hierzu werden wir die Auswirkung dieses Eingriffs in die Mikroglia-Physiologie auf die cerebrale Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell (APPS1-HSVTK-Mäuse) untersuchen.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Verwendete Geräte und Software

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analyse- und Feinwagen Abj	Kern
BX51 Mikroskop	Olympus microscopy
Eisbereiter	Scotsman
Fluoreszenzmikroskop; Zeiss Axio Observer Z1	Zeiss
Gefrierbox	Carl Roth
Inkubator Heraeus BBD620	Thermo Fisher Scientific
Kryostat MICROM HM 560	MICROM
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
Magnetrührer Yellowline	MS
Microskop Axiostar plus	Zeiss
Motorisierten $x$ - $y$ - $z$ Stagecontroller	Mbf Bioscience
pH Meter	Mettler – Toledo
Sicherheits-Sterilwerkbänke Hera Safe	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	Neolab
Videomikroskop System	Olympus microscopy
Vortex-Genie II	Scientific Industries
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 2: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe
AxioVision 4	Carl Zeiss
Cell Sense software	Olympus

---

Excel 2010	Microsoft®
Graphpad Prism Version 6.0	GraphPad Software
Word 2010	Microsoft®
Stereo Investigator 7	MBF Bioscience

---

## 3.2 Tierexperimentelles Material und Methoden

### 3.2.1 Haltung

Alle Mäuse wurden in einer Gruppenstärke von bis zu 6 Tieren pro Käfig unter kontrollierten, artgerechten Bedingungen (Temperatur 21–22 °C, Luftfeuchtigkeit 60 %, Lichtperiode 6–18 Uhr) gehalten. Ausnahmslos erhielten die Tiere die speziesspezifische Standarddiät sowie Leitungswasser ad libitum. Nach Ankunft wurde allen Tieren eine einwöchige Eingewöhnungszeit gewährleistet. Die Tiere wurden in einem konventionellen Tierlabor entsprechend den Bedingungen des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten, welche in Übereinstimmung mit der Tierschutzgenehmigung vom 04.08.2008, Aktenzeichen TVA G 0154/08 „Die Rolle von Mikroglia-Zellen bei entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen des Zentralnervensystems“, des Landesamts für Gesundheit und Soziales in Berlin erfolgten.

### 3.2.2 Erzeugung von Knochenmark-Chimären

Dafür wurde das Knochenmark von 6 Wochen alten CD11b-HSVTK-Mäusen [47] durch actin-eGFP<sup>+</sup> (engl. *green fluorescent protein*)-Zellen der B6-Tg(ACTbEGFP)10sb-Mäuse (Jackson Laboratories) [53] ersetzt. Gleiches wurde mit CCR2<sup>-/-</sup>-Knochenmarkszellen von CCR2-defizienten Mäusen (Jackson Laboratories) [54] durchgeführt. Die Knochenmark-Chimären wurden mit folgendem Verfahren hergestellt:

- Letale Bestrahlung – Die Empfängertiere erhielten im Mindestalter von 6 Wochen mittels einer <sup>137</sup>Cs-Quelle eine letale Ganzkörperbestrahlung mit 9,5 Gy (1x 950 cGy/10 min) im DRFZ (Berlin). Da einige Mäuse, die aufgrund technischer Gründe

nicht rekonstituierten, nach spätestens 10 Tagen verstarben, konnten wir auf eine hochgradige Myeloablation schließen.

- Knochenmark-Präparation – Die Spendertiere wurden mit Isoflurangas (Dräger) anästhesiert und dann mittels kraniozervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die Kadaver mit 70%igem Ethanol (Herbeta Arzneimittel) benetzt, um das Fell sauber zu entfernen und schließlich die Gliedmaßenknochen frei präparieren zu können. Nachdem die vorderen und hinteren Extremitäten vom Truncus abgelöst waren, wurden die Knochen (Pelvis, Femur, Tibia, Scapula, Humerus und Radius) für 2 Minuten in Ethanol (70 %) von letzten Resten Muskulatur gesäubert und danach in PBS (Biochrom AG) inkubiert. Um Zellkontaminationen zu vermeiden, wurden die folgenden Schritte unter einem Abzug in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen durchgeführt: die Enden der Epiphysen wurden mit einer Schere abgetrennt. Die Diaphysen wurden mit Hilfe einer 1 ml-Spritze (BD Biosciences) unter Verwendung einer 23 G – für größere, bzw. einer 30 G – Nadel (BD Biosciences) für kleinere Knochen mehrmals durchgespült, bis die Markhöhle makroskopisch frei von Knochenmark war. Das für die Durchspülung verwendete DMEM (Life Technologies) mitsamt Knochenmark wurde in einer Petrischale auf Eis aufgefangen und danach mit einer 1ml-Pipette (Gilson) auf- und abpipettiert, um das Lösungsmittelzellgemisch zu homogenisieren. Die daraus folgende Zellsuspension wurde, um überflüssige Knochen- und Gewebstücke sowie unauflösbare Zellaggregationen zu entfernen, nun durch ein 40 µm Zellsieb (Corning Incorporated) in ein zur Verdünnung mit DMEM gefülltes 50 ml fassendes Falcontube (BD Biosciences) gegeben. Die gewonnenen Zellen wurden bei 1.000 Umdrehungen/Minute für 7 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand über dem Pellet abpipettiert und die Zellen schließlich mit frischem DMEM resuspendiert.
- Aufbereitung der Zellen, Injektion und Nachsorge – Aus dem Falcontube wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und mittels Neubauerkammer die Zahl von kernhaltigen Zellen/µl bestimmt, um die Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen im geernteten Knochenmark zu ermitteln. Die Zellkonzentration wurde schließlich auf  $5 \times 10^6$  pro 1 ml DMEM eingestellt. Jeweils  $1 \times 10^6$  kernhaltige Zellen wurden in einem Injektionsvolumen von 200 µl DMEM langsam in die Schwanzvene einer Empfängermaus injiziert. Dafür wurden die Mäuse mit Isoflurangas (Dräger) narkotisiert und Rimadyl (Carprofen, 5 mg/kg s.c.; Pfizer) zur Schmerzbehandlung intraperitoneal injiziert. Während der Sedierung der Mäuse verhinderte eine

rückkopplungsgesteuerte Heizplatte die Auskühlung der Empfängertiere, sowie eine Bepanthen®-Augensalbe (Roche) das Austrocknen der Augen. Vor der Injektion wurden die Schwanzvenen mit einer handelsüblichen Infrarotlampe bestrahlt, um die Gefäße bedingt durch die Wärmeregulation der Tiere zu erweitern und somit die Injektion zu erleichtern. Nachdem die Zellen transplantiert waren, wurden die Tiere in unabhängig voneinander ventilierten Käfigen (mit max. 3 Tieren/Käfig) gehalten, um die Infektionsgefahr zu verringern. Autoklavierte Einstreu, Futter und Wasser in der Trinkflasche, welches mit Baytril (Enrofloxacin, p.o. 25,00 mg/ml, 1 ml in 250 ml Trinkwasser; Bayer) für 4 Wochen (wöchentlich wechselnd) versetzt war, wurden ebenfalls bereitgestellt.

- Chimären-Nachweis – Für die Immunphänotypisierung der Empfängertiere zum Chimären-Nachweis wurden vier Wochen nach Knochenmarktransplantation einige Tropfen peripheren Blutes aus der lateralen Schwanzvene entnommen und in heparinisierten Eppendorf-Röhrchen gesammelt. Definiert wurde eine erfolgreiche Rekonstitution, wenn >94 % GFP positiver Blutleukozyten per Durchflußzytometer ein Transplantateinwachsen bestätigten.

### 3.2.3 Intracerebroventrikuläre Gabe von Ganciclovir

Noch 24 h vor der Implantationsoperation wurden die osmotischen Pumpen (Alzet Model 2001, Durchflussrate 1,0 µl/h; Charles River Laboratories) mit einer aus Ganciclovir-Monosodium (Cymeven®, Hoffmann-La Roche) in eine mit PBS verdünnten 2,5 mg/ml konzentrierte Lösung gefüllt und bei 37 °C über Nacht warmgehalten. Die Mäuse wurden mit Isoflurangas anästhesiert und danach auf eine rückkopplungsgesteuerte Heizplatte gelegt und mittels eines modifizierten stereotaktischen Apparates in Position gebracht. Die Haut und das Periost der Mäuse wurden oben am Kopf entfernt, worauf hin die Pumpe subdermal in eine Tasche neben der Wirbelsäule platziert wurde. Das Bregma wurde als Orientierungspunkt genutzt, um die Kanüle (Brain Infusion Kit III 1-3 mm; Charles River Laboratories) der Pumpe +0.1mm AP, 1,0 mm lateral und 2.5mm DV davon in den rechten Seitenventrikel einzuführen und dort mittels Zahnzement (Heraeus) zu fixieren. Direkt nach der Operation haben die Mäuse einmalig Rimadyl (Caprofen, s.c. 5mg/kg; Pfizer) zur Schmerzbehandlung erhalten. Postoperativ wurden die Mäuse anschließend 5 Tage lang mit Paracetamol (Benuron-Saft; Bene) im Trinkwasser behandelt. Je nach Versuchsgruppe wurde die erste Pumpe

entweder nach 10tägiger Applikation von Ganciclovir für weitere 2 Wochen (HSVTK), bzw. für 4 Wochen (APPPS1-HSVTK) in der Maus belassen, oder aber auch nach besagter 10tägiger Ganciclovirgabe mit einer neuen Pumpe (Alzet Model 2004, Durchflussrate 0,25 µl/h; Charles River Laboratories) für weitere 2 Wochen (HSVTK), bzw. weitere 4 Wochen (APPPS1-HSVTK) nach dem gerade beschriebenen Verfahren, ersetzt. Diese Pumpenimplantationen wurden von Dr. Kelly Miller durchgeführt.

### **3.2.4 Transkardiale Perfusion**

Ein Behälter wurde mit etwas Trockeneis gefüllt, welches mit Leitungswasser befeuchtet wurde, worauf hin das CO<sub>2</sub> in die Gasphase überging. Der Behälter wurde mit einem Deckel verschlossen, nachdem das Tier hineingesetzt worden war. Sobald die Maus nicht mehr auf Schmerzreize reagierte, wurde sie entnommen und auf eine Styroporunterlage fixiert. Der Brustkorb wurde eröffnet, indem die Rippen seitlich aufgeschnitten wurden. Am noch kontrahierenden Herzen wurde eine Kanüle, die über einen Schlauch mit einer 50 ml Spritze verbunden war, im linken Ventrikel platziert. Zu Beginn der Perfusion wurde der rechte Vorhof mit einer Schere eröffnet, um das Blut aus den Gefäßen auswaschen zu können. Die Maus wurde nun mit gekühltem PBS unter konstantem Druck perfundiert. Die Effektivität der Perfusion wurde durch das Ausbleichen der Leber des Tieres überprüft.

## **3.3 Histologie – Material und Methoden**

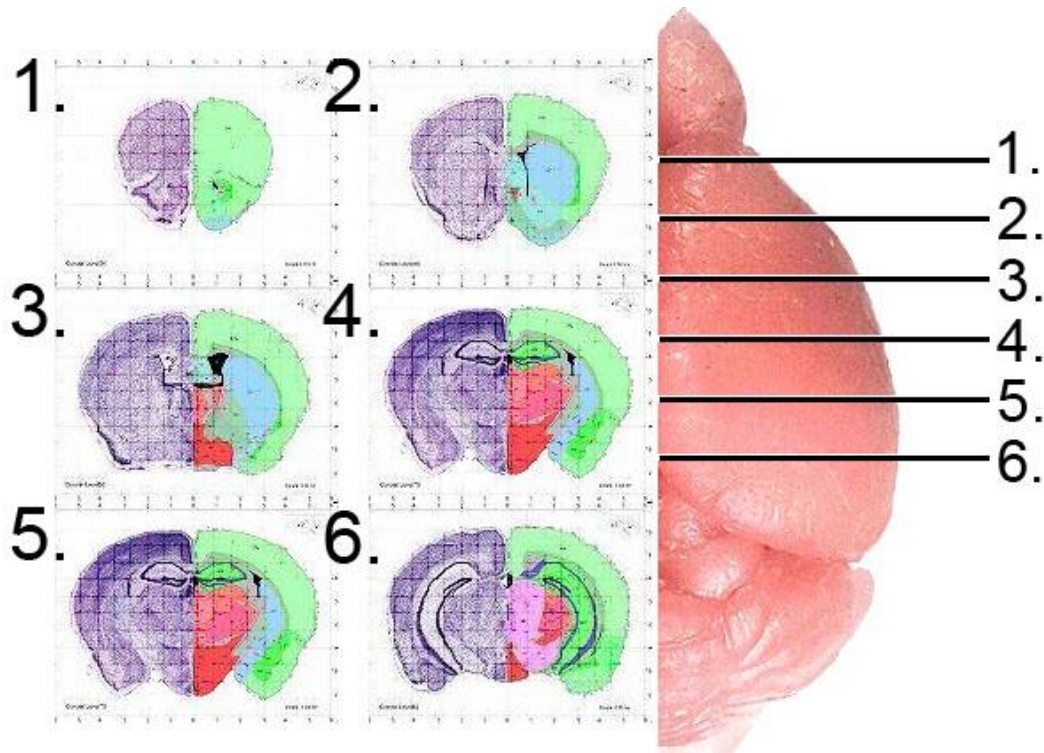
### **3.3.1 Organentnahme und -fixierung**

Nach Abschluss der Perfusion des Tieres, wurde der Schädel vom Rumpf des Kadavers abgetrennt und die Schwanzspitzen der Mäuse abgeschnitten und bei -20 °C bis zur Genotypisierung aufbewahrt. Danach wurde das Fell vom Schädel abgezogen und die Schädeldecke geöffnet. Hierzu wurden zwei seitliche Schnitte von posterior nach anterior gesetzt, um die Schädeldecke anheben und vom restlichen Schädel ablösen zu können. Nun konnte das Gehirn ohne Beschädigung entnommen werden. Anschließend wurde das Organ zur histologischen und molekularbiologischen Weiterverarbeitung in Zwei geteilt. Die kontralateral zur Injektionsstelle der Pumpe liegende Hälfte des Organs wurde auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zur späteren molekularbiologischen Analyse

aufbewahrt. Die ipsilateral zur Injektionsstelle der Pumpe liegende Hirnhälfte wurde bei 4 °C in 4 %iger PFA-Lösung (Herbeta Arzneimittel) für 24 Stunden nachfixiert und bis zur weiteren histologischen Weiterverarbeitung in 30 %ige Sucroslösung (30 g Sucrose, 100 ml Wasser; Sigma-Aldrich) zur Entwässerung bei gleicher Temperatur inkubiert, bis das Organ auf den Boden abgesunken war.

### 3.3.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Das Schneiden der perfundierten Gehirne in freischwimmende Gewebeschnitte (engl. „*free floating sections*“) wurde am Mikrotom (Kryostat) durchgeführt. Dafür wurden der Bulbus olfactorius und das Cerebellum abgetrennt und die Gehirnhälfte in OCT (Tissue-Tek; Thermo Scientific) bei einer Kammertemperatur von -25 °C und einer Objekttemperatur von -23 °C im Kryostat eingefroren und schließlich in 30 µm dicke, koronare Scheiben geschnitten. Jedes Gehirn wurde in 6 Schritte mit je 12 Schnittebenen unterteilt (siehe Abb. 1). Zwischen jedem Schritt wurden 10 Gewebeschnitte verworfen (ca. 300 µm). Die Schnitte wurden in Kryoprotektivum (28 % Ethylenglycol, 23 % Glycerin, 0.01 M Phosphatpuffer) in 24-Loch Zellkulturschalen (BD Biosciences) gesammelt und bis zur immunhistochemischen Analyse bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.



**Abbildung 1: Herstellung von Gefrierschnitten**

Jedes Gehirn wurde in 6 Schritte mit je 12 Schnittebenen unterteilt. Die Schnitte waren 30 µm dicke, koronare Scheiben. Zwischen jedem Schritt wurden 10 Gewebsschnitte verworfen (ca. 300 µm).

### 3.3.3 Immunhistochemie

Eine Reihe an immunhistochemischen Studien haben Iba-1 (engl. „*ionized calcium binding adapter molecule 1*“) als Marker verwendet,

Mikrogliazellen anzufärben [55-57]. Iba-1 ist ein Zelloberflächenprotein auf Mikroglia. Daher kann die Iba-1 Färbung zur Quantifizierung dieser Zellen genutzt werden [58, 59].

Bei der gekoppelten Immunhistochemie wurde zur selektiven Anfärbung der Mikrogliazellen als primärer Antikörper (AK) der polyklonale AK Iba-1 (Wako Pure Chemical Industries) benutzt. Die Iba-1 Färbung wurde mittels freischwimmender Schnitte („*free floating sections*“) in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen durchgeführt. Zuerst wurde das Kryoprotektivum entfernt. Dann wurden die Gewebeschnitte zweimal mit PBS-Lösung gewaschen und mit 10 % normalem Ziegenserum (Invitrogen) mit einem Zusatz von 0.3 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungen blockiert. Nächstfolgend wurde das Gewebe mit dem primären,



polyklonalen, Kaninchen-anti-Iba-1-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:500 (0.3 % Triton X-100; 5 % Ziegen Serum in PBS) über Nacht bei 4 °C behandelt. Am nächsten Morgen wurde das Gewebe dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem sekundären, Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper (Dinova), verdünnt auf 1:100 (0.3 % Triton X-100; 5 % Ziegen Serum in PBS), für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde die Immunoreaktivität mit dem REALTM EnVisionTM Detection System (Dako) sichtbar gemacht. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase reduziert das Substrat Wasserstoffperoxid; die dabei entstehenden Protonen oxidieren das farblose DAB (3,3'- Diaminobenzidin) unter Bildung von Wasser zu einem braunen Endprodukt. Danach wurden die Gewebsschnitte auf Objektträgern (R. Langenbrinck) aufgezogen, dann entwässert und schließlich eine Hämatoxylin-Gegenfärbung entsprechend Standardverfahren im Labor durchgeführt. Dieses Prozedere wurde unter anderem an Act.-GFP>TK-/wt-Tieren durchgeführt, zusätzlich wurden Gewebeschritte von diesen Mäusen mit einem primären, polyklonalen Kaninchen anti-GFP-Antikörper (Abcam) nach identischem Protokoll mit unterschiedlichen Konzentrationen von Primär- und Sekundärantikörpern (siehe Tab. 3 + 4) durchgeführt.

**Tabelle 3: Verdünnung der Primärantikörper**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Herkunftspezies</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Iba-1	Kaninchen	1:500
Anti-GFP	Kaninchen	1:2000

**Tabelle 4: Verdünnung der Sekundärantikörper**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Herkunftspezies</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Kaninchen	Ziege	1:100
Anti-Kaninchen	Ziege	1:200

### 3.3.4 Aufnahmen mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern Iba-1/GFP

Das Kryoprotektivum wurde entfernt, um anschließend die Gewebsschnitte dreimal mit PBS-Lösung für jeweils 10 min zu waschen. Die Schnitte wurden danach mit 10 % normalem Ziegen Serum (NZS) mit einem Zusatz von 0.3 % Triton X-100 in PBS (PBS-T) für eine

Stunde bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungen blockiert. Der primäre Antikörper (Kaninchen-anti-Iba-1; 1:500 in 5 % NZS in 0.3 % PBS-T) wurde über das Wochenende bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder dreimal mit PBS-Lösung für jeweils 10 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Ziegen-anti-Kaninchen 568 [abcam]; 1:300 in 5 % NZS in 0.3 % PBS-T) wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige AK wurde mit PBS gewaschen und in einem letzten Schritt mit IS Mounting Medium (4',6-Diamidin-2-phenylindol [DAPI] zur Zellkernfärbung enthalten) eingedeckelt. GFP+ Zellen an GFP>TK-/wt-Tieren mussten aufgrund ihrer Autofluoreszenz nicht angefärbt werden. Bilder mit doppelter Fluoreszenz wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer 10× Linse aufgenommen.

### 3.3.5 Kongorot-Färbung nach Puchtler

Zu Beginn wurden die in Kryoprotektivum aufbewahrten Gewebeschnitte dreimal mit PBS gewaschen, danach auf einen Objektträger aufgezogen und für eine 1/4 Stunde getrocknet. Nach 5 Minuten Inkubation in gereiftem Hämalaun (Merck KGaA), wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült und in Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Anschließend erfolgte eine 20minütige Vorinkubation in einer frisch zubereiteten alkalischen NaCl-Lösung (Stammlösung I). Daraufhin wurden die Gewebeschnitte für 45 Minuten mit frisch zubereiteter Kongorotlösung (Stammlösung II) gefärbt. Letztlich erfolgte die Entwässerung in vier Portionen Alkohol (80 %, 96 %, 2 x 100 %) und zuletzt in Xylol (Roth), ehe abschließend die Schnitte mit *Coverslips* (24x46 mm, 24x50 mm; R. Langenbrinck) eingedeckelt wurden.

- Stammlösung I

Mit NaCl aufgesättigter 80%iger Ethanol-Lösung wurde vor Gebrauch 1%ige NaOH-Lösung zugegeben.

- Stammlösung II

0,6 g Kongorot (Roth) wurde mit 100ml Stammlösung I vermischt. Anschließend wurde die resultierende Stammlösung II gefiltert und ihr vor Gebrauch 1%ige NaOH-Lösung zugegeben.

### 3.3.6 Stereologische Analyse von Iba-1 und GFP positiven Zellen

Um die mit Iba-1, bzw. GFP gefärbten Zellen im Kortex der 30 µm dicken Gewebeschnitte zu quantifizieren, wurden jeweils 2 gleichweit entfernte Gewebeschnitte pro Schritt - für gesamt 6 davon - ausgewertet, wodurch pro Gehirn kumulativ 12 Schnittebenen in gleichem Abstand voneinander analysiert wurden (siehe Abb. 1). Die Analyse wurde mit Hilfe eines BX51 Mikroskops und mittels eines computerkontrollierten motorisierten *x-y-z* Stagecontrollers, gekoppelt mit einem Videomikroskop-System sowie mit dem Programm „Stereo Investigator“ im Modus „Optical Fractionator“, durchgeführt. Zuerst wurde die zu quantifizierende Region, also der Neokortex der ipsilateral zur Injektionsstelle der Pumpe liegenden Hirnhemisphäre, in niedriger Vergrößerung, unter Verwendung einer 4×-Linse (0.13 N.A. Plan Apochromat) umzeichnet. Der Modus „Optical Fractionator“ ist dann in hoher Vergrößerung (60×/1.35 N.A. Plan Apochromat) mit dem dreidimensionalen Dissektor (Zählrahmen 85x85 µm, Dissektorhöhe 10 µm) zur Analyse genutzt worden. Nur Iba-1-/ GFP-positive Zellen, deren Zellkörper vollständig im Dissektorvolumen sichtbar waren, sind gezählt worden.

### 3.3.7 Morphometrische Analyse der in Kongorot bedeckten Fläche

Die morphometrische Analyse der Kongorot bedeckten Fläche an APPPS1-HSVTK-Mäusen wurde mit dem „Area Fraction Fractionator“ Methode des „Stereo Investigators“, wie bereits beschrieben, durchgeführt [60]. Jeder Gewebsschnitt wurde mit Hilfe eines BX51 Mikroskops (Olympus) mit einem computerkontrollierten motorisierten *x-y-z* Stagecontroller bei niedriger Vergrößerung angeschaut (4×/0.13 N.A. Plan Apochromat). Die zu quantifizierenden Regionen (Neokortex einer Hemisphäre) wurden mit Hilfe eines Computer-Liveimages konturiert. Die Quantifizierung der Kongorot bedeckten Fläche wurde bei hoher Vergrößerung (10×/0.3 N.A. Plan Apochromat) unter Verwendung eines Area Fractionator-Gitters durchgeführt. Der Zählrahmen wurde auf 75x75 µm, das Scan-Gitternetz auf 300 x 800 µm, und zuletzt das Cavalieri-Gitterabstand auf 5 µm festgesetzt. Die Schnitte wurden unter Zuhilfenahme des Cy3-Filters quantifiziert. Die Kongorot bedeckte Fläche wurde in Prozent zur gesamt-konturierten Fläche angegeben, wobei diese Quantifizierung an 10-12 Gewebsschnitten/Maus durchgeführt worden ist und für all diese Schnitte gemittelt wurde, um auf diese Weise die Plaque-Belastung für ein einzelnes Tier abschätzen zu können.

### 3.4 Experimentelles Design und Gruppenübersicht

Die Experimente wurden an nicht rekonstituierten HSVTK- und CCR2<sup>-/-</sup> HSVTK-Mäusen, rekonstituierten HSVTK-Mäusen und an nicht rekonstituierten APPPS1-HSVTK-Mäusen durchgeführt. An jedem der genannten Mausmodelle variierten die Versuchsabläufe, abhängig von der Dauer der Implantation der osmotischen Pumpen und damit der GCV-Behandlung. Folgende schematische Abbildungen und Tabellen ermöglichen eine Gruppenübersicht zur Darstellung der Mausmodelle, der Zeitachse der GCV-Gabe und der anschließend durchgeführten Analyse:

#### 3.4.1 Versuchsabläufe der nicht rekonstituierten Mausmodelle

Dies zeigt eine schematische Darstellung der Versuchsabläufe der nicht rekonstituierten Mausmodelle (siehe Abb. 2). Drei Monate alte HSVTK<sup>+/-</sup> (*TK*)- und HSVTK<sup>-/-</sup> (*wt*)-Mäuse wurden zufällig in verschiedene Gruppen eingeteilt und:

- nicht behandelt und getötet („keine Behandlung“),
- oder den Tieren wurde intracerebroventrikuläres GCV (2.5 mg/ml; 1 µl/h) für 10 Tage verabreicht:

anschließend wurden die Mäuse getötet („Depletion“),

oder die Pumpe entfernt und die Tiere lebten weitere 2 Wochen („Repopulation“).

Ebenfalls wurden drei Monate alte CCR2<sup>-/-</sup> HSVTK <sup>+/-</sup> (CCR2<sup>-/-</sup> TK)-Mäuse mit dem GCV-„Repopulationsprotokoll“ behandelt.

Nach transkardialer Perfusion wurden die Gehirne den Kadavern entnommen und am Mikrotom geschnitten. Die frei schwimmenden Gewebeschnitte wurden mittels Iba-1 Immunhistochemie angefärbt und stereologisch quantifiziert.

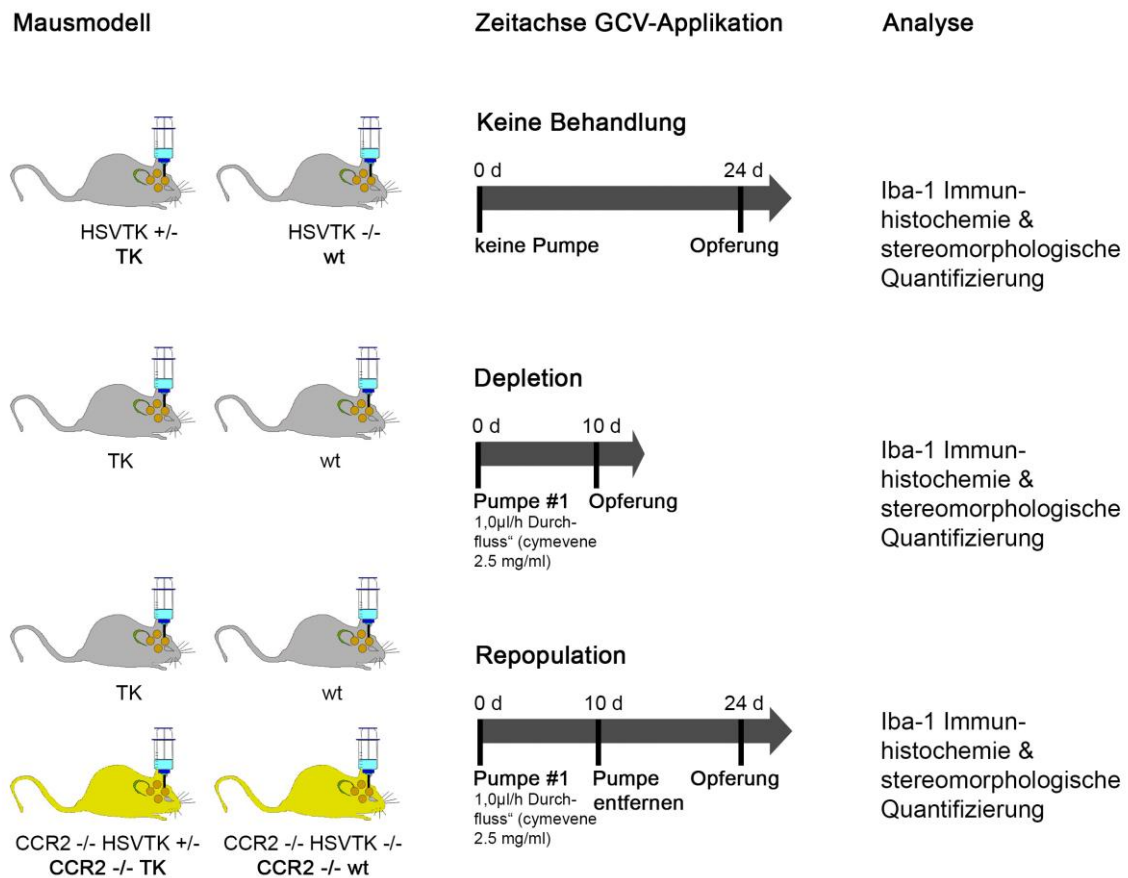


Abbildung 2: Versuchsabläufe der nicht rekonstituierten Mausmodelle

### 3.4.2 Versuchsabläufe der rekonstituierten Mausmodelle

Die schematische Darstellung der Versuchsabläufe der Chimären-Mausmodelle wird abgebildet (siehe Abb. 3). Das Knochenmark von sechs Wochen alten HSVTK<sup>+/-</sup> (*TK*)- und HSVTK<sup>-/-</sup> (*wt*)-Mäusen wurde mit Knochenmarkszellen von GFP exprimierenden Mäusen, das unter Kontrolle des  $\beta$ -Aktin Promotors steht, rekonstituiert. Als alternative Knochenmarkspender wurden CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet. Drei Monate alte rekonstituierte Act.-GFP>HSVTK<sup>+/-</sup> (*Act.-GFP>TK*)- und Act.-GFP>HSVTK<sup>-/-</sup> (*Act.-GFP>wt*)-Mäuse wurden je nach Dauer der GCV-Gabe und je nach Zeitpunkt der Tötung zufällig in verschiedene Gruppen eingeteilt:

- ohne Applikation („keine Behandlung“),

- nach 10tägiger Gabe, icv GCV-Dosierung, 2.5 mg/ml, mit hoher Durchflussrate, 1  $\mu$ l/h, („Depletion“),
- nach 10tägiger Gabe, icv GCV-Dosierung, 2.5 mg/ml, mit hoher Durchflussrate, 1  $\mu$ l/h, und 14 Tagen Behandlungsunterbrechung („Repopulation“),
- nach 10tägiger Gabe, icv GCV-Dosierung, 2.5 mg/ml, mit hoher Durchflussrate, 1  $\mu$ l/h, und nach 50 Tagen Behandlungsunterbrechung („langfristige Repopulation“),
- nach 10tägiger Gabe, icv GCV-Dosierung, 2.5 mg/ml, mit hoher Durchflussrate, 1  $\mu$ l/h, und anschließender 14tägiger Implantation einer zweiten Pumpe mit niedrigerer Durchflussrate, 0,25  $\mu$ l/h („Repopulation – kontinuierliches GCV“).

Desgleichen wurden drei Monate alte  $CCR2^{-/-} > HSVTK^{+/-}$  ( $CCR2^{-/-} > TK$ )- und  $CCR2^{-/-} > HSVTK^{-/-}$  ( $CCR2^{-/-} > wt$ )-Knochenmark-Chimäre mit dem GCV-„Depletions-“ und „Repopulations-Protokoll“ behandelt.

Nach transkardialer Perfusion wurden die Gehirne den Kadavern entnommen und am Mikrotom geschnitten. Die frei schwimmenden Gewebeschnitte wurden mittels Iba-1 – im Falle einer GFP-Knochenmark-Chimäre zudem mit GFP-Immunhistochemie angefärbt und stereologisch quantifiziert.

Mausmodell

Zeitachse GCV-Applikation

Analyse

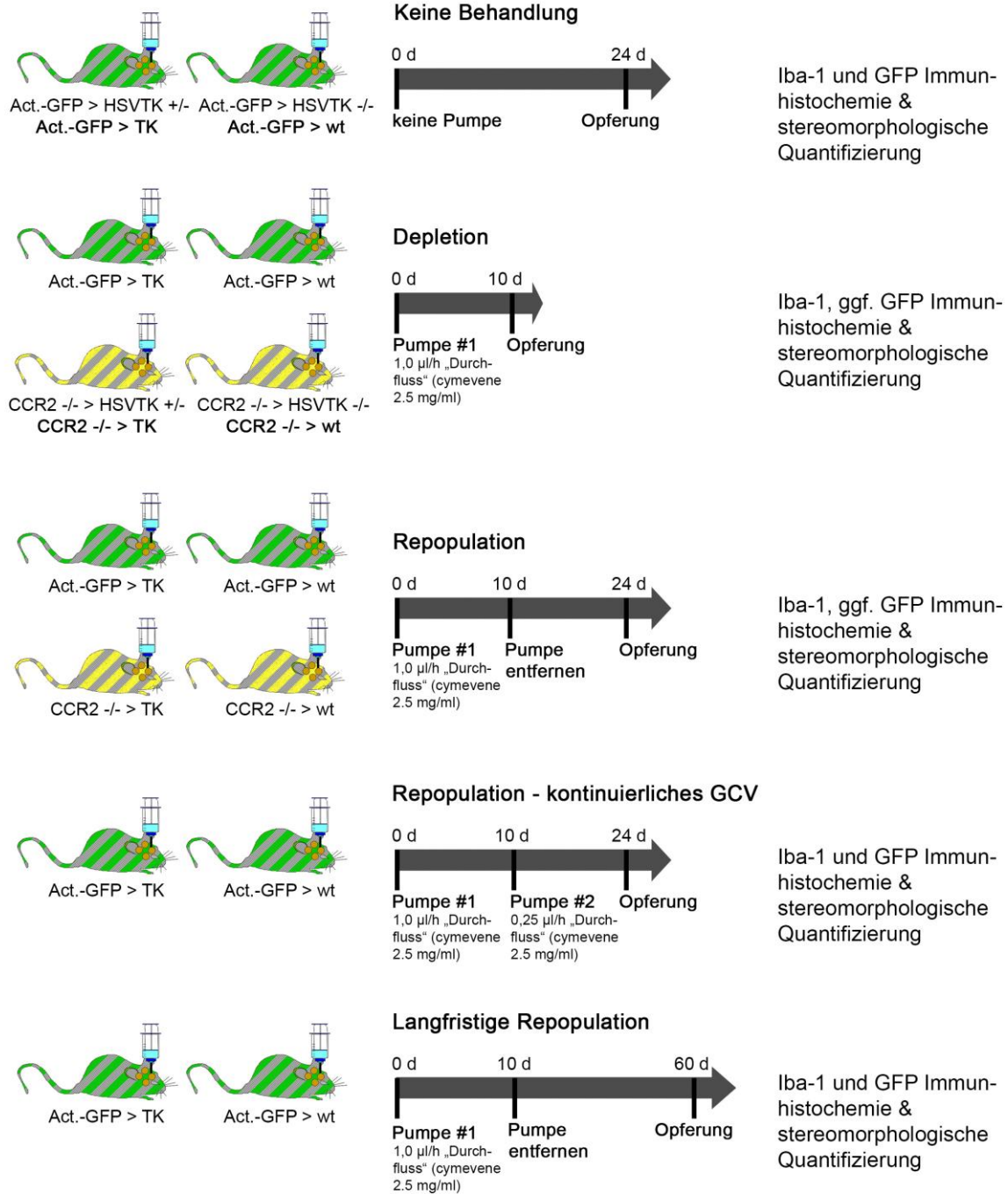


Abbildung 3: Versuchsabläufe der rekonstituierten Mausmodelle

### 3.4.3 Versuchsabläufe des Alzheimer-Mausmodells

Die folgende schematische Darstellung zeigt die Versuchsabläufe des Alzheimer-Mausmodells (siehe Abb. 4). 190 Tage alte APPPS1-HSVTK+/- (*APPPS1-TK*)- und APPPS1-HSVTK+/- (*APPPS1-wt*)-Mäuse wurden zufällig in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Den Mäusen wurde intracerebroventrikuläres GCV (2.5 mg/ml; 1 µl/h) für 10 Tage verabreicht:

- anschließend wurden die Tiere getötet („Depletion“),
- oder/und die Pumpe entfernt und die Tiere lebten weitere 4 Wochen („Repopulation“),
- oder/und eine zweite Pumpe mit einer niedrigeren Durchflussrate von 0,25 µl/h bei gleichbleibender GCV-Dosierung (2.5 mg/ml) für weitere 4 Wochen implantiert („Repopulation – kontinuierliches GCV“).

Nach transkardialer Perfusion wurden die Gehirne den Kadavern entnommen und am Mikrotom geschnitten. Die frei schwimmenden Gewebeschnitte wurden mittels Kongorot angefärbt und morphometrisch quantifiziert.

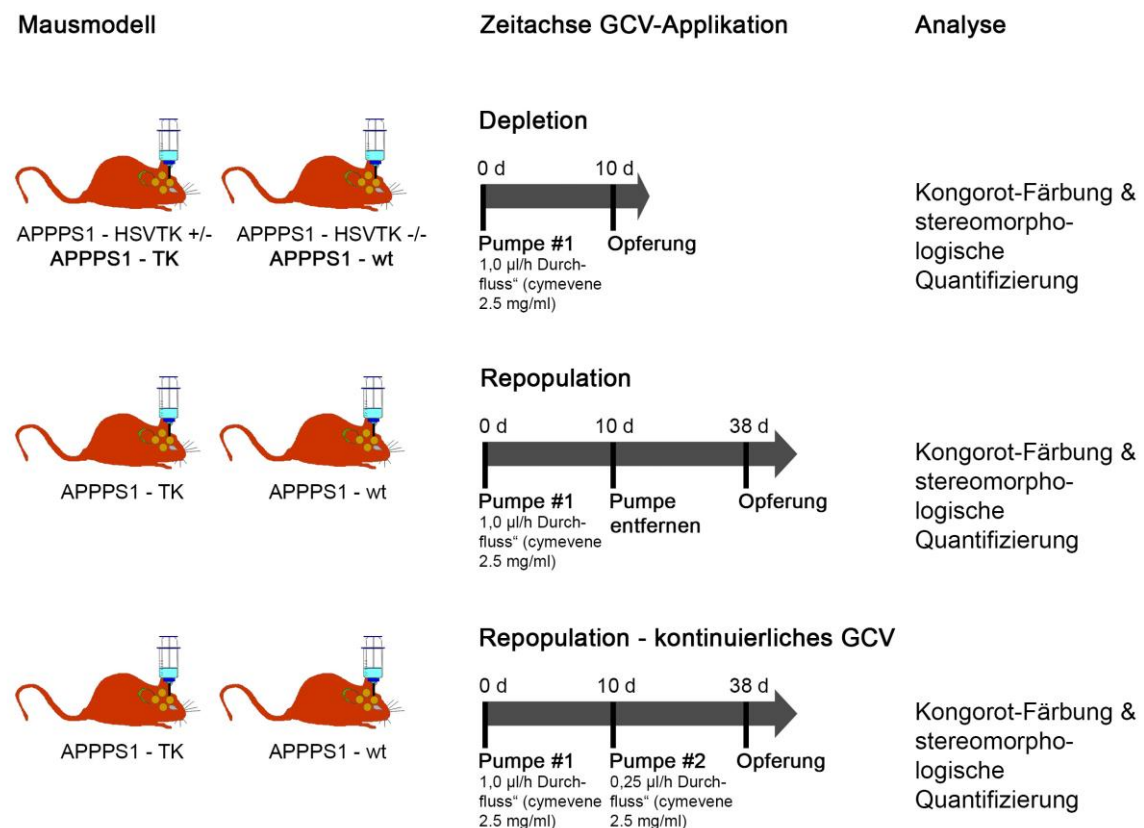


Abbildung 4: Versuchsabläufe des Alzheimer-Mausmodells



### 3.5 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte, im Falle eines Balkendiagramms zusätzlich  $\pm$  Standardabweichung, dargestellt. Zum Vergleich der Iba-1+ mit GFP+ Zellen an Act.-GFP>HSVTK+/- (*Act.-GFP>TK*)- und an Act.-GFP>HSVTK-/- (*Act.-GFP>wt*)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tötung nach GCV-Applikation

- ohne Applikation,
- nach 10 tägiger Gabe,
- nach 10tägiger Gabe und 14 Tagen Behandlungsunterbrechung,
- nach 10tägiger Gabe und nach 50 Tagen Behandlungsunterbrechung
- nach 10tägiger und anschließender 14tägiger (mit niedrigerer Durchflussrate) Gabe

ist eine zweifache Varianzanalyse (two-way-ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt worden. Alle anderen histologischen Abbildungen sind mit der einfachen Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur auf die statistische Signifikanz hin untersucht worden. Dabei sind die histologischen Parameter in zwei Gruppen (TK vs. wt) eingeteilt worden. Alle Statistiken sind mit der Software GraphPad Prism Version 6.0 erstellt worden. Werte  $P < 0.05$  sind als statistisch signifikant betrachtet worden.

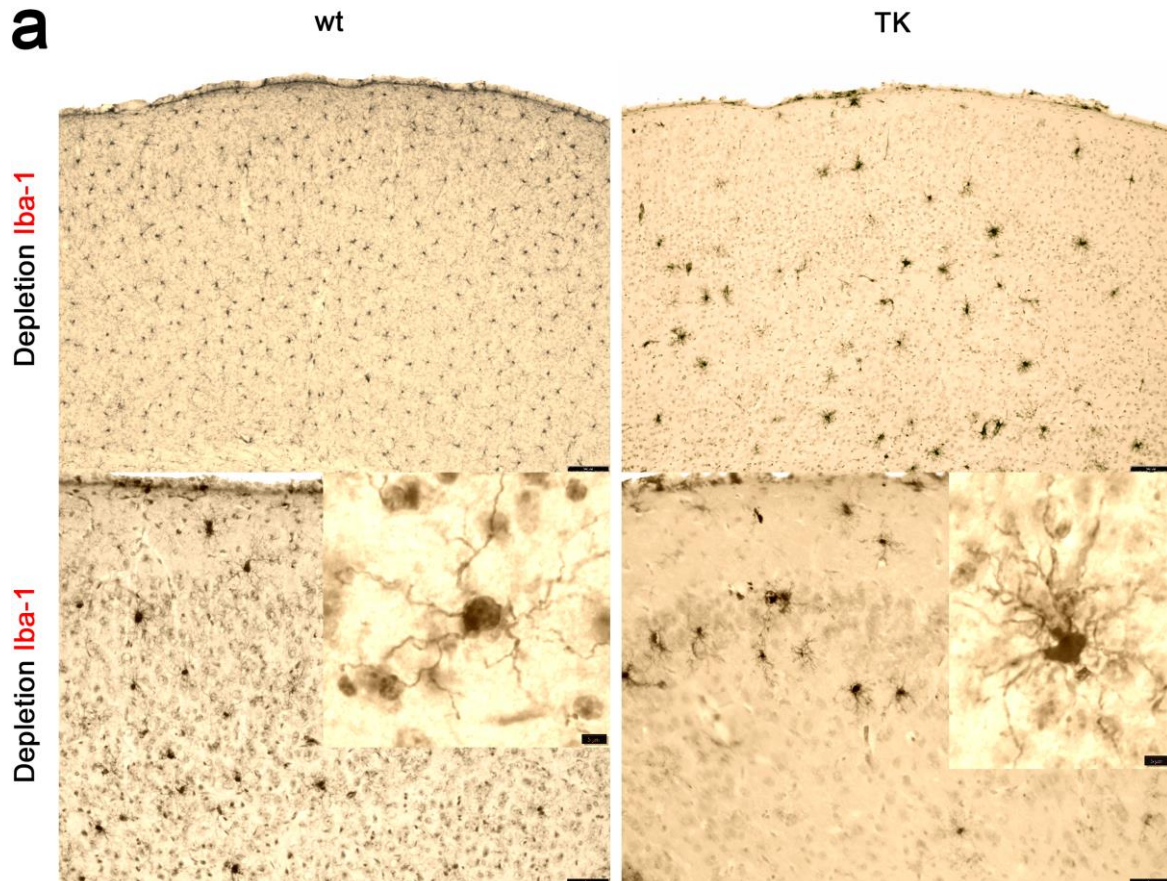
## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Mikrogliazelldepletion gefolgt von Repopulation Iba-1+ Zellen

Die 10tägige intracerebroventrikuläre Behandlung mit Ganciclovir (*GCV*) an HSVTK+/- (*TK*) Mäusen führt zu einer effizienten Depletion der ortständigen Mikrogliazellen („Depletion“; Abb. 5a). Die bei TK-Mäusen verbleibenden Mikrogliazellen weisen eine erhöhte Anzahl an verzweigten Fortsätzen auf. Im Gegensatz dazu hat die GCV-Applikation die Anzahl und die Morphologie der Zellen bei HSVTK-/- (*wt*)-Kontrollmäusen nicht verändert. Auch unbehandelte TK- und *wt*-Mäuse zeigen die charakteristische, damit unveränderte Mikrogliazellmorphologie (exemplarische Bilder werden nicht gezeigt). Die stereologische Quantifizierung von Iba-1+ Zellen im sensomotorischen Kortex von TK-Mäusen nach 10tägiger GCV-Behandlung führt zu einer signifikanten Verminderung von Mikrogliazellen um >68 %, verglichen mit *wt*-Tieren („Depletion“; Abb. 5c; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Zudem haben unbehandelte TK- und *wt*-Mäuse ein fast gleiches Niveau an Mikrogliazellen/mm im Neokortex („keine Behandlung“; Abb. 5c; ns), und entsprechen darüber hinaus annähernd der Iba-1+ Zelldichte von *wt*-Tieren nach 10tägiger GCV-Behandlung. Demzufolge besitzen die Implantation einer Minipumpe und anschließende GCV-Applikation bei *wt*-Mäusen keinen Einfluss auf die Anzahl an Iba-1+ Zellen.

Um zu analysieren, ob das Säugergehirn nach Mikrogliazellablation wieder besiedelt wird, ist nach 10tägiger GCV-Gabe die Behandlung von *wt*- und TK-Mäusen für zwei Wochen unterbrochen worden. Die histologische Analyse dieser Tiere zeigt eine robuste Wiederbesiedlung durch neuartige Iba-1+ Zellen mit gleichmäßiger Verteilung über den gesamten sensomotorischen Kortex („Repopulation“; Abb. 5b), sowie auch von sämtlichen subkortikalen Gehirnregionen (exemplarische Bilder werden nicht gezeigt). Diese Iba-1+ Zellen haben einen prominenten Zellkörper mit kurzen, gedrungenen Fortsätzen, und weisen somit einen monozytären Phänotyp auf. Nach 10tägiger Gabe von GCV („Depletion“) ergibt die zweiwöchige Unterbrechung der Behandlung eine signifikante 87%ige Erhöhung der Iba-1+ stereologisch quantifizierten Zellen bei TK-Mäusen, im Vergleich zu transgen negativen Kontrollen („Repopulation“; Abb. 5d; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Die Wiederbesiedlung des ZNS von TK-Mäusen mit diesen neuartigen Iba-1+ Zellen muss also innerhalb der zweiwöchigen

Unterbrechung der Behandlung erfolgt sein, da nach der alleinigen 10tägigen GCV-Behandlung, derartig morphologisch konfigurierte Zellen noch nicht präsent waren.



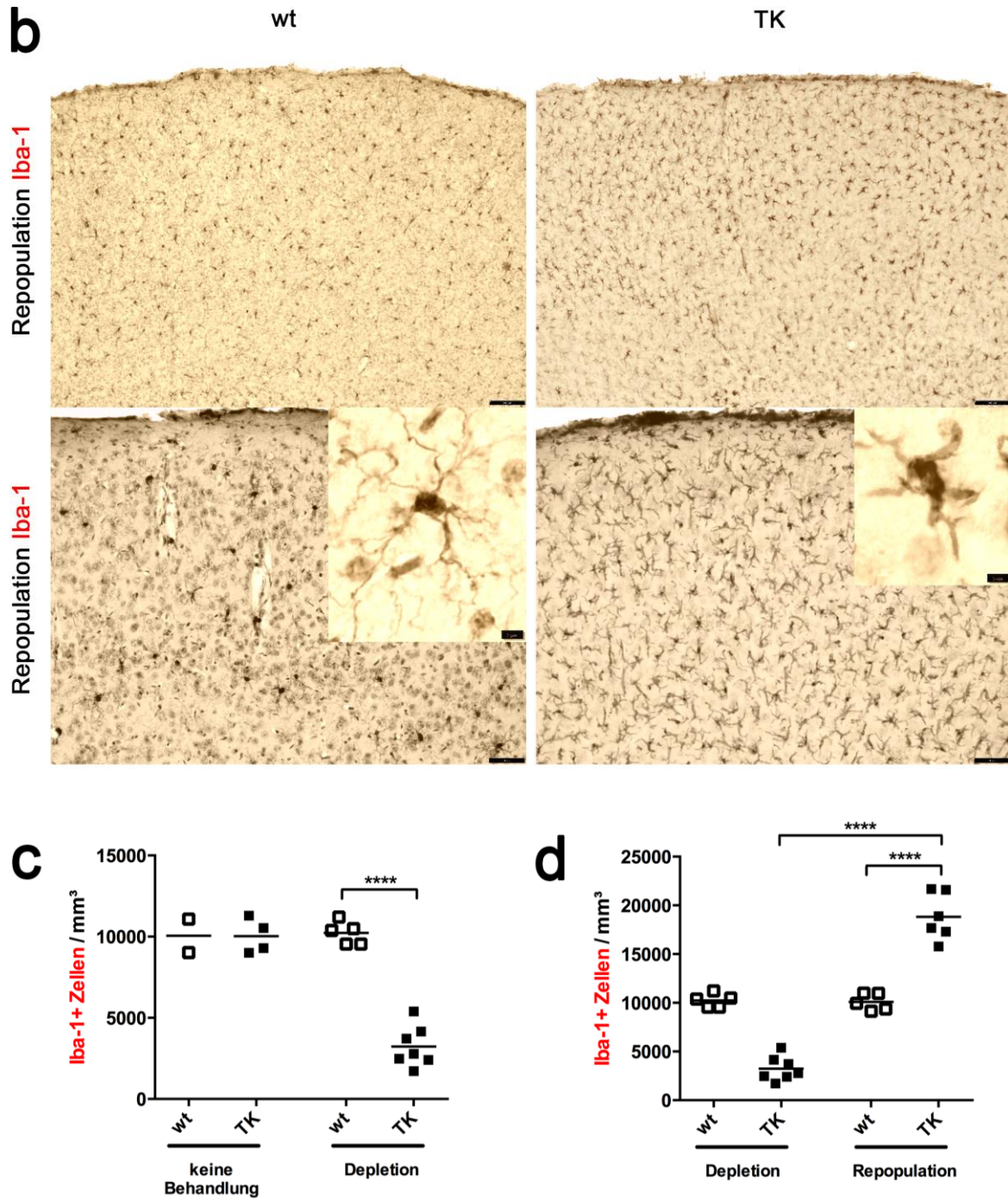


Abbildung 5: Mikrogliazelldepletion gefolgt von Repopulation Iba-1+ Zellen

HSVTK<sup>+/-</sup> (TK) und HSVTK<sup>-/-</sup> (wt) Mäuse werden nicht behandelt und getötet („keine Behandlung“), oder den Tieren wird intracerebroventrikuläres GCV (2.5 mg/ml; 1 µl/h) für 10 Tage verabreicht. Anschließend werden die Mäuse getötet („Depletion“), oder die Pumpe entfernt und die Tiere leben weitere zwei Wochen („Repopulation“). **a**) Die Iba-1-Immunhistologie zeigt die fast komplette Mikrogliazelldepletion im sensorimotorischen Cortex von TK-Mäusen. Die verbleibenden Mikrogliazellen bei TK-Tieren weisen eine erhöhte Anzahl an verzweigten Fortsätzen auf, wohingegen die ortständigen Mikrogliazellen bei wt-Mäusen nicht verändert erscheinen. **b**) Die Unterbrechung der GCV-Behandlung von TK-Mäusen führt zu einer

Wiederbesiedlung von Iba-1<sup>+</sup> Zellen mit monozytärem Phänotyp („Repopulation“). Exemplarische Übersichtsdarstellungen in der oberen Bildreihe der „Depletion,“ bzw. der „Repopulation“ in 10facher Vergrößerung. Für alle Übersichtsdarstellungen gültige Maßstabsleiste = 100  $\mu\text{m}$ . Übrige Nahaufnahmen in der unteren Bildreihe in 20facher bzw. in 60facher Vergrößerung. Für alle Nahaufnahmen gültige Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ , bzw. 5  $\mu\text{m}$ . **c)** Die stereologische Analyse von Iba-1<sup>+</sup> Zellen ergibt eine > 68 %ige Ablation von Mikrogliazellen bei TK-Mäusen im Vergleich zu wt- Nagern nach 10tägiger GCV-Applikation („Depletion“; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). **d)** Die Depletion von Mikrogliazellen bei TK-Mäusen im Vergleich zu wt-Mäusen nach 10tägiger Behandlung mit GCV („Depletion“) führt nach zweiwöchiger Unterbrechung der Behandlung zu einer 87 %-Erhöhung der Iba-1<sup>+</sup> stereologisch quantifizierten Zellen bei TK-Mäusen, im Vergleich zu transgen negativen Kontrolltieren („Repopulation“; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

## **4.2 Repopulations-Phänomen – Austausch ortständiger Mikroglia mit peripher rekrutierten myeloischen Zellen**

### **4.2.1 Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen**

Untersuchen wir zunächst die Herkunft der Zellen, die wieder besiedelt haben, also die Möglichkeit einer endogenen Repopulation des Säugergehirns gegenüber einer aus der Peripherie kommenden Wanderungsbewegung myeloischer Zellen. Dafür wird das Knochenmark von TK- und wt-Mäusen mit Knochenmarkszellen von GFP-exprimierenden Mäusen rekonstituiert; die Chimären-Tiere werden in der Folge mit dem „Depletions“- bzw. „Repopulations“-GCV-Schema behandelt.

Bei Act.-GFP>wt-Mäusen (also wt-Mäusen, die mit GFP-positivem Knochenmark rekonstituiert worden sind) sind erwartungsgemäß – sowohl nach GCV-Gabe mit dem „Depletions“- als auch nach Behandlung mit dem „Repopulations“-Schema – ortsansässige Mikrogliazellen nicht depletiert, bzw. GFP<sup>+</sup> Zellen kaum eingewandert (Abb. 6a, 6b). Eine andere Konstellation ist die fast komplette Mikrogliazellablation im sensomotorischen Cortex bei Act.-GFP>TK-Tieren (also TK-Mäusen, die mit GFP-positivem Knochenmark rekonstituiert worden sind), bei der die verbleibenden Mikrogliazellen eine erhöhte Anzahl an verzweigten Fortsätzen aufweisen („Depletion“; Abb. 6a). Zusätzlich ist interessant, dass eine Grenzlinie zu erkennen ist, die die übermäßig verzweigten Iba-1<sup>+</sup> Zellen von den neu-eingewanderten Zellen (mit monozytärem Phänotyp) abtrennt. Die periphere Herkunft dieser neu-eingewanderten Iba-1<sup>+</sup> Zellen wird u. a. dadurch deutlich, dass histomorphologisch identische Zellen auch GFP-positiv sind. Im Vergleich zu den ortsansässigen Mikroglia haben

diese aus der Peripherie einwandernden Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt eine niedrigere Anzahl an geradlinigen, unverzweigten Zytoplasmafortsätzen. Diese Zellausläufer weisen einen weiteren Durchmesser mit geringerer Ausdehnung auf. In Gegenüberstellung mit der „Depletionssituation“ *nicht* rekonstituierter Mäuse, also der >68%igen Reduktion von Iba-1+ Zellen bei transgen positiven Tieren, weicht die Situation bei Chimären-Mäusen ab: hier zeigt sich nämlich kein signifikanter Unterschied von Iba-1+ Zellen zwischen TK- und wt-Tieren („Depletion“; Abb. 6d; ns). Diese Diskrepanz erklärt sich durch eine beschleunigte Infiltration peripher einwandernder Zellen in der Chimären-Situation. Dieses Phänomen des beschleunigten Wiederbesiedlungsprozesses wird nicht nur durch die histologischen Bilder verdeutlicht („Depletion“; Abb. 6a), sondern zeigt sich auch in der signifikanten Erhöhung von GFP+ Zellen um >450 % von Act.-GFP>TK vs. Act.-GFP>wt-Tieren („Depletion“; Abb. 5e;  $**P<0.01$ ; siehe auch Betrachtung Abb. 6f). Sowohl Act.-GFP>wt-, als auch Act.-GFP>TK- Mäuse, die „keine Behandlung“ erhielten, haben ein übereinstimmendes Niveau an Iba-1+ und GFP+ Zellen und unterscheiden sich demnach nicht in der Anzahl an Mikrogliazellen und aus der Peripherie einwandernder Zellen (Abb. 6d, 6e, 6f, exemplarische Bilder nicht gezeigt).

Wird die GCV-Gabe für zwei Wochen bei Chimären-TK-Mäusen unterbrochen, führt dies zu einer Repopulation der Iba-1+ Zellen monozytären Phänotyps über den gesamten sensomotorischen Kortex („Repopulation“; Abb. 6b). In der exemplarischen Übersichtsdarstellung eines Act.-GFP>wt-Tieres wird der myeloische Ursprung der repopulierenden Zellen verständlich, da im Gegensatz zu Act.-GFP>TK-Mäusen keine GFP+ Zellen immunhistochemisch sichtbar sind. Die eingewanderten Zellen verändern während des des Repopulationsprozesses ihre Morphologie (vergl. mit exemplarischen Nahaufnahmen der Act.-GFP>TK-Tiere; „Depletion“; Abb. 6a): Erhöht ist die Anzahl an stärker gewundenen, sich häufiger verzweigenden Fortsätzen, geringeren Durchmessers und verstärkter Ausweitung. Die stereologische Analyse von Iba-1+ Zellen markiert eine signifikante, annähernd 88%ige Erhöhung von Iba-1+ Zellen bei Act.-GFP>TK- verglichen mit Act.-GFP>wt-Mäusen („Repopulation“; Abb. 6d;  $****P<0.0001$ ). Im gleichen Zeitraum erhöhen sich die GFP+ Zellen um signifikante >1.064 % von Act.-GFP>TK- zu Act.-GFP>wt- Mäusen („Repopulation“; Abb. 6e;  $****P<0.0001$ ).

Das tragende Fundament dieser Wiederbesiedlung bildet die ausgeprägte Erhöhung der Zelldichte bei Act.-GFP>TK-Mäusen vom „Depletions“- zum „Repopulationszeitpunkt“ um

>7263 Iba-1+ Zellen/mm (Abb. 6d; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Interessanterweise kommt es parallel im gleichen Zeitraum ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg um >7015 GFP+ Zellen/mm (Abb. 6e; \*\*\* $P < 0.001$ ). Der Repopulationsprozess wird maßgeblich durch aus der Peripherie einwandernde Zellen getragen, da sich sowohl Iba-1+ Zellen, als auch GFP+ Zellen um die nahezu gleiche Anzahl/mm erhöhen („Depletion“ und „Repopulation“; Abb. 6f).

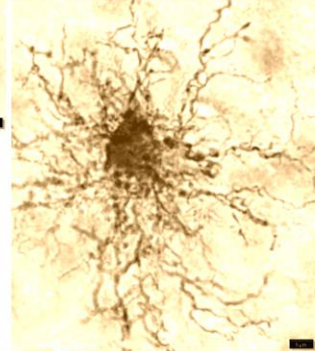
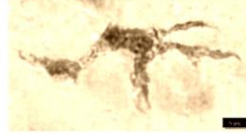
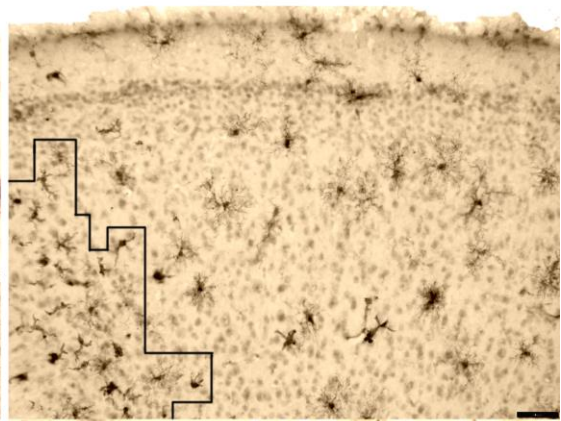
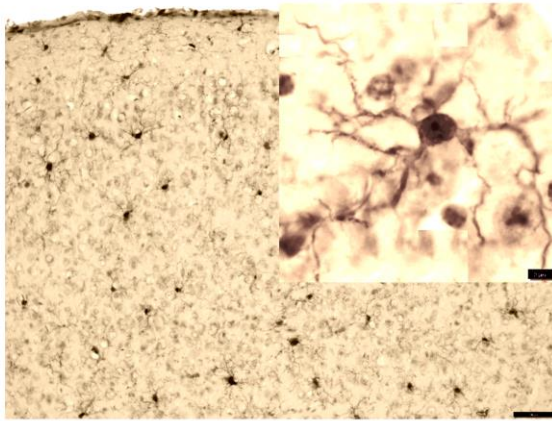
Auch die längerfristige Unterbrechung der GCV-Gabe um 50 Tage nach initialer 10tägiger Behandlung von Act.-GFP>TK-Mäusen führt zu einer robusten Repopulation („langfristige Repopulation“; Abb. 6c). Auch nach langfristiger Behandlungspause sind die GFP+ Zellen bei Act.-GFP>TK-Mäusen im gesamten sensomotorischen Kortex gleichmäßig verteilt. Hingegen sind bei Act.-GFP>wt-Tieren keine dieser Zellen darstellbar. Während der verlängerten Dauer der Besiedlung vermehren sich die Fortsätze infiltrierender Zellen kontinuierlich – auch der Grad der Verzweigung, die Anzahl der Windungen, sowie die Ausdehnung nehmen zu. Zusätzlich wird der Durchmesser der Zellausläufer zunehmend geringer, so gleicht sich der anfangs monozytäre Phänotyp eingewanderter Zellen immer mehr den ortsansässigen Mikrogliazellen an. Die stereologische Quantifizierung von Iba-1+ Zellen zeigt eine signifikante >66 %ige Zunahme von Iba-1+ Zellen, wieder bei dem Vergleich Act.-GFP>TK- zu Act.-GFP>wt-Mäusen („langfristige Repopulation“; Abb. 6d; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). In der gleichen Zeitspanne erhöhen sich die GFP+ Zellen signifikant um >2.451 %; abermals bei Act.-GFP>TK- versus Act.-GFP>wt-Mäusen („langfristige Repopulation“; Abb. 6e; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

**a**

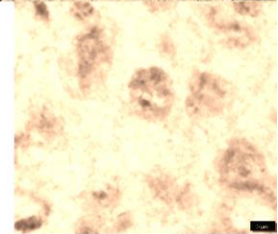
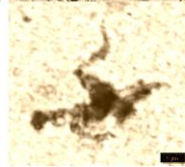
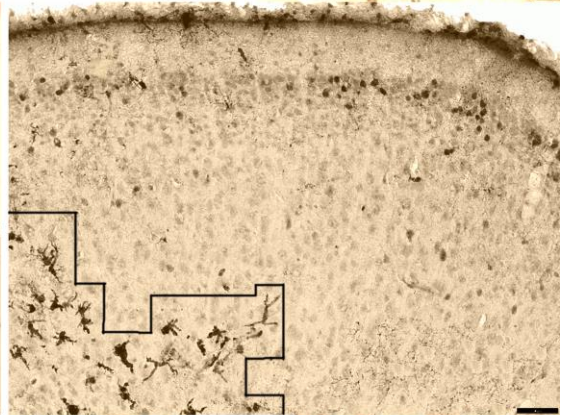
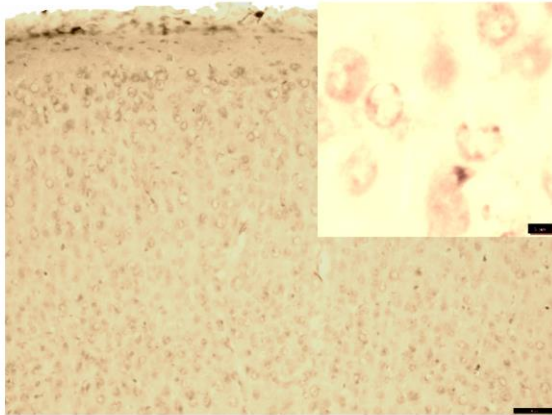
Act.-GFP > wt

Act.-GFP > TK

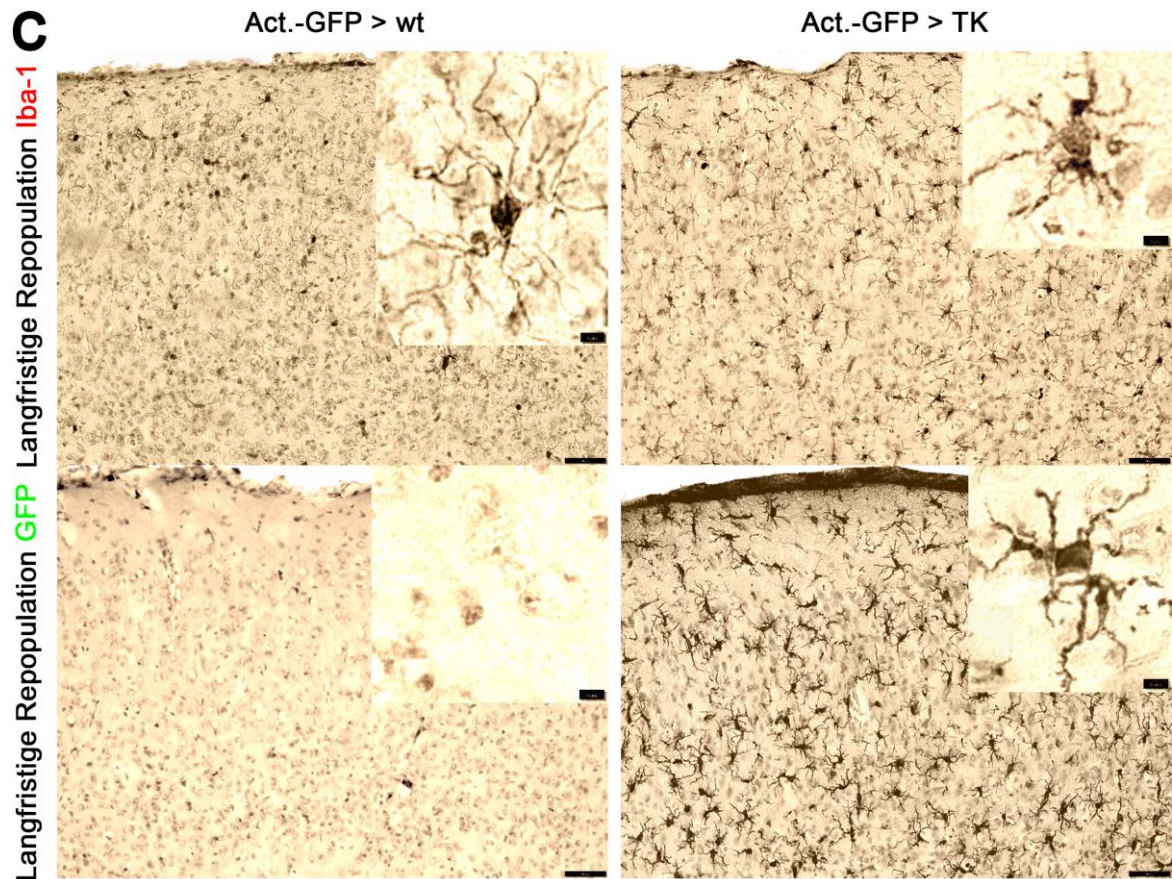
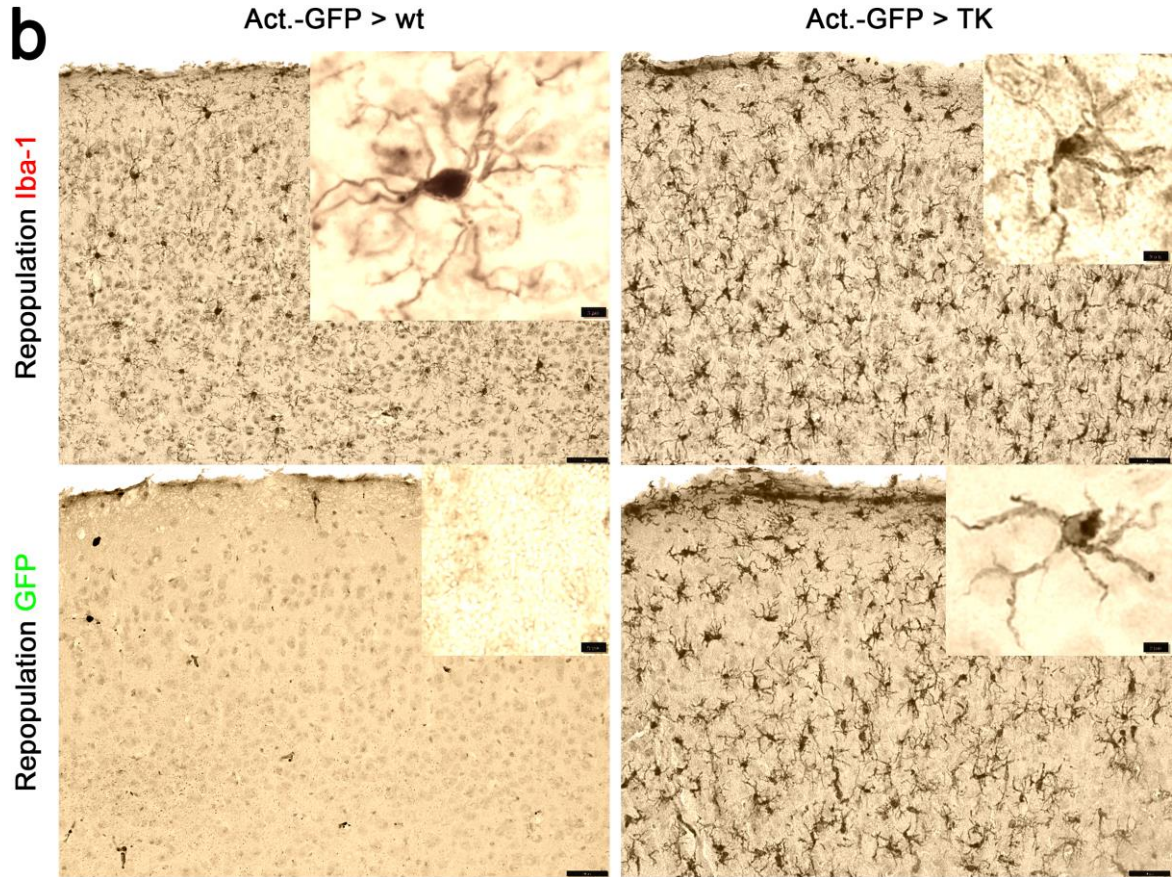
Depletion Iba-1



Depletion GFP







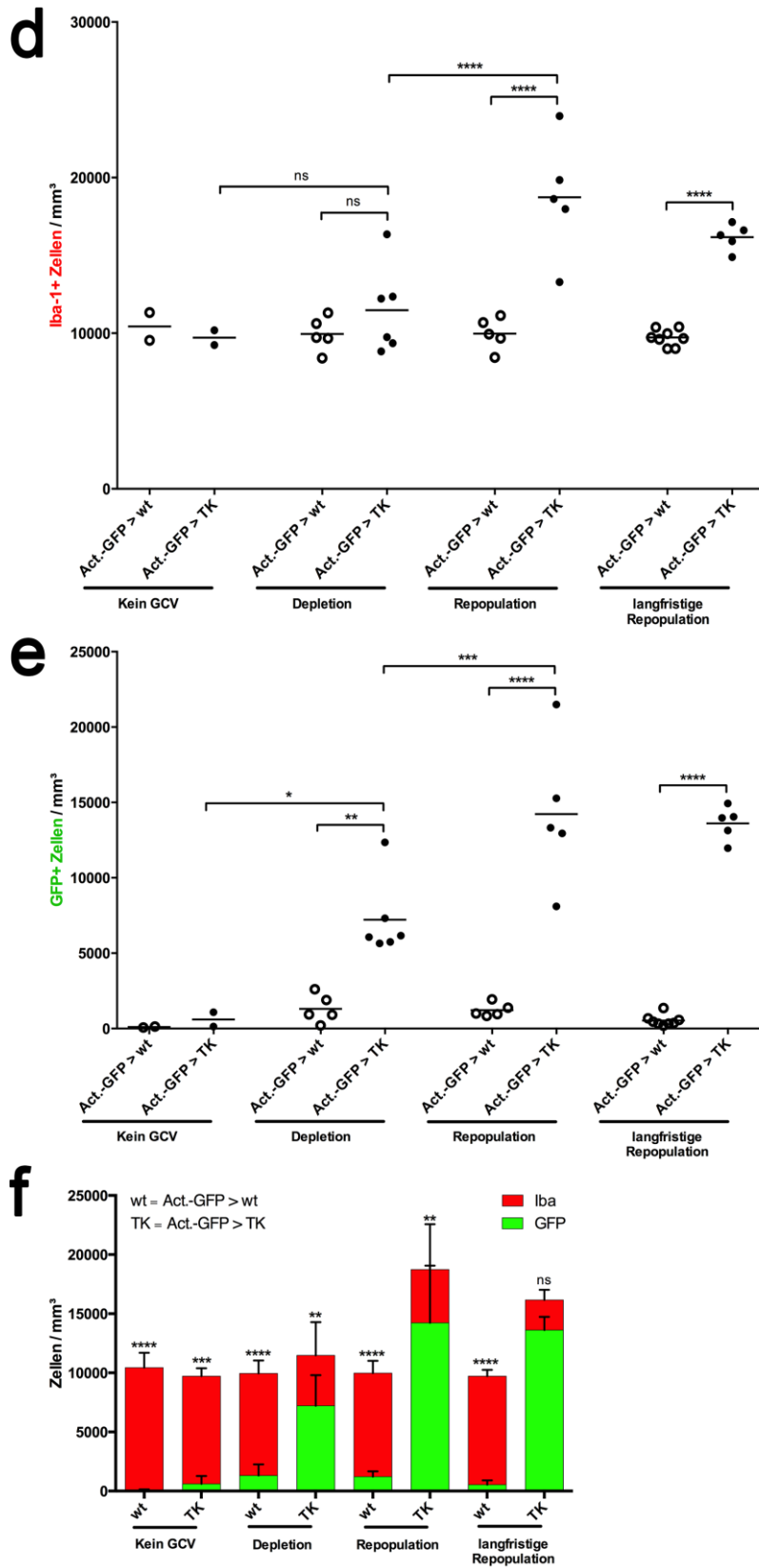


Abbildung 6: Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen

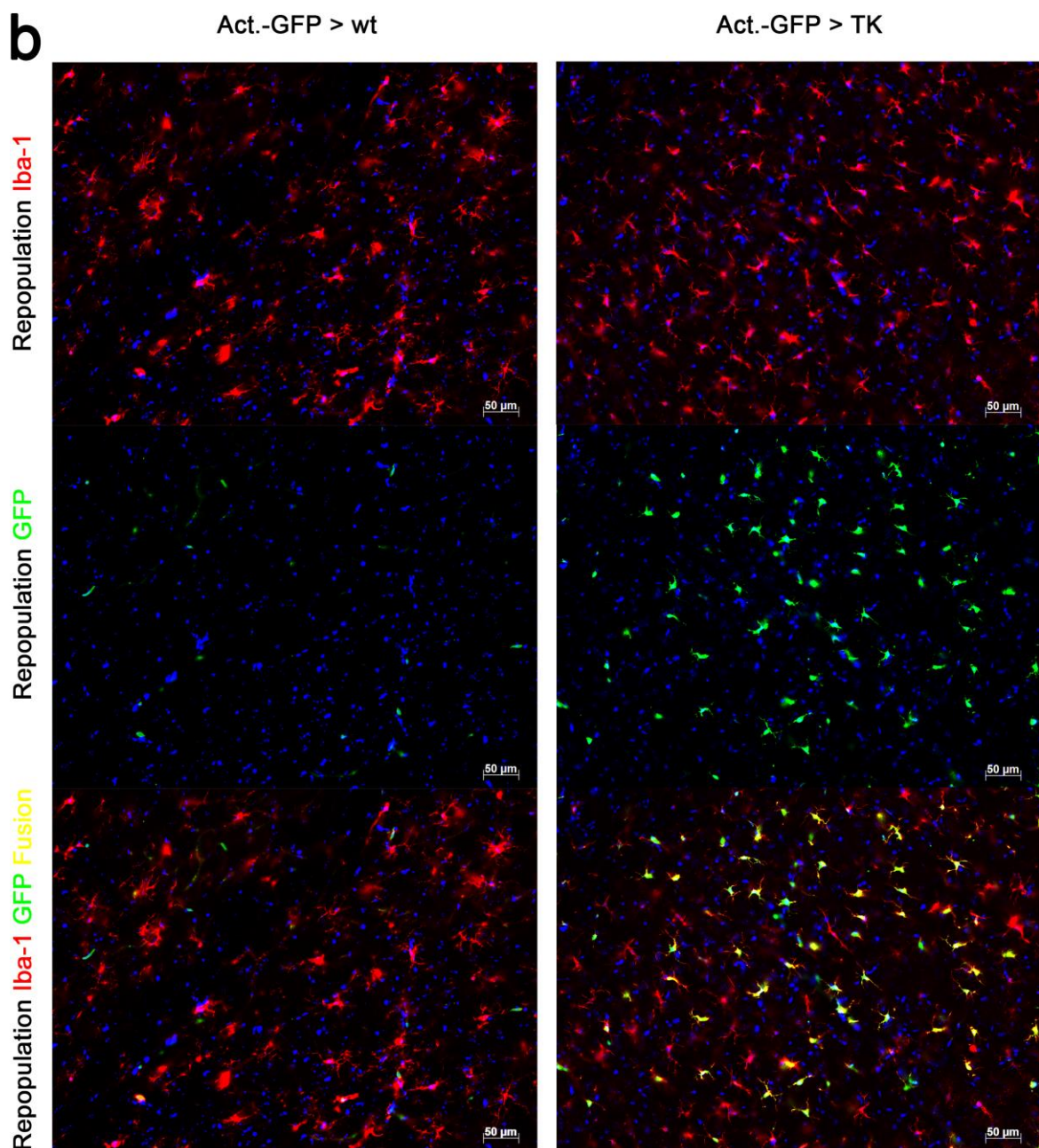
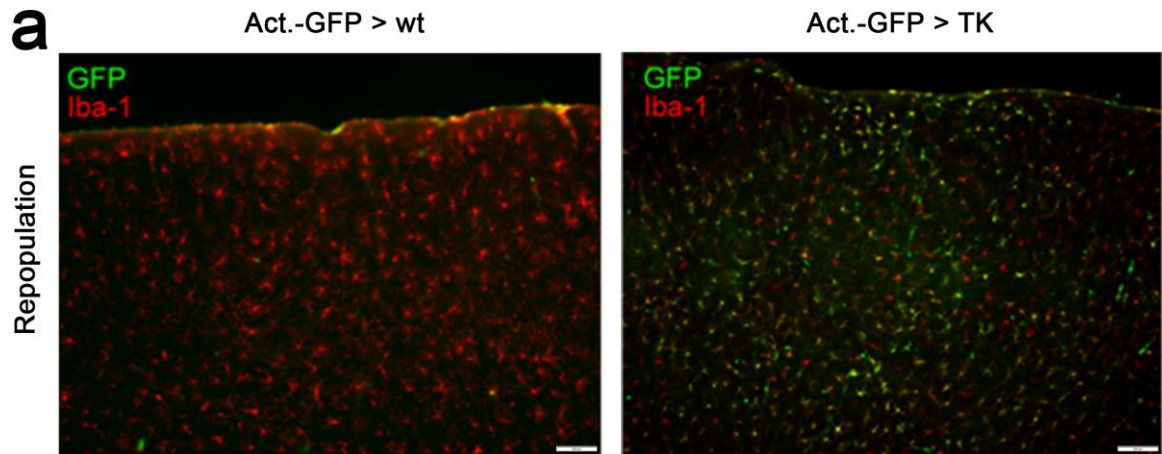
Das Knochenmark von TK- und wt-Mäusen wird mit Knochenmarkszellen von GFP exprimierenden Mäusen, das unter Kontrolle des  $\beta$ -Aktin Promotors steht, rekonstituiert. Chimäre-TK- und wt-Mäuse werden in der Folge teils nicht behandelt und getötet („keine Behandlung“; exemplarische Bilder werden nicht gezeigt); ein anderer Teil der Tiere wird intracerebroventrikuläres GCV (2.5 mg/ml; 1  $\mu$ l/h) für 10 Tage appliziert. Anschließend werden diese Mäuse teilweise getötet („Depletion“); von der verbleibenden Selektion wird die Pumpe entfernt. Diese Tiere werden nun in der einen Gruppe weitere 2 Wochen („Repopulation“) und in einer zweiten Gruppe sogar 50 Tage leben („langfristige Repopulation“). **a)** Die Iba-1 Immunhistologie zeigt die fast komplette Mikrogliazellablation im sensomotorischen Kortex von TK-Mäusen. Die verbleibenden Mikrogliazellen bei Act.-GFP>TK-Tieren besitzen eine erhöhte Anzahl an verzweigten Fortsätzen – die ortsansässigen Mikrogliazellen bei wt-Mäusen hingegen scheinen nicht verändert. Erwähnenswert ist, dass in exemplarischen Abbildungen von Act.-GFP>TK-Nagern eine zusätzliche Grenzlinie erkennbar ist, die die übermäßig verzweigten Iba-1+ Zellen von den repopulierenden Zellen abtrennt. Die periphere Herkunft dieser wiederbesiedelnden Iba-1+ Zellen wird dadurch deutlich, dass morphologisch identische Zellen auch mittels GFP-Immunhistochemie dargestellt werden können. **b)** Die Unterbrechung der GCV-Gabe an TK-Mäusen führt zu einer Repopulation von Iba-1+ Zellen mit monozytärem Phänotyp („Repopulation“). Hier wird in der exemplarischen Übersichtsdarstellung eines Act.-GFP>wt-Tieres der myeloische Ursprung der repopulierenden Zellen verständlich, sind doch im Gegensatz zu Act.-GFP>TK-Mäusen keine GFP-positiven Zellen zu erkennen. **c)** Auch die längerfristige Unterbrechung der GCV-Gabe an Act.-GFP>TK-Mäusen führt zu einer Wiederbesiedlung des ZNS („langfristige Repopulation“). Auch nach 50 Tagen Behandlungspause sind die GFP+ Zellen bei Act.-GFP>TK-Mäusen im gesamten Neokortex gleichmäßig verteilt, wohingegen bei Act.-GFP>wt-Kontrollen keine dieser Zellen mehr darstellbar ist. Während der 50tägigen Repopulation vermehren sich die Fortsätze der aus der Peripherie eingewanderten Zellen kontinuierlich; auch der Grad der Verzweigung, die Anzahl der Windungen, sowie die Ausdehnung der Zytoplasmaausläufer nehmen zu. Zusätzlich wird der Durchmesser der Zellfortsätze immer geringer, so dass sich die anfangs monozytäre Morphologie der einwandernden Zellen immer mehr den ortsansässigen Mikrogliazellen angleicht. Exemplarische Übersichtsdarstellungen in 20facher Vergrößerung, Nahaufnahmen in 60facher Vergrößerung. Für alle Übersichtsdarstellungen gültige Maßstabsleiste = 50  $\mu$ m, für alle Nahaufnahmen gültige Maßstabsleiste = 5  $\mu$ m. **d) e) f)** Die stereologische Analyse von Iba-1+ Zellen ergibt nach 10tägiger GCV-Behandlung keinen signifikanten Unterschied bei Act.-GFP>TK-Tieren im Vergleich zu Act.-GFP>wt- Mäusen. Im Gegensatz dazu markiert die Quantifizierung der GFP+ Zellen einen deutlichen Anstieg der GFP+ Zellen um >450 %. Dass das gleiche Niveau an Iba-1+ Zellen sowohl bei TK- als auch bei wt-Chimären-Mäusen durch eine frühzeitige Infiltration von peripher einwandernden Zellen hervorgerufen wird, veranschaulicht insbesondere Abb. f. Auch im Vergleich zur nicht rekonstituierten „Depletionssituation“ ist dies erkennbar. Das tragende Fundament der Repopulation bildet sich bei Act.-GFP>TK-Mäusen vom „Depletions“- bis zum „Repopulationszeitpunkt“ mit einem signifikanten Anstieg der Zelldichte um 7.263 Iba-1+ Zellen/mm<sup>3</sup>. Bemerkenswerterweise kommt es bei Act.-GFP>TK-Tieren im gleichen Zeitintervall ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung um 7.015 GFP+ Zellen/mm<sup>3</sup> („Depletion“ und „Repopulation“).

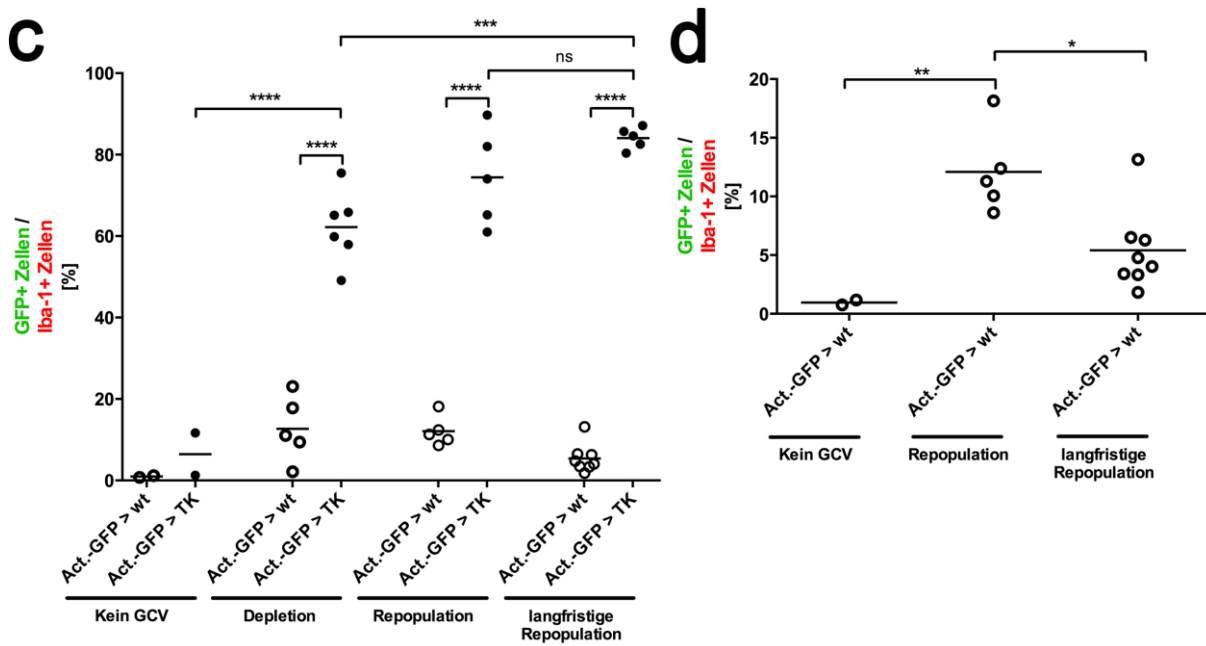
Übersichtsaufnahmen von Gewebsschnitten, angefärbt mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern (Iba-1, GFP), bei Act.-GFP>TK-Mäusen, die nach initialer 10tägiger GCV-Behandlung und sich anschließender, zweiwöchiger Unterbrechung getötet werden, verdeutlichen noch einmal das Repopulations-Phänomen. Im Gegensatz zu Act.-GFP>wt-Tieren ist der gesamte sensomotorische Kortex mit GFP+ Zellen vollständig wiederbesiedelt („Repopulation“; Abb. 7a). Darüber hinaus zeigen exemplarische Nahaufnahmen des Neokortexes von Act.-GFP>TK-Mäusen, dass annähernd alle GFP+ Zellen auch Iba-1+ sind (Fusion gelb; „Repopulation“; Abb. 7b). Im Vergleich dazu sind kaum GFP+ Zellen in transgen negativen Kontrollen zu erkennen. Exemplarische Bilder von Act.-GFP>TK- und Act.-GFP>wt-Tieren, die den Gruppen „ohne Behandlung“, „Depletion“ und „langfristige Repopulation“ zugeordnet werden, sind nicht gezeigt.

Das prozentuale Verhältnis (GFP+ Zellen/Iba-1+ Zellen x 100) veranschaulicht noch einmal den Repopulationsprozess und kann folgerichtig abgebildet werden, da sich nahezu alle GFP+ Zellen auch als Iba-1+ darstellen. Bei Act.-GFP>TK-Mäusen erhöht sich der Anteil an GFP+ Zellen von der „Depletionssituation“ [prozentuales Verhältnis von 62,2 %] um 55,7 %, im Vergleich zur Gruppe „ohne Behandlung“ [prozentuales Verhältnis von 6,5 %] (Abb. 7c; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Im Gegensatz dazu gibt es während dieser Zeitspanne keinen signifikanten Unterschied bei entsprechenden Kontrolltieren (Abb. 7c; ns). Dieses Ergebnis weist - wie Abb. 6a, also dem Nachweis von Iba-1+ Zellen mit monozytärem Phänotypen, welche auch GFP+ sind, und wie Abb. 6f - auf eine frühzeitige Infiltration von peripheren Zellen im Vergleich zur nicht rekonstituierten „Depletionssituation“ hin. Zudem steigt das prozentuale Verhältnis von der „Depletionssituation“ [prozentuales Verhältnis von 62,2 %] zur „langfristigen Repopulationssituation“ [prozentuales Verhältnis von 85,0 %] bei Act.-GFP>TK-Mäusen während des Wiederbesiedlungsprozesses um weitere 22,8 % an (Abb. 7c; \*\*\* $P < 0.001$ ).

Das prozentuale Verhältnis der Marker (GFP+ Zellen/Iba-1+ Zellen x 100) macht eine signifikante Erhöhung um 11,1 % von „nicht behandelten“ Act.-GFP>wt-Mäusen [prozentuales Verhältnis von 1 %] zu mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Tieren aus [prozentuales Verhältnis von 12,1 %]; (Abb. 7d; \*\* $P < 0.01$ ). Daraus folgt, dass schon allein die Pumpenimplantation mit „GCV-Repopulations-Behandlung“ im nicht transgenen Tier zu einem signifikanten Einstrom peripherer Zellen führt. Interessanterweise nimmt der Anteil an GFP+ Zellen um 6,5 % bei mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-

GFP>wt-Mäusen im Vergleich zu [prozentuales Verhältnis von 12,1 %]; bei den mit dem „langfristigen Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Tieren [prozentuales Verhältnis von 5,6 %] aber ab (Abb. 6d; \* $P < 0.05$ ). Analog verschwinden die primär von peripher eingewanderten Zellen nach längerer Behandlungspause in der nicht transgenen Maus teilweise wieder. Damit weicht diese Sachlage vom transgenen Repopulations-Phänomen ab: In diesem Fall gibt es keinen signifikanten Unterschied am GFP+ Zellen-Anteil zwischen der „Repopulationssituation“ zur „langfristigen Repopulationssituation“ bei Act.-GFP>TK-Mäusen (Abb. 6c; ns). Die peripheren Zellen sind demnach essentiell für das Überleben des Tieres und sie bevölkern nachhaltig das Säugergehirn.





**Abbildung 7: Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen**

Das Knochenmark von TK- und wt-Nagern wird mit Knochenmarkszellen von GFP exprimierenden Mäusen rekonstituiert. Wie in Abb. 6 bereits beschrieben, werden Chimäre-Act.-GFP>TK- und wt-Mäuse in einer Gruppe nicht und in anderen Gruppen mit unterschiedlichen GCV-Behandlungs-Protokollen eingeteilt. Exemplarische Bilder von Act.-GFP>TK- und Act.-GFP>wt-Tieren, die den Gruppen „ohne Behandlung“, „Depletion“ und „langfristige Repopulation“ zugeordnet werden, sind nicht gezeigt. **a)** Exemplarische Übersichtsdarstellungen des Neokortexes von Act.-GFP > TK- und Act.-GFP > wt-Mäusen, behandelt mit dem „GCV-Repopulations-Protokoll“, verdeutlichen noch einmal das Repopulations-Phänomen. (10fache Vergrößerung. Maßstabsleiste = 100  $\mu$ m). **b)** Exemplarische Nahaufnahmen des Neokortexes von Act.-GFP>TK- und Act.-GFP>wt-Mäusen, behandelt mit dem „GCV-Repopulations-Protokoll“, zeigen, dass nahezu alle GFP+ Zellen auch Iba-1+ sind (Fusion gelb, 20fache Vergrößerung, Maßstabsleiste = 50  $\mu$ m). **c)** Da annähernd alle GFP+ Zellen auch Iba-1+ sind, ist in diesen Graphen das prozentuale Verhältnis dieser Marker abgebildet (GFP+ Zellen/Iba-1+ Zellen x 100). Der Anteil an GFP+ Zellen nimmt während des Repopulationsprozesses zu ( $****P<0.0001$ ;  $***P<0.001$ ). **d)** Das prozentuale Verhältnis der Marker (GFP+ Zellen / Iba-1+ Zellen x 100) ergibt eine signifikante Erhöhung um 11,1 % von „nicht behandelten“ Act.-GFP>wt-Mäusen im Vergleich zu mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Tieren ( $**P<0.01$ ). Aufschlussreich ist es, dass der Anteil an GFP+ Zellen um 6,5 % von den mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Mäusen abnimmt, verglichen mit den mit dem „langfristigen Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Tieren ( $*P<0.05$ ).

#### 4.2.2 Repopulations-Phänomen in Abwesenheit des CCL2/CCR2-Signalweges

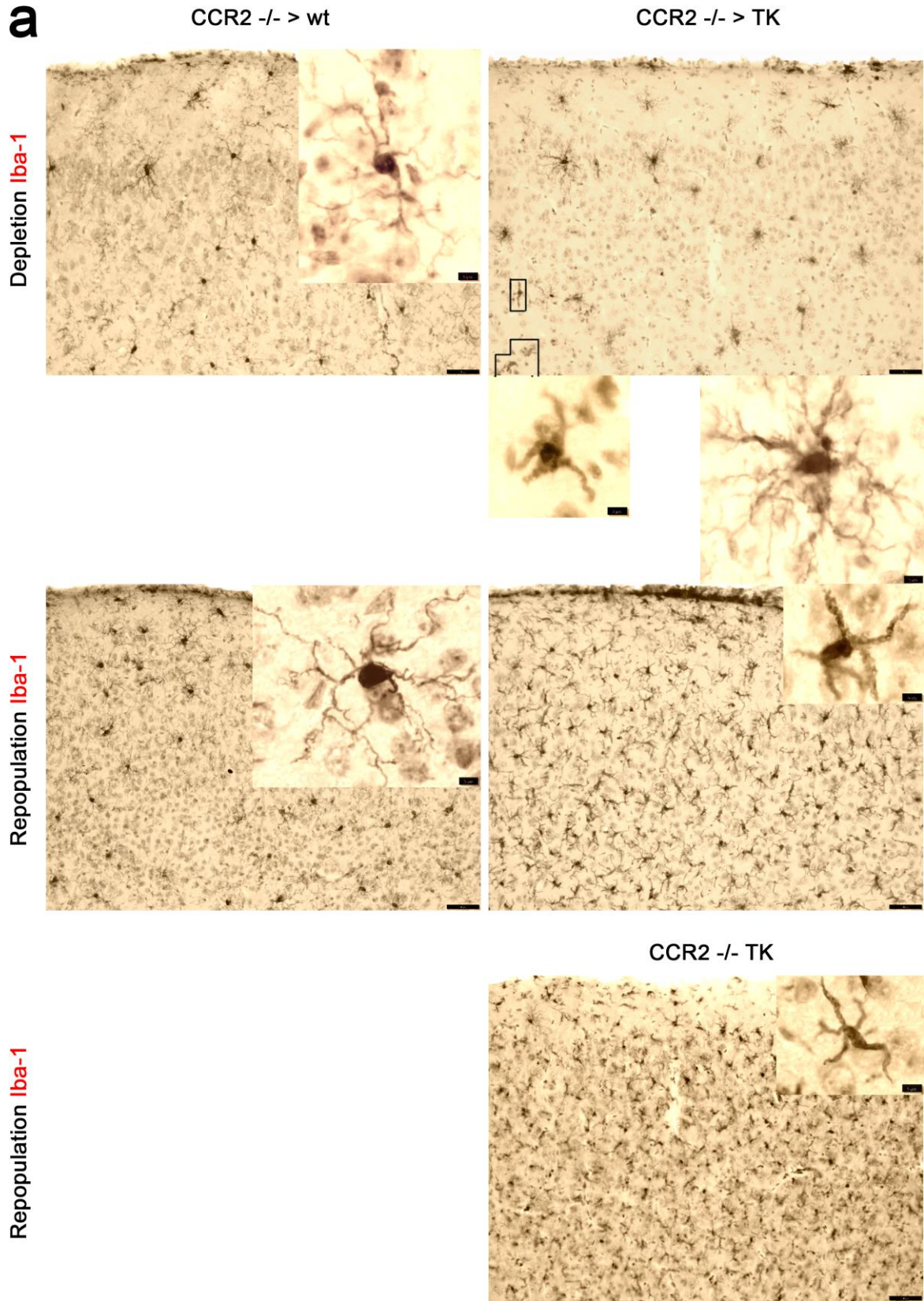
Um die Hypothese zu testen, ob das Einwandern von peripheren myeloischen Zellen in das von Mikroglia befreite Gehirn durch den CCL2/CCR2-Signalweg vermittelt wird, sind Chimäre-TK-Mäuse mit CCR2 defizientem Knochenmark generiert worden ( $CCR2^{-/-} >TK$ ). Bei  $CCR2^{-/-} >wt$ -Mäusen sind nach GCV-Gabe erwartungsgemäß mit dem „Depletions-Behandlungsschema“ ortsansässige Mikrogliazellen nicht depletiert (Abb. 8a). Anders stellt sich die fast komplette Mikrogliazelldepletion im sensomotorischen Kortex bei  $CCR2^{-/-} >TK$ -Tieren dar („Depletion“; Abb. 8a). Die verbleibenden Mikrogliazellen weisen eine erhöhte Anzahl an verzweigten Fortsätzen auf. Zusätzlich tritt eine Grenzlinie auf, die die übermäßig verzweigten Iba-1+Zellen von den neu eingewanderten Zellen trennt. Deutlich wird die periphere Genese dieser Iba-1+ Zellen mit monozytärem Phänotyp im Vergleich mit Abb. 6a (also der „Depletionssituation“ bei Act.-GFP>TK-Mäusen), in der sich diese Zellen als GFP+ und damit myeloischen Ursprungs darstellen. Im Vergleich zu den ortsansässigen Mikroglia haben diese peripheren Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt der Wiederbesiedlung eine niedrigere Anzahl an geradlinigen, unverzweigten Fortsätzen, welche einen weiteren Durchmesser mit geringerer Ausdehnung aufweisen. Nach 10tägiger GCV-Behandlung zeigt die stereologische Quantifizierung von Iba-1+Zellen im sensomotorischen Kortex von  $CCR2^{-/-} >TK$ -Mäusen, verglichen mit transgen negativen Kontrollen, eine signifikante Verminderung von Mikrogliazellen um annähernd 41% („Depletion“; Abb. 8b;  $**P < 0.01$ ).

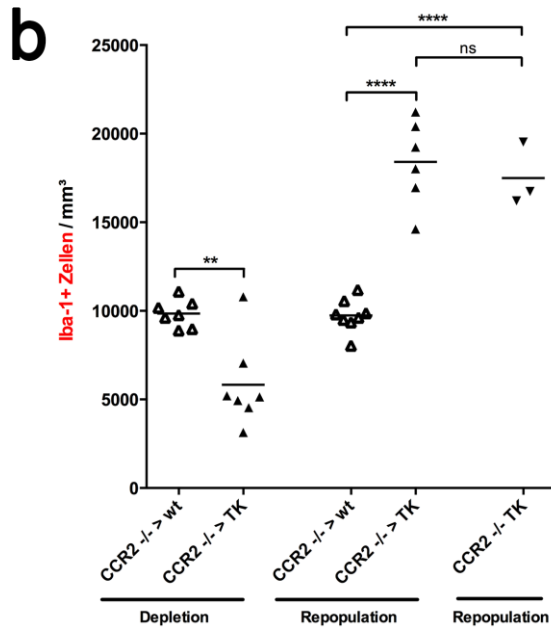
Überraschenderweise führt die Unterbrechung der GCV-Gabe für zwei Wochen, nach initialer 10tägiger Behandlung an  $CCR2^{-/-} >TK$ -Tieren, ebenfalls zu einer robusten Wiederbesiedlung von Iba-1+Zellen über den gesamten Neokortex („Repopulation“; Abb. 8a). Wie bereits bei Act.-GFP>TK-Mäusen beschrieben, verändern die eingewanderten Zellen während des Repopulationsprozesses ihre Morphologie (vergleiche mit exemplarischen Nahaufnahmen bei  $CCR2^{-/-} >TK$ -Mäusen; „Depletion“; Abb. 8a): Erhöht ist die Anzahl an Fortsätzen, welche stärker gewunden sind, sich häufiger verzweigen, einen geringeren Durchmesser aufweisen und sich verstärkt ausbreiten. Übereinstimmend mit allen anderen experimentellen Paradigmen, in denen eine Wiederbesiedlung stattfindet, erhöht sich 14 Tage nach Beendigung der GCV-Behandlung die Anzahl an Iba-1+Zellen um >88 % in der stereologischen Analyse bei  $CCR2^{-/-} >TK$ -Mäusen, wiederum im Vergleich zu  $CCR2^{-/-} >wt$ -Tieren („Repopulation“; Abb. 8b;  $****P < 0.0001$ ). Unabhängig von der Behandlung (Dauer der GCV-Gabe, bzw. nicht rekonstituierte, oder rekonstituierte Situation) war das Niveau im



Hinblick auf die Anzahl an Iba-1+Zellen bei  $CCR2^{-/-}$  > wt-Tieren äquivalent zu allen anderen Kontrolltieren.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass  $CCR2^{-/-}$  Zellen nur wegen einer Störung der Blut-Hirn-Schranke aufgrund der vorherigen ZNS-Bestrahlungsprozedur einwandern können, sind doppelt transgene nicht rekonstituierte  $CCR2^{-/-}$  TK-Mäuse für 10 Tage mit GCV behandelt und anschließend, nach zwei wöchiger Behandlungspause, getötet worden. Auch diesmal ergibt die stereologische Quantifizierung der Iba-1+Zellen eine signifikante Erhöhung von >79 % bei  $CCR2^{-/-}$  TK versus  $CCR2^{-/-}$  >wt-Tieren („Repopulation“; Abb. 8b; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ), was einer Dichte von ungefähr 17497 Zellen/mm<sup>3</sup> bei TK-positiven Mäusen entspricht. Diese Daten bestätigen, dass die vollständige Wiederbesiedlung von CCR2 defizienten Iba-1+Zellen auch bei Nichtvorhandensein der Hirnbestrahlung erfolgt.





**Abbildung 8: Repopulations-Phänomen in Abwesenheit des CCL2/CCR2-Signalweges**

Das Knochenmark von TK- und wt-Mäusen wird mit Knochenmarkszellen von CCR2<sup>-/-</sup>-Tieren rekonstituiert. Chimären-CCR2<sup>-/-</sup>>TK- und CCR2<sup>-/-</sup>>wt-Tieren werden intracerebroventrikuläres GCV (2.5 mg/ml; 1 µl/h) für 10 Tage appliziert. Anschließend werden die Mäuse getötet („Depletion“), oder die Tiere leben weitere zwei Wochen („Repopulation“). Nicht rekonstituierte CCR2<sup>-/-</sup> TK-Tiere werden mit dem GCV-„Repopulations-Protokoll“ behandelt. **a)** Die Iba-1 Immunhistologie zeigt die fast komplette Mikrogliazelldepletion nach 10tägiger GCV-Gabe im Neokortex von CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen. Die verbleibenden Mikrogliazellen bei CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen bilden eine erhöhte Anzahl an verzweigten Fortsätzen aus, wohingegen die ortständigen Mikrogliazellen bei transgen negativen Kontrollen nicht verändert sind („Depletion“). Bei CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen ist gleichwohl eine zusätzliche Grenzlinie zu erkennen: sie trennt nämlich die übermäßig verzweigten Iba-1+Zellen von den neu eingewanderten. Im Vergleich zu Mikroglia haben diese wiederbesiedelnden Zellen in diesem frühen Stadium eine niedrigere Anzahl an geradlinigen, unverzweigten Fortsätzen, welche einen weiteren Durchmesser mit geringerer Ausdehnung aufweisen. Die zweiwöchige Unterbrechung der GCV-Gabe an CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen führt zu einer Wiederbesiedlung Iba-1+Zellen („Repopulation“). Die einwandernden Zellen verändern während des Repopulationsprozesses ihre Morphologie (vergleiche „Depletion“): Erhöht ist die Anzahl an Fortsätzen, welche stärker gewunden sind, sich häufiger verzweigen, einen geringeren Durchmesser aufzeigen und sich verstärkt ausweiten. **b)** Die stereologische Quantifizierung von Iba-1+Zellen im sensomotorischen Kortex von CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen zeigt eine deutliche Abnahme von Mikrogliazellen um >41 %, verglichen mit transgen negativen Kontrollen („Depletion“; \*\**P*<0.01). 14 Tage nach Beendigung der GCV-Behandlung steigt die Anzahl an Iba-1+ Zellen um >88 % bei CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen im Vergleich zu CCR2<sup>-/-</sup>>wt-Tieren („Repopulation“; \*\*\*\**P*<0.0001). Die stereologische Quantifizierung der Iba-1+Zellen markiert eine signifikante Erhöhung von >79 % bei CCR2<sup>-/-</sup> TK- versus CCR2<sup>-/-</sup>> wt-Tieren („Repopulation“; \*\*\*\**P*<0.0001).

### 4.2.3 Einfluss von Chimärismus und CCR2-Defizienz auf den Repopulationsprozess

Um die nicht rekonstituierte mit der rekonstituierten Situation zu vergleichen und um den Einfluss der CCR2-Defizienz im Repopulationsprozess zu veranschaulichen, gibt Abb. 9a einen Überblick über alle Paradigmen, in denen die Tiere mit dem „Depletions-Protokoll“ behandelt worden sind, und Abb. 9b gibt einen Überblick über alle Paradigmen, in denen Mäuse mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelt worden sind.

Wie bereits erwähnt, verringert die Behandlung von nicht rekonstituierten TK- gegen wt-Tiere mit dem „GCV-Depletions-Protokoll“ die Anzahl an Mikrogliazellen  $>68\%$  („Depletion“; Abb. 5c; \*\*\*\* $P<0.0001$ ). Dagegen ergibt die stereologische Analyse von Iba-1+ Zellen nach 10tägiger GCV-Gabe keinen signifikanten Unterschied bei Act.-GFP>TK-Mäusen, im Vergleich zu Act.-GFP>wt-Kontrollen („Depletion“; Abb. 6d; ns). Die Quantifizierung der Iba-1+ Zellen markiert eine Erhöhung um 8.241 Iba-1+ Zellen/mm bei Chimären-Act.-GFP>TK-Tieren, verglichen mit nicht rekonstituierten TK-Mäusen („Depletion“; Abb. 8a; \*\*\*\* $P<0.0001$ ). Dies entspricht in etwa der Anzahl an GFP+ Zellen/mm von etwa 7.213 bei Act.-GFP>TK-Mäusen in der „Depletionssituation“. Demzufolge ist der Anstieg an Iba-1+ Zellen in der rekonstituierten, verglichen mit der nicht rekonstituierten Situation, auf eine frühzeitige Einwanderung von peripheren Zellen aufgrund einer Störung der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen. Dies wiederum rührt her von der vorherigen ZNS Bestrahlungsprozedur (welche die Monozytenextravasation erleichtert), und ist nicht in einer etwa dysfunktionalen Depletion begründet. Zur Erinnerung: Nach 10tägiger GCV-Behandlung zeigt die stereologische Quantifizierung von Iba-1+ Zellen im sensomotorischen Kortex von CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen eine signifikante Verminderung von Mikrogliazellen um 41 %, verglichen mit Kontrolltieren („Depletion“; Abb. 8b; \*\* $P<0.01$ ). Bemerkenswerterweise führt die GCV-Behandlung von CCR2<sup>-/-</sup>>TK-Mäusen im Vergleich mit Act.-GFP > TK-Tieren zu einer signifikanten Verringerung der Iba-1+ Zellen um ca. 49 % („Depletion“; Abb. 8a; \*\*\*\* $P<0.0001$ ). Die CCR2-Defizienz bremst nun entsprechend im Knochenmark die beschleunigte Einwanderung von peripheren Zellen in der rekonstituierten Situation. Verdeutlicht wird diese Erkenntnis durch den Vergleich von CCR2<sup>-/-</sup>>TK- mit nicht rekonstituierten TK-Mäusen, führt er doch zu keiner Signifikanz an Iba-1+ Zellen im Neokortex („Depletion“; Abb. 8a; ns).

Nach zweiwöchiger Unterbrechung der Behandlung und nach initialer 10tägiger GCV-Gabe, steigt die Anzahl an Iba-1+ Zellen bei TK-Nagern, verglichen mit transgen negativen Kontrollen:

- in der nicht rekonstituierten Situation um 87 % („Repopulation“; Abb. 5d; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ),
- in der rekonstituierten Situation mit Knochenmarkszellen aus Act.-GFP -Tieren um annähernd 88 % („Repopulation“; Abb. 6d; \*\*\*\* $P < 0.0001$ )
- und in der rekonstituierten Situation mit Knochenmarkszellen aus CCR2<sup>-/-</sup> -Mäusen um 88 % („Repopulation“; Abb. 8b; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

Es gibt keinen signifikanten Unterschied bezogen auf die Anzahl an Iba-1+ Zellen im Neokortex zwischen nicht rekonstituierten TK-Mäusen, Chimären-Act.-GFP > TK- und Chimären-CCR2<sup>-/-</sup> > TK-Nagern („Repopulation“; Abb. 9b; ns). Es entsteht also ein Plateau an Iba-1+ Zellen, was gemeinsam mit den bereits gezeigten exemplarischen histologischen Fotos als vollendete Wiederbesiedlung des ZNS betrachtet werden kann.

Zusammenfassend ist also der zeitliche Verlauf der Repopulation bei Chimärismus und CCR2-Defizienz unterschiedlich, der Endpunkt dieses Prozesses bleibt jedoch immer derselbe.

Unabhängig von der Behandlung (Dauer der GCV-Applikation - „Depletion“, „Repopulation“ -/ bzw. nicht rekonstituierte oder rekonstituierte Situation) war das Niveau im Hinblick auf die Anzahl an Iba-1+Zellen bei wt-Tieren äquivalent zu allen anderen Kontrolltieren („Depletion“; „Repopulation“; Abb. 9a und 9b; ns).

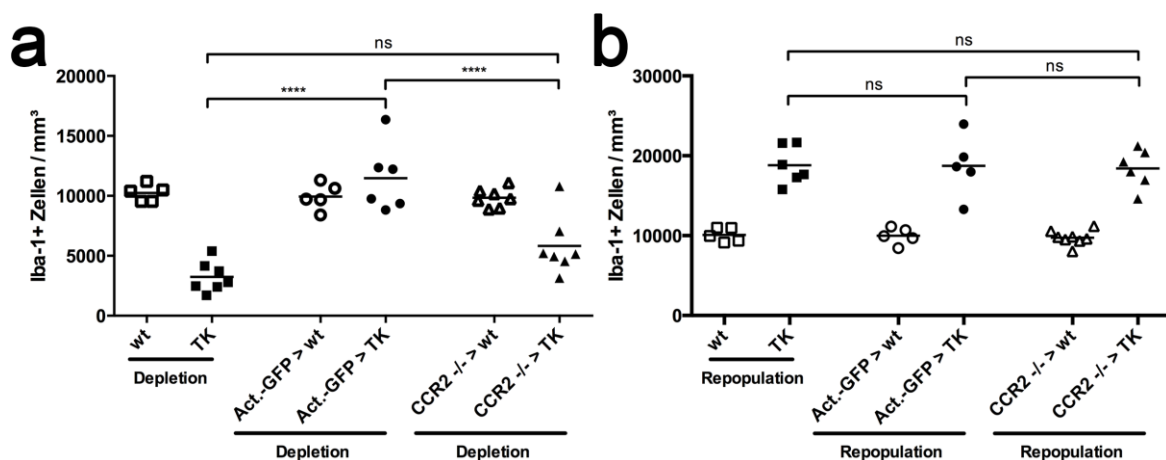


Abbildung 9: Einfluss von Chimärismus und CCR2-Defizienz auf den Repopulationsprozess

Um die nicht rekonstituierte mit der rekonstituierten Situation zu vergleichen und um den Einfluss der CCR2-Defizienz im Repopulationsprozess zu veranschaulichen, gibt Abb. 9a einen Überblick über alle Paradigmen, in denen die Tiere mit dem „Depletions-Protokoll“ behandelt worden sind, und Abb. 9b gibt einen Überblick über alle Paradigmen, in denen Mäuse mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelt worden sind. **a)** Die stereologische Quantifizierung zeigt eine Erhöhung der Iba-1+ Zellen um 8.241 Iba-1+ Zellen/mm bei Chimären-Act.-GFP>TK-Tieren, verglichen mit nicht rekonstituierten TK-Mäusen („Depletion“; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Die 10tägige GCV-Behandlung an CCR2<sup>-/-</sup> >TK-Mäusen versus Act.-GFP>TK-Tieren führt zu einem signifikanten Rückgang der Iba-1+ Zellen um ca. 49 % („Depletion“; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Keinen signifikanten Unterschied ergibt der Vergleich von Iba-1+ Zellen im Neokortex von Chimären-CCR2<sup>-/-</sup> >TK-Mäusen mit nicht rekonstituierten TK-Tieren („Depletion“; ns). **b)** Bezogen auf die Anzahl an Iba-1+ Zellen im Neokortex zwischen nicht rekonstituierten TK-Tieren, Chimären-Act.-GFP>TK- und Chimären-CCR2<sup>-/-</sup> >TK-Mäusen („Repopulation“; ns) gibt es keine signifikanten Unterschiede.

#### 4.2.4 Repopulation des ZNS bei kontinuierlicher GCV-Behandlung

Um zu untersuchen, ob periphere Zellen das ZNS auch unter kontinuierlicher GCV-Gabe wiederbesiedeln, und ob die zusätzliche Behandlung den Gesamtprozess verändert, ist Act.-GFP>TK- und Act.-GFP>wt-Knochenmark-Chimären dieses Medikament nach initialer 10tägiger hochdosierter Behandlung für weitere 14 Tage, bei reduzierter Dosis intracerebroventrikulär, verabreicht worden. Die 10tägige GCV-Gabe mit sich anschließender kontinuierlicher Stimulation für zwei Wochen an Chimären-Act.-GFP>TK-Mäusen führt zu einer robusten Wiederbesiedlung Iba-1+ Zellen über den gesamten Neokortex („Repopulation – kontinuierliches GCV“; Abb. 10a). In der exemplarischen Übersichtsdarstellung eines Act.-GFP>wt-Tieres wird der myeloische Ursprung der wiederbesiedelten Zellen verständlich, sind doch im Gegensatz zu Act.-GFP>TK-Mäusen keine GFP+ Zellen immunhistochemisch sichtbar. Die wiederbesiedelten Zellen besitzen die gleiche Morphologie wie die bei Act.-GFP>TK-Tieren eingewanderten, die mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelt worden sind (Abb. 6b): Es besteht eine geringe Anzahl an geradlinigen, kurzen Fortsätzen, die sich selten verzweigen und einen geringeren Durchmesser aufweisen als gewöhnliche Mikrogliazellen. Die stereologische Quantifizierung von Iba-1+ Zellen im sensomotorischen Kortex von Act.-GFP>TK-Mäusen nach 10tägiger GCV-Behandlung und sich anschließender kontinuierlicher Stimulation führt zu einem signifikanten Anstieg von Iba-1+ Zellen um 99 %, verglichen mit denen der Act.-GFP>wt-Tiere („Repopulation – kontinuierliches GCV“; Abb. 10b; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ). Die Anzahl an GFP+ Zellen steigt unterdessen um 1.578 % bei transgen positiven Mäusen, verglichen mit transgen negativen Kontrollen („Repopulation -

kontinuierliches GCV“; Abb. 10c; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Bei Act.-GFP>TK Mäusen werden keinen signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl an GFP+ - und Iba-1+ Zellen festgestellt („Repopulation - kontinuierliches GCV“; Abb. 9d; ns).

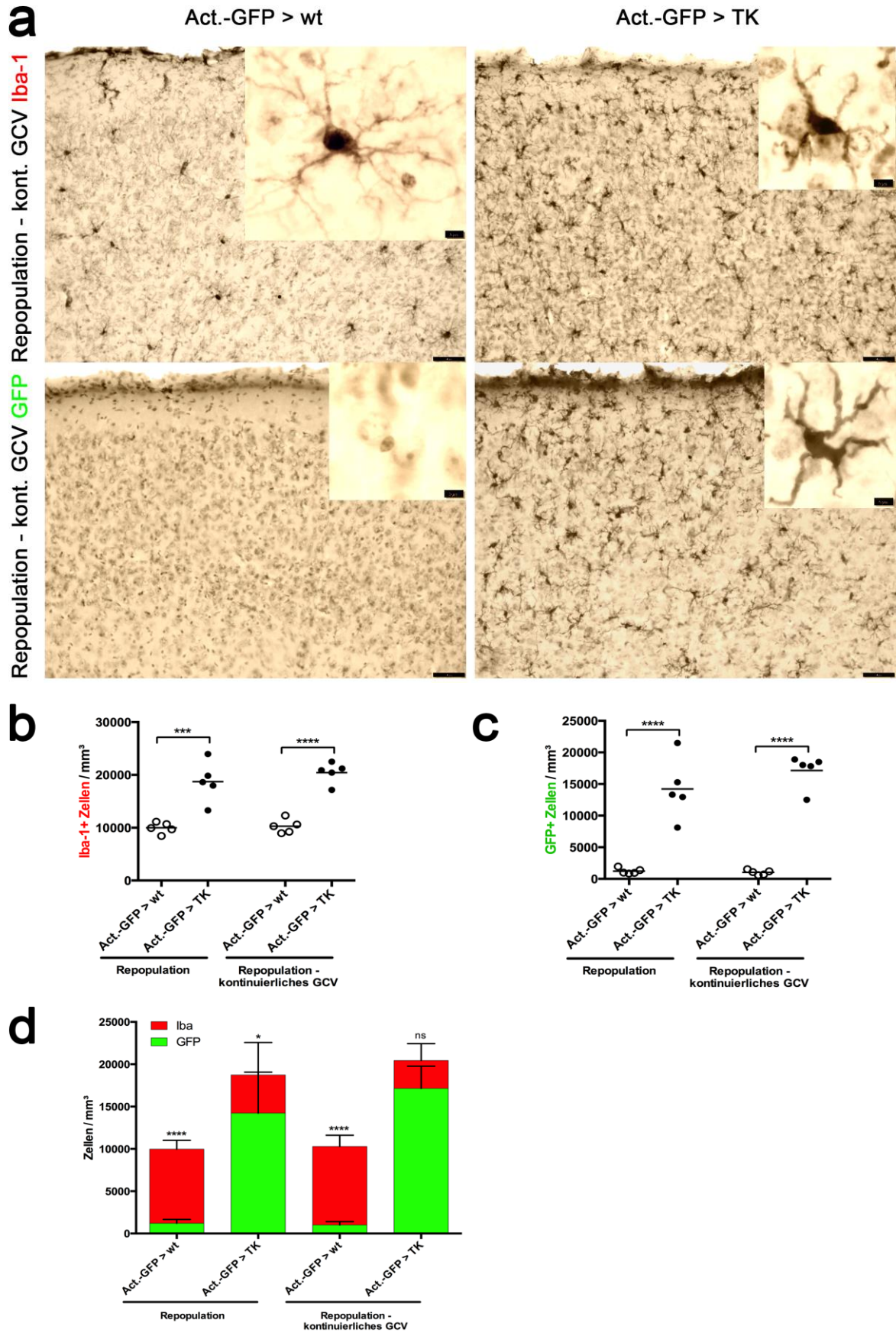


Abbildung 10: Repopulation des ZNS bei kontinuierlicher GCV-Behandlung



Zunächst wird das Knochenmark von TK- und wt-Mäusen durch Knochenmarkszellen von GFP exprimierenden Mäusen ersetzt. Zusätzlich werden Act.-GFP>TK- und Act.-GFP>wt-Mäuse ebenfalls 10 Tage mit GCV (2.5 mg/ml; 1 µl/h) behandelt; anschließend implantierten wir eine zweite Pumpe mit einer niedrigeren Durchflussrate von 0,25 µl/h, bei gleichbleibender GCV-Dosierung (2.5 mg/ml), für weitere zwei Wochen („Repopulation – kontinuierliches GCV“). **a)** Die 10tägige GCV-Behandlung mit ergänzend kontinuierlicher Stimulation für zwei Wochen an Chimären- Act.-GFP>TK-Mäusen führt zu einer Wiederbesiedelung Iba-1+ Zellen über den gesamten Neokortex („Repopulation – kontinuierliches GCV“). In der exemplarischen Übersichtsdarstellung eines Act.-GFP>wt-Tieres wird der myeloische Ursprung der repopulierenden Zellen evident, da im Gegensatz zu Act.-GFP>TK-Mäusen keine GFP+ Zellen erkennbar sind. **b)** Die stereologische Quantifizierung von Iba-1+ Zellen im sensomotorischen Kortex von Act.-GFP>TK-Mäusen nach 10tägiger GCV-Behandlung und anschließender Stimulation führt zu einem signifikanten Anstieg von Iba-1+ Zellen um 99 %, verglichen mit Act.-GFP>wt-Tieren („Repopulation - kontinuierliches GCV“; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). **c)** Die Anzahl an GFP+ Zellen steigt unterdessen 1.578 % in der immunhistochemischen Analyse bei transgen positiven Mäusen, („Repopulation – kontinuierliches GCV“; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). **d)** Verglichen mit transgen negativen Kontrollen bei Act.-GFP>TK-Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl an GFP+ Zellen und Iba-1+ Zellen („Repopulation – kontinuierliches GCV“; ns).

### **4.3 Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher einwandernden myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell**

Um den Einfluss von peripher einwandernden myeloischen Zellen auf die cerebralen beta-Amyloid Plaques im Neokortex von 190 Tagen alten APPPS1-wt- und APPPS1-TK-Mäusen zu untersuchen, zeigt Abb. 11a, wie mittels Kongorot-Färbung des Neokortexes von Tieren, denen für 10 Tage intracerebroventrikuläres GCV verabreicht wird, um sie anschließend zu töten („Depletion“), oder, um sie vier Wochen weiterzuleben zu lassen („Repopulation“), oder, um sie weitere vier Wochen bei niedrigerer Dosierung dieses Medikaments zu behandeln („Repopulation – kontinuierliches GCV“). Die morphometrische Quantifizierung zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Kongorot bedeckten Fläche [%] an APPPS1-wt-Tieren versus APPPS1-TK-Mäusen („Depletion“; „Repopulation“; „Repopulation – kontinuierliches GCV“; Abb. 11b; ns).

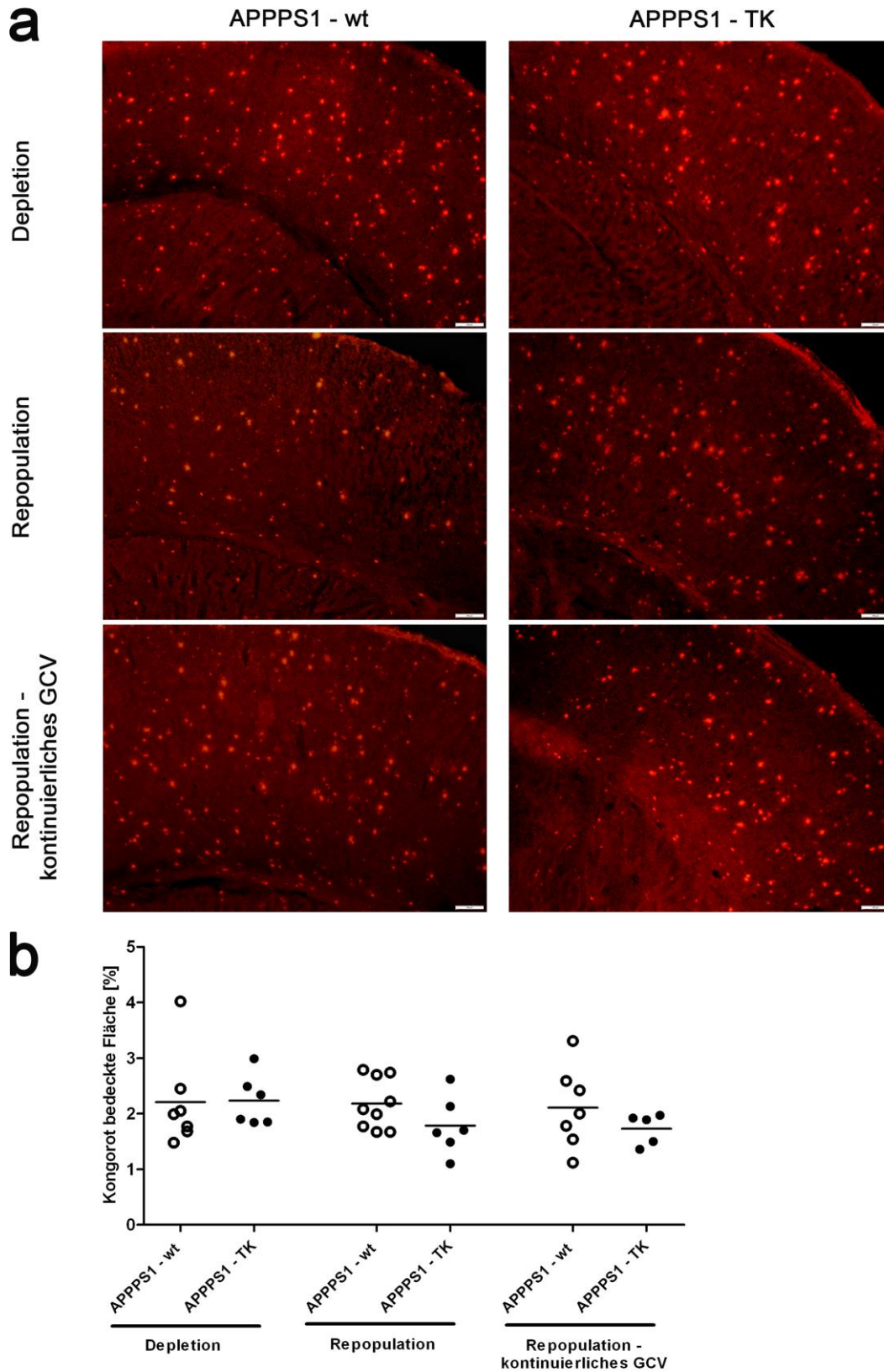


Abbildung 11: Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher einwandernden myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell

APPPS1-wt- und APPPS1-TK-Mäusen werden für 10 Tage intracerebroventrikuläres GCV verabreicht, um anschließend getötet zu werden („Depletion“), oder um vier Wochen weiterzuleben („Repopulation“), oder um weitere vier Wochen bei niedrigerer Dosierung dieses Medikaments behandelt zu werden („Repopulation – kontinuierliches GCV“). **a)** Diese mittels Kongorot angefärbten Abbildungen veranschaulichen den Neokortex von APPPS1-TK- und APPPS1-wt- Tieren, die mit dem „Depletions-“, „Repopulations-“ und „Repopulation – kontinuierliches GCV“-Protokoll behandelt worden sind. **b)** Die morphometrische Quantifizierung zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Kongorot bedeckten Fläche [%] bei APPPS1-wt- im Vergleich mit APPPS1-TK-Mäusen („Depletion“; „Repopulation“; „Repopulation - kontinuierliches GCV“; ns).

## 5. DISKUSSION

Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten zur Funktion von Mikrogliazellen und peripheren Makrophagen ist deren Rolle bei der Krankheitsentstehung/-progression pathologischer Gehirnprozesse nicht selten weitgehend unbekannt. Dies lässt sich u. a. darauf zurückführen, dass nur wenige nützliche in-vivo Methoden zur Verfügung stehen, um den Einfluss dieser knochenmarksabstammenden Zellen auf ZNS-Pathologien genauer untersuchen zu können. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Möglichkeit auf, mit Hilfe der CD11b-HSVTK-Maus das endogene Immunsystem eines Säugergehirns zu ersetzen: Die Unterbrechung der Ganciclovir-Behandlung nach initialer Depletion in diesem Tiermodell führt zu beinahe vollständigem Austausch ortständiger Mikrogliazellen mit von peripher rekrutierten myeloischen Zellen. Das bloße Vorhandensein dieses „Repopulations-Phänomens“ belegt: Mikrogliazellen sind unverzichtbar im Gehirnmilieu des Tieres und es verdeutlicht, wie sich der Organismus auf Veränderungen einstellt, um diese Zellpopulation aufrecht erhalten zu können. Letztlich wird die Anwendbarkeit dieser neuartigen Methode zum Studium von ZNS Pathologien aufgezeigt. Vor diesem Hintergrund haben wir den Einfluss dieses Eingriffs in die Mikroglia-Physiologie auf die cerebrale Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell untersucht.

### 5.1 Mikrogliazelldepletion gefolgt von Repopulation Iba-1+ Zellen

Diese Arbeit beschreibt das sogenannte Repopulations-Phänomen, nämlich die initiale Mikrogliazelldepletion, die anschließend zu einer Wiederbesiedlung der Mikrogliapopulation führt. Das ortsansässige Immunsystem des Gehirns wird bei TK-Mäusen zu 70% depletiert, worauf hin sich in den folgenden zwei Wochen ohne Behandlung - im Vergleich zu transgen negativen Kontrolltieren - die Anzahl an Iba-1+ Zellen um beinahe 90% erhöht. Tatsächlich kann sogar von einer funktionell noch höheren Depletion bei TK-Tieren ausgegangen werden, da die verbleibenden Mikrogliazellen nach 10tägiger GCV-Gabe eine erhöhte Anzahl verzweigter Fortsätze aufweisen, was auf einen apoptotischen Phänotyp dieser Zellen hindeutet. Iba-1-positive Zellen verteilen sich gleichmäßig über den gesamten sensomotorischen Kortex und auch über sämtliche subkortikale Hirnregionen. Diese ebene Verteilung wiederbesiedelter Zellen über das ZNS ist ein deutliches Indiz, dass die Zellen durch spezifische Regulationsmechanismen in ihre ihnen zugeordneten Positionen navigiert worden sind. Eine mikroglialische Zellpopulation wird demnach allorts im Gehirn

benötigt. Diese frisch wiederbesiedelten Iba-1+ Zellen haben einen prominenten Zellkörper mit kurzen, gedrungenen Fortsätzen, was auf deren monozytären Charakter hinweist.

Ergänzend besitzen unbehandelte TK- und wt-Mäuse ein fast gleiches Niveau an Mikrogliazellen/mm im Neokortex *und* sie entsprechen zudem ziemlich exakt der Iba-1+ Zelldichte von wt-Tieren nach 10tägiger GCV-Behandlung. Folglich unterscheiden sich transgene und nicht transgene Tiere in der Mikrogliazelldichte *nicht*. Ferner ist festzustellen: die Implantation einer Minipumpe mit nachfolgender GCV-Applikation an wt-Mäusen hat keinen Einfluss auf die Anzahl der Iba-1+ Zellen.

Auch bei *PU.1*<sup>-/-</sup>-Mäusen<sup>‡</sup> ist ein Repopulations-Modell bereits etabliert worden, und das, obwohl sie keine Mikrogliazellen besitzen. Bedeutsam ist, dass – im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Repopulations-Phänomen – das von Mikroglia unbewohnte Gehirn in diesem Mausmodell jedoch erst nach Transplantation mit Wildtyp-Knochenmark durch zirkulierende Monozyten und Gewebsmakrophagen wiederbesiedelt wird [61]. Die Erfahrungen mit diesem Tiermodell verdeutlichen, wie schwierig es ist, die langfristigen Konsequenzen der Mikrogliazelldepletion bei ZNS-Pathologien zu untersuchen, da *PU.1*<sup>-/-</sup>-Tiere ohne Knochenmarkstransplantation früh in ihrem Leben sterben [61, 62]. Auch die CD11b-HSVTK-Maus stirbt nach längerer systemischer GCV-Behandlung aufgrund der Myelotoxizität [47, 52], während sich eine kurzzeitige *intracerebroventrikuläre* GCV-Behandlung unter kontrollierten und pathogen-freien Bedingungen im gleichen Mausmodell als nicht schädlich herausgestellt hat [52]. Auch wenn in beiden Modellen hämatopoetische Nebenwirkungen hauptverantwortlich für den letalen Phänotyp sind, so ist es doch vorstellbar, dass die längerfristige Eliminierung von Mikroglia ebenfalls negative Auswirkungen auf die ZNS Homeostase besitzen könnte. Im Gegensatz zu von Mikroglia unbesiedelten Gehirnen bei nicht transplantierten *PU.1*<sup>-/-</sup>-Tieren scheinen sowohl bei knochenmarkstransplantierten *PU.1*<sup>-/-</sup>-Mäusen [61] als auch bei unserem Modell an CD11b-HSVTK-Tieren – bei denen das Gehirn durch myeloische Zellen für zwei Monate, oder von anderen für 27 Wochen repopuliert worden ist [45] – keine Gesundheitsprobleme aufzutreten. Demzufolge weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich die wiederbesiedelten Zellen nicht nur wie Mikroglia gleichmässig über das gesamte ZNS verteilen, sondern darüber hinaus – aufgrund der guten

---

<sup>‡</sup> *PU.1* ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Mikroglia-genese im extraembryonalen Dottersack eine wichtige Rolle einnimmt [11].

physischen Verfassung der Tiere über einen derart langen Behandlungszeitraum – deren Homeostasefunktion im Gehirn übernehmen.

## **5.2 Repopulations-Phänomen – Austausch ortständiger Mikroglia mit peripher rekrutierten myeloischen Zellen**

Um die Herkunft des Repopulations-Phänomens, also die Möglichkeit einer endogenen Wiederbesiedlung des Säugergehirns versus einer von peripher ausgehenden Wanderungsbewegung von myeloiden Zellen zu analysieren, ist das Knochenmark von TK- und wt-Mäusen mit Knochenmarkszellen von GFP exprimierenden Tieren rekonstituiert worden. Anschließend sind die Chimären-Tiere schließlich mit dem „Depletions-“, bzw. „Repopulations-“ GCV-Protokoll behandelt worden.

Der beschleunigte zeitliche Verlauf der Repopulation in der Chimären-Situation wird verständlich, weil die stereologische Analyse von Iba-1+ Zellen keinen signifikanten Unterschied bei Act.-GFP>TK-Mäusen im Vergleich zu transgen negativen Kontrollen nach 10tägiger GCV-Applikation ergibt. Im Gegensatz dazu ist das ortsansässige Immunsystem des Gehirns bei nicht rekonstituierten TK-Mäusen zu 70% depletiert gewesen. Bereits in der „Depletionssituation“ bei Act.-GFP>TK-Mäusen befinden sich 7.213 GFP+ Zellen/mm im Nagergehirn; jedoch sind zum selben Zeitpunkt nur 1.310 GFP+ Zellen/mm in entsprechenden Kontrolltieren vorhanden. Das gleiche Niveau an Iba-1+ Zellen erklärt sich demnach in Zusammenschau mit den histologischen Abbildungen in der „Depletionssituation“ bei Act.-GFP>TK-Mäusen (eine Trennlinie separiert die Iba-1+ Zellen mit monozytärem Phänotyp, die größtenteils auch GFP-positiv sind, von übermäßig verzweigten [apoptotischen] Mikrogliazellen): eine Mikrogliazelldepletion hat auch bei Chimären-Mäusen stattgefunden – jedoch sind bei der „Chimären-Depletionssituation“ periphere myeloische Zellen (die sowohl Iba-1-positiv, als auch GFP-positiv sind) beschleunigt eingewandert. Veranschaulicht wird diese beschleunigte Einwanderung (da in der nicht rekonstituierten Situation noch keine Zellen eingewandert sind), indem die 7.213 GFP+ Zellen/mm von den 11.476 Iba-1+ Zellen/mm bei Act.-GFP>TK-Mäusen in der „Depletionssituation“ subtrahiert werden. Dies ergibt 4.263 Zellen/mm, was wiederum in etwa dem Niveau der verbleibenden Mikrogliazellen bei TK-Tieren in der nicht rekonstituierten „Depletionssituation“ entspricht (3.235 Iba-1+ Zellen/mm).

Das tragende Fundament der Repopulation zeigt sich bei Act.-GFP>TK-Mäusen in einem signifikanten Anstieg der Zelldichte um 7.263 Iba-1+ Zellen/mm<sup>2</sup>, vom „Depletions“- zum „Repopulationszeitpunkt“. Bemerkenswerterweise kommt es bei Act.-GFP>TK-Tieren im selben Zeitintervall ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg um 7.015 GFP+ Zellen/mm<sup>2</sup>. Weil sich sowohl Iba-1+ Zellen als auch GFP+ Zellen in diesem zweiwöchigen Zeitabschnitt um die beinahe gleiche Zellanzahl/mm<sup>2</sup> erhöhen und da fast alle GFP+ Zellen auch Iba-1+ sind (siehe gelbes Fusionsignal der zwei Fluoreszenzmarker Iba-1/GFP bei Act.-GFP>TK-Tieren in Abb. 7b), kann die Erhöhung der Iba-1+ Zellen nur durch GFP+ Zellen verursacht werden. Es handelt sich um dieselben Zellen. Damit wird der Repopulationsprozess bei Chimären-Tieren maßgeblich durch *aus der Peripherie einwandernde* Zellen getragen („Depletion“ und „Repopulation“). Darüber hinaus wird die periphere Genese des Repopulationsprozesses wie folgt veranschaulicht: bei Act.-GFP>TK-Mäusen, behandelt mit dem GCV- „Repopulations“-Protokoll, wandern morphologisch distinkte Iba-1+ Zellen über den gesamten Neokortex ein. Die Übersichtsdarstellung eines Act.-GFP>wt-Tieres, ebenfalls behandelt mit dem „Repopulations-Protokoll“, verdeutlicht den myeloischen Ursprung der repopulierenden Zellen, da gegensätzlich zu Act.-GFP>TK-Mäusen keine GFP+ Zellen immunhistochemisch sichtbar sind. Grundsätzlich zeigen die Experimente an GFP-positiven Knochenmark-Chimären, dass der fast vollständige Austausch ortständiger Mikrogliazellen mit von peripher infiltrierenden myeloischen Zellen möglich ist.

Bei Act.-GFP>Wildtyp-Mäusen sind erwartungsgemäß sowohl nach GCV-Gabe mit dem „Depletions“- als auch mit dem „Repopulations“- Behandlungsschema, ortsansässige Mikrogliazellen nicht depletiert, bzw. kaum GFP+ Zellen eingewandert. Bereits das Vorhandensein von GFP+ Zellen bei „nicht behandelten“ Act.-GFP > wt-Mäusen zeigt jedoch: Der Chimärismus alleine ist für einen gewissen Anteil von GFP+ Zellen bei transgen negativen Tieren verantwortlich. Die wenigen von peripher eingewanderten Zellen (1 %) im nicht transgenen Mausmodell sind wohl aufgrund der Bestrahlungsprozedur – und der damit einhergehenden Schädigung der BHS – ins Gehirnparenchym infiltriert. Das prozentuale Verhältnis der Marker (GFP+ Zellen / Iba-1+ Zellen x 100) ergibt eine signifikante Erhöhung um 11,1 % von „nicht behandelten“ Act.-GFP>wt-Mäusen im Vergleich zu den mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Tieren. Demzufolge ist auch die Minipumpenimplantation für einen Anteil der von peripher eingewanderten Zellen bei transgen negativen Tieren verantwortlich und erhöht wiederum in Kombination mit dem Chimärismus den Anteil an GFP+ Zellen bei Chimären-wt-Mäusen signifikant. Weiterführend

haben unbehandelte Act.-GFP>TK-Tiere und Act.-GFP>wt-Mäuse ein fast gleiches Niveau an GFP+ Zellen/mm im Neokortex. Ergo unterscheiden sich transgene und nicht transgene Tiere in ihrer Anzahl an GFP+ Zellen nach Knochenmarkstransplantation *nicht*. Interessanterweise nimmt der Anteil an GFP+ Zellen um 6,5 % bei den mit „Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Mäusen im Vergleich zu denen mit dem „langfristigen Repopulations-Protokoll“ behandelten Act.-GFP>wt-Tieren ab. Infolgedessen verschwinden die primär von peripher eingewanderten Zellen nach längerer Behandlungspause in der nicht transgenen Maus teilweise wieder.

Bereits bekannt ist, dass letale Bestrahlungen erheblich die Integrität der Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigen [22, 23]. Bei der monozytären Infiltration im Autoimmun-Enzephalitis-Mausmodell wird eine neuartige Parabiosetechnik verwendet: Dabei kann auf die Gewinnung des Knochenmarks mit anschließender Injektion verzichtet werden. Im Rahmen dessen findet in diesem Mausmodell mit entsprechenden Manipulationen ausschließlich eine rein transiente Besiedlung von peripheren myeloischen Zellen des ZNS ohne langfristige Beteiligung am Mikrogliabestand statt [21]. Hingegen beteiligen sich periphere Zellen dauerhaft am Mikroglia pool im Kontext einer klassischen Knochenmarkstransplantation. Dies ist auf die Injektion von undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen in den Blutkreislauf des Empfängertieres zurückzuführen, die bei der Gewinnung des Knochenmarks zwangsweise herausgespült werden [16, 21]. Erweiternd deuten unsere Daten nun darauf hin: Im Zusammenhang mit einer klassischen Knochenmarkstransplantation existiert sowohl eine vorübergehende Besiedlung von peripheren monozytären Zellen, die nicht dauerhaft zum Mikrogliabestand beiträgt (signifikanter Abfall des prozentualen Verhältnisses von 12,1 % in der „Repopulationssituation“ zu 5,6 % in der „langfristigen Repopulationssituation“ bei Act.-GFP>wt-Tieren), als auch eine langfristige Infiltration von GFP+ Zellen, die wohl aus der Injektion von undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen in den Blutkreislauf des Empfängertieres resultiert (weiterhin bestehender Anteil von 5,6 % GFP+ Zellen in der „langfristigen Repopulationssituation“ bei Act.-GFP>wt-Mäusen).

Damit weicht die Sachlage vom transgenen Repopulations-Phänomen ab: In dieser Analogie gibt es keinen signifikanten Unterschied am Anteil von GFP+ Zellen zwischen der „Repopulationssituation“ zur „langfristigen Repopulationssituation“ bei Act.-GFP>TK-Mäusen. Hierbei handelt es sich fraglos nicht ausschließlich um eine langfristige Besiedlung von undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen, sondern es zeigt sich eine dauerhafte



monozytäre Repopulation des ZNS: Diese peripheren Makrophagen sind wohl essentiell für das Überleben des Tieres und bevölkern nachhaltig das Säugergehirn. Andere haben zwar im gleichen Mausmodell ebenfalls eine Wiederbesiedlung durch periphere myeloische Zellen erreicht. Jedoch konnten sie nur einen definitiven Nachweis der Repopulation für einen Zeitraum von zwei Wochen erbringen [45]. Wie beschrieben, handelt es sich in unserer Arbeit um einen nachhaltigen Ersatz des endogenen Immunsystems; es weicht damit auch von der kurzzeitigen Besiedlung von myeloiden Zellen des ZNS in einem Autoimmun-Enzephalitis-Mausmodell ohne langfristige Beteiligung am Mikrogliabestand ab [21]. Diese zeitlich limitierte Präsenz von aus der Peripherie stammenden myeloischen Zellen im Gehirn kann am besten als eine vorübergehende Gewebereaktion auf unterschiedliche Arten von Entzündungen und/oder Verletzungen beschrieben werden. Unsere Daten belegen also, dass einwandernde myeloische Zellen nur langfristig im ZNS verbleiben, sofern keine Mikrogliazellen mehr vorhanden sind, und sie augenscheinlich deren Homeostasefunktion übernehmen müssen.

### **5.2.1 Herkunft der wiederbesiedelten Iba-1+ Zellen bei nicht rekonstituierten Mäusen**

Der sichere Nachweis der Herkunft wiederbesiedelter Iba-1+ Zellen bei nicht rekonstituierten TK-Mäusen, also die Möglichkeit einer endogenen Wiederbesiedlung des Säugergehirns versus einer von peripher ausgehenden Wanderungsbewegung von myeloischen Zellen, muss allerdings bei dieser Arbeit ausbleiben: Definitiv auszuschließen ist es nämlich nicht, dass die durch periphere myeloische Zellen stattfindende Wiederbesiedlung nur im Kontext einer klassischen Knochenmarkstransplantation und im Rahmen der Pumpenimplantation erfolgen kann.

Es gibt indessen zahlreiche Indizien, die auf eine periphere Genese der Wiederbesiedlung bei nicht rekonstituierten TK-Mäusen in der „Repopulationssituation“ hinweisen: Die monozytäre Morphologie der wiederbesiedelten Zellen unterscheidet sich nach 10tägiger GCV-Applikation und sich anschließender zweiwöchiger Unterbrechung der Behandlung bei nicht rekonstituierten Tieren im Vergleich zu Chimären-TK-Mäusen nicht (vergleiche Abb. 5b und Abb. 6b). Ergo lässt sich annehmen, dass auch bei nicht rekonstituierten Tieren eine periphere Genese dieser Zellen am Wahrscheinlichsten ist. Unterstützend deutet alleine die monozytäre Morphologie der wiederbesiedelten Zellen bei nicht rekonstituierten Tieren auf eine

Knochenmarksabstammung hin, da Blutmonozyten kurzlebig sind und kontinuierlich durch Vorläuferzellen hämatopoetischer Stammzellen ersetzt werden [63]. Zudem zeigt auch die Plateaubildung, bezogen auf die Dichte an Iba-1+ Zellen in der sogenannten „Repopulationssituation“ zwischen nicht rekonstituierten TK-Mäusen (18.818 Zellen/mm<sup>3</sup>) und Chimären-TK-Tieren (18.740 Zellen/mm<sup>3</sup>), dass sich beide Fälle, bezogen auf den Zeitpunkt – an dem der Wiederbesiedlungsprozess ausgeführt ist – in der Anzahl an neuartigen Zellen gleichen (Abb. 9b). Daraus ließe sich schließen: da identisch viele Zellen das Gehirn wiederbesiedeln, könnte es sich wahrscheinlich um ein- und dasselbe Phänomen handeln. Überdies muss sich auch die Zeitachse der Repopulation jedenfalls zu einem gewissen Grad ähneln, da nach 14tägiger GCV-Behandlungsunterbrechung der Wiederbesiedlungsprozess in beiden Situationen (nicht rekonstituierte versus rekonstituierte) vollständig abgeschlossen ist. Zuletzt ist auch die Verteilung der wiederbesiedelten Zellen in subkortikalen Regionen und Neokortex der nicht rekonstituierten und rekonstituierten TK-Tiere in der „Repopulationsgruppe“ homogen. Zusammenfassend weist die starke Kongruenz der nicht rekonstituierten und der rekonstituierten Situation in Bezug auf Zellmorphologie, Anzahl und Verteilung der Zellen, sowie der identische Zeitpunkt der Plateaubildung der Repopulation auf eine gemeinsame Herkunft der wiederbesiedelten Zellen hin. Abschließend indes ist diese Fragestellung nicht zu beantworten, da bei Knochenmark-Chimären normalerweise nicht im Blut zirkulierende Vorläuferzellen mit speziellen Stammzeleigenschaften injiziert werden, was einem nicht-physiologischen Zustand entspricht [21]. Darüber hinaus führt die Pumpenimplantation, welche zur *intracerebroventrikulären* Gabe des Ganciclovir notwendig ist, auch zu einem fokalen Defekt der BHS. Der Eintritt peripherer Zellen in das ZNS im Rahmen der sogenannten „transgenen Repopulationssituation“ geschieht nicht nur um den Stichkanal herum, sondern erfolgt an mehreren Stellen entlang der rostral-kaudalen Achse im gleichen Mausmodell, weshalb die Pumpenimplantation wahrscheinlich über keinen entscheidenden Einfluss auf den Wiederbesiedlungsprozess verfügt [45]. Um diese Fragestellung nunmehr definitiv beantworten zu können, müssen in Zukunft Experimente mit der Parabiosetechnik, also dem Zusammennähen von GFP exprimierenden Tieren und TK-Mäusen, unter Verzicht auf Durchspülung des Knochenmarks und Injektion der geernteten Zellen, und sich anschließender Behandlung mit dem „Depletions-Protokoll“ und dem „Repopulations-Protokoll“ durchgeführt werden.

## 5.2.2 Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen

Bei Act.-GFP>TK-Tieren, die mit dem „Depletions-Protokoll“ behandelt worden sind, ist die fast komplette Mikrogliazellablation im sensomotorischen Cortex zu erkennen. Ergänzend ist jedoch eine Demarkationslinie festzustellen, die die übermäßig verzweigten Iba-1+ Zellen (apoptotische Mikrogliazellen) von neu-eingewanderten Zellen mit monozytärem Phänotyp abtrennt. Im Vergleich zu den ortsansässigen Mikroglia bei transgen negativen Kontrolltieren haben diese infiltrierenden, peripheren Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt der Repopulation eine niedrigere Anzahl an geradlinigen, unverzweigten Fortsätzen, welche einen weiteren Durchmesser mit geringerer Ausdehnung aufweisen. Während des Aufenthalts der wiederbesiedelten Zellen im ZNS vermehren sich deren Fortsätze – auch der Grad der Verzweigung, die Anzahl der Windungen, sowie die Ausdehnung der Ausläufer nehmen zu. Zusätzlich wird der Durchmesser der Zellausläufer immer geringer, so dass sich die zu anfangs monozytäre Morphologie der initial eingewanderten Zellen immer mehr den ortsansässigen Mikrogliazellen angleicht (vergleiche exemplarische Bilder von Act.-GFP>TK-Mäusen aus Abb. 6a, Abb. 6b und Abb. 6c in 60facher Vergrößerung).

Blutmonozyten sind kurzlebig und werden kontinuierlich durch Vorläuferzellen hämatopoetischer Stammzellen ersetzt [63]. Das aktuelle Modell zur Entstehung des hämatopoetischen Systems schlägt vor, dass hämatopoetische Stammzellen (HSCs) vom dorsalen Endothel der Aorta aus der aorto-gonadalen-mesonephrischen Region (AGM) in einer vom Transkriptionsfaktor „Runx1-abhängigen“ Weise entstammen [64, 65]. Dieser Prozess findet in Mäuseembryonen am Tag 10.5 (E10.5) nach Fecundatio statt [66]. Weitere Transkriptionsfaktoren spielen in der Entwicklung auch eine wichtige Rolle: Entdeckt worden ist der Faktor Myb an Orten der HSCs-Entstehung in der AGM [9, 10]. Myb wird auch durch HSCs in Hühnern, Mäusen und Menschen exprimiert [67]. Myb defizientes AGM und fetale Leber haben keine HSC-Aktivität [68] und Myb defiziente Mäuse besitzen keine HSC-abhängigen Erythrozyten und sterben an Anämie zwischen E15 und E17 [13, 69-71]. Interessanterweise repräsentieren im ZNS ansässige Mikroglia allerdings eine eigenständige Zellpopulation, die von Myb-unabhängigen, jedoch PU.1-abhängigen Vorläuferzellen im extraembryonalen Dottersack abstammt und die das sich entwickelnde Gehirn des Mausembryos um den Tag 8.5 (E8.5) besiedelt [12, 13]. Gerade erst kürzlich ist gezeigt worden, dass Gewebemakrophagen des Gehirns, der Leber, der Lunge und der Haut eine

gemeinsame Herkunft haben und von Tie2-exprimierenden erythromyeloiden Vorläuferzellen (EMP) abstammen [14]. Es handelt sich also bei Mikrogliazellen und von HSCs abstammenden Blutmonozyten um zwei voneinander unabhängige Zellpopulationen, die sowohl einen unterschiedlichen Entstehungsort und -zeitpunkt im Mausembryo besitzen, als auch in ihrer Entwicklung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren abhängig sind. Trotz der o. g. Differenzen dieser Zellpopulationen gibt diese Arbeit Hinweise darauf, dass sich Myb abhängige monozytäre Zellen über Zeit morphologisch und funktionell an die gewebsspezifischen Erfordernisse des ZNS anpassen können und sich den Myb-unabhängigen, PU.1-abhängigen, aus dem extraembryonalen Dottersack abstammenden Mikrogliazellen über Zeit angleichen können. Diese neuartige Methode der Repopulation kann nun als Fundament dienen, die verschiedenen funktionellen Aspekte zwischen Mikroglia und peripher einwandernden myeloischen Zellen im Gehirn zu untersuchen. Beispielsweise könnte erforscht werden, was die ZNS spezifischen Regulatoren des klassischen Mikroglia-Phänotyps sind.

### 5.2.3 Einfluss des CCL2/CCR2-Signalweges und des Chimärismus auf den zeitlichen Verlauf des Repopulationsprozesses

Um die Hypothese zu testen, ob das Einwandern von peripheren myeloischen Zellen in das von Mikroglia befreite Gehirn durch den CCL2/CCR2-Signalweg vermittelt wird, sind Chimäre-TK-Mäuse mit CCR2 defizientem Knochenmark hergestellt worden (CCR2<sup>-/-</sup> >TK). Bei CCR2<sup>-/-</sup> >TK-Tieren, die mit dem „Depletions-Protokoll“ behandelt worden sind, tritt eine Demarkationslinie auf, die die übermäßig verzweigten Iba-1+Zellen von den neu eingewanderten Zellen mit monozytärem Phänotyp trennt. Deutlich wird die periphere Genese dieser morphologisch eindeutig zuzuordnenden Iba-1+ Zellen im Vergleich mit Abb. 6a (also der „Depletionssituation“ bei Act.-GFP>TK-Mäusen): diese Zellen sind GFP-positiv und damit myeloischen Ursprungs. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, reduziert die Behandlung von nicht rekonstituierten TK- versus wt-Tieren mit dem „GCV-Depletions-Protokoll“ die Anzahl an Mikrogliazellen um etwa 70 %. Dieses Behandlungsschema hingegen, angewandt auf Chimäre-Act.-GFP>TK-Mäuse versus transgen negativer Kontrollen, führt zu keinen signifikanten Unterschieden an Iba-1+Zellen/ mm<sup>3</sup>. Die stereologische Quantifizierung zeigt die Erhöhung der Iba-1+ Zellen von 8.241 Iba-1+ Zellen/mm bei Chimären-Act.-GFP>TK-Tieren, verglichen mit nicht rekonstituierten TK-

Mäusen, jeweils behandelt mit dem „Depletionsschema“. Dies entspricht in etwa der Anzahl an GFP+ Zellen/mm<sup>2</sup> von etwa 7.213 bei Act.-GFP>TK-Mäusen in der „Depletionssituation“. Folglich ist der Anstieg an Iba-1+ Zellen in der rekonstituierten, verglichen mit der nicht rekonstituierten Situation, auf eine beschleunigte Einwanderung von peripheren Zellen aufgrund einer Störung der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen. Ursächlich ist dies auf die ZNS Bestrahlungsprozedur (welche die Monozytenextravasation erleichtert) zurückzuführen, und eben nicht auf eine etwa dysfunktionale Depletion. Nach 10tägiger GCV-Behandlung zeigt die stereologische Quantifizierung von Iba-1+ Zellen im sensomotorischen Kortex von CCR2<sup>-/-</sup> >TK-Mäusen eine deutliche Reduktion von Mikrogliazellen um annähernd 41 %, verglichen mit Kontrolltieren. Interessanterweise führt die GCV-Behandlung an CCR2<sup>-/-</sup> >TK-Mäusen versus Act.-GFP>TK-Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Iba-1+ Zellen um etwa 49 % (siehe Abb. 9a). In der rekonstituierten Situation bremst nun die CCR2-Defizienz im Knochenmark die beschleunigte Einwanderung von peripheren Zellen. Verdeutlicht wird dieses Erkenntnis durch den Vergleich von CCR2<sup>-/-</sup> >TK- mit nicht rekonstituierten TK-Mäusen, führt er doch zu keiner Signifikanz an Iba-1+ Zellen im Neokortex.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied, bezogen auf die Anzahl an Iba-1+ Zellen im Neokortex zwischen nicht rekonstituierten TK-Mäusen, rekonstituierten Act.-GFP > TK- und den CCR2<sup>-/-</sup> >TK-Nagern, insoweit als alle Gruppen mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelt worden sind. Es entsteht also ein Plateau an Iba-1+ Zellen. In Kombination mit den gezeigten exemplarischen histologischen Fotos kann dieses Plateau als vollendete Wiederbesiedlung des ZNS betrachtet werden.

Die Eventualität, dass CCR2<sup>-/-</sup> Zellen nur wegen einer Störung der Blut-Hirn-Schranke aufgrund der vorherigen ZNS-Bestrahlungsprozedur einwandern können, galt es auszuschließen. Dafür sind doppelt transgene, nicht rekonstituierte CCR2<sup>-/-</sup> TK-Mäuse für 10 Tage mit GCV behandelt und anschließend, nach zwei wöchiger Behandlungspause, getötet worden. Die Iba-1 Zelldichte in CCR2<sup>-/-</sup> TK-Mäusen befindet sich wieder auf demselben Plateauniveau von CCR2<sup>-/-</sup> > TK-, Act.-GFP > TK- und nicht rekonstituierten TK-Tieren; sie alle sind mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelt worden. Diese Resultate belegen, dass die vollständige Wiederbesiedlung von CCR2 defizienten Iba-1+Zellen auch bei Nichtvorhandensein des Chimärismus erfolgt.

Immer mehr Beweise deuten auf eine wichtige Rolle des CCL2/CCR2-Systems bei physiologischen Prozessen (wie zum Beispiel der Neurogenese, der Neuroprotektion und der Neurotransmission), als auch bei neuropathologischen Erkrankungen hin, indem diese Achse die Immuzellinfiltration in das ZNS reguliert [72]. Unsere Daten stützen diese Aussage: der CCL2/CCR2-Signalweg hat eine wichtige Bedeutung in der Rekrutierung von peripheren myeloischen Zellen in das ZNS im Kontext des Repopulations-Phänomens.

Zusammenfassend ist nämlich der Wiederbesiedlungsprozess durch CCR2-defizientes Knochenmark in TK-Tieren gebremst worden. Diese Aussage unterstützend, ist im gleichen Mausmodell gezeigt worden (u. z. bei Verwendung von TK/ CCR2<sup>+/*rfp*</sup>-Tieren, bei denen Mikroglia für 2 Wochen depletiert und nach einwöchiger Unterbrechung der Behandlung diese Nager geopfert worden sind – es handelt sich also ein GCV-Applikationsschema ähnlich dem „Repopulations-Protokoll“) – dass sich CCR2-RFP-positive Zellen in der näheren Umgebung cerebraler Blutgefäße und Hirnhäute angesammelt haben [45]. Im Gegensatz dazu haben Iba-1-positive ortsansässige Mikroglia CCR2-RFP bei wt/ CCR2<sup>+/*rfp*</sup>-Mäusen *nicht* exprimiert [20, 45]. Obwohl der CCL2/CCR2-Signalweg offenbar den Repopulationsprozess beeinflussen kann, zeigt die Plateaubildung in der „Repopulationssituation“ interessanter Weise, dass die vollständige Wiederbesiedlung des ZNS trotz CCR2-Defizienz stattfindet. Die Morphologie der wiederbesiedelten Zellen bei CCR2<sup>-/-</sup> TK-Mäusen ist identisch sowohl bei nicht rekonstituierten, als auch bei rekonstituierten TK-Tieren, die ebenfalls mit dem „Repopulations-Protokoll“ behandelt worden sind. Eine periphere Genese ist wahrscheinlich. Die denkbarste Interpretation unserer Daten lautet: Eine ganze Bandbreite an bisher unbekanntem, bzw. bereits bekannten (mit unentdeckter Funktionsweise) Chemokinen existiert. Diese steuern die Infiltration des ZNS durch periphere monozytäre Zellen. Abschließend ausgeschlossen werden kann jedoch nicht, dass die Repopulation in CCR2<sup>-/-</sup> TK-Mäusen hirn-endogenen Ursprungs ist. Dieses Repopulations-Modell bietet sich an, um weitere Faktoren zu identifizieren, die zur Rekrutierung von peripheren myeloischen Zellen ins Gehirn beitragen.

### 5.3 Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher einwandernden myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell

In älteren Studien sind unter Verwendung von Bestrahlung und sich anschließender Knochenmarkstransplantation Mikroglia lediglich mit einem Chimärismus von bis zu 10 - 20 % durch periphere Zellen ersetzbar gewesen [73-78]. Diese dauerhafte Beteiligung peripherer Zellen passiert im Kontext einer klassischen Knochenmarkstransplantation. Dies ist wohl auf die Injektion von undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen in den Blutkreislauf des Empfängertieres zurückzuführen, die bei der Gewinnung des Knochenmarks zwangsweise herausgespült werden [16, 21]. Der niedrige Anteil an peripheren Zellen (max. 20 %) und der hauptsächlich das ZNS besiedelnde Zelltyp (HSCs) verdeutlichen, dass Knochenmarkstransplantationen ungeeignet sind, den Einfluss, bzw. das Heilungspotential, von myeloischen Zellen auf unterschiedlichste ZNS Pathologien zu untersuchen. Zudem ist bei Knochenmarkstransplantationen das endogene Immunsystem des Gehirns weiterhin vorhanden. Bei der vorliegenden Methode dagegen handelt es sich, wie bereits beschrieben, um eine nachhaltige Wiederbesiedlung durch periphere monozytäre Zellen bei fast vollständigem Austausch des ortständigen Immunsystems. Das transgene Repopulations-Phänomen trägt, um künftig als in-vivo Methode benutzt zu werden. Mit Hilfe dieser Methode kann der Beitrag – auch der langfristige – peripherer myeloischer Zellen bei der Krankheitsentstehung und -progression pathologischer Gehirnprozesse vertiefend erforscht werden.

Eine Studie hat eine therapeutische Strategie aufgezeigt: Sie zielt darauf ab, das Gehirn mit Wildtyp-Mikroglia wieder zu besiedeln, um zahlreiche Pathologien des Rett-Syndroms zu lindern [79]<sup>§</sup>. Wildtyp-Knochenmarkstransplantationen bei männlichen bestrahlten *Mecp2<sup>-y</sup>*-Mäusen haben zu einer Wiederbesiedlung des *Mecp2<sup>-y</sup>* ZNS durch Wildtyp-Monozyten geführt, wodurch sich die Krankheitssymptome bei einigen Phänotypen vermindert haben. Interessanterweise ist dabei diese Herangehensweise bei älteren Tieren weniger effizient, was darauf hinweist, dass das therapeutische Potential von diesem Ansatz auf bestimmte Zeitperioden – wenn das Gehirn von peripheren Zellen in genügender Anzahl wieder

<sup>§</sup> Eine andere Studie konnte diese Ergebnisse von Derecki et al nicht nachbilden und stellte fest, dass Mikroglia nicht die Fähigkeit haben, die Pathologie des Rett-Syndroms bei unterschiedlichen Mausmodellen anhalten zu können [80].

besiedelt werden kann – begrenzt ist [79]. Anknüpfend daran empfiehlt sich unser experimentelles Modell beispielsweise, um den Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher rekrutierten Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie in bereits gealterten APPPS1-HSVTK-Mäusen (Alter von 190 Tagen) zu untersuchen. Es ist interessant, dass das Herbeiführen von Demyelinisierung und Neurodegeneration bei Mäusen gezeigt hat: die Pathologie alleine reicht nicht aus, um eine monozytäre Infiltration ins ZNS auszulösen. Es wird eine zusätzliche Hirnbestrahlung erforderlich, damit diese Zellen ins Gehirn einwandern [18, 81]. Im Mensch dagegen präsentieren sich gerade Alzheimerpatienten häufig mit Bluthirnschrankendefekten [82, 83]. Dies wiederum weist darauf hin, dass zirkulierende Monozyten auch ohne Konditionierungsmethoden, wie beispielsweise Bestrahlungen, im Gehirn präsent sein können [4]. In dieser Hinsicht ist es interessant, zu prüfen, ob sich peripher rekrutierte myeloische Zellen von Mikroglia darin unterscheiden, dass sie A-beta Plaques aus dem Gehirn von APPPS1-Tieren zu entfernen imstande sind.

APPPS1-wt- und APPPS1-TK-Mäuse sind für 10 Tage mit *intracerebroventrikulärem* GCV behandelt worden, um entweder anschließend getötet zu werden („Depletion“), oder um vier Wochen weiterzuleben („Repopulation“), oder um weitere vier Wochen mit niedrigerer Dosierung des Medikaments behandelt zu werden („Repopulation - kontinuierliches GCV“). Die morphometrische Quantifizierung der Kongorot bedeckten Fläche [%] ergibt bei APPPS1-wt-Tieren versus APPPS1-TK-Mäusen in allen Gruppen (s.o.) keinen signifikanten Unterschied.

In Anlehnung an die Hypothese, wonach Mikrogliazellen im Verlauf der Alzheimerschen Erkrankung dysfunktional werden, könnten frisch aus der Peripherie rekrutierte myeloische Zellen den Krankheitsverlauf verlangsamen. Diese Theorie basiert auf der Annahme, dass Mikroglia nur eine geringe Fähigkeit besitzen, A $\beta$  Plaques zu phagozytieren, und die Alzheimerpathologie durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen sogar befördern [84-86]. Im Widerspruch hierzu ist an der CD11b-HSVTK-Maus gezeigt worden, dass eine nahezu vollständige Depletion von ortständigen Mikrogliazellen für 4 Wochen in genetisch veränderten Alzheimer-Mausmodellen keinen wesentlichen Einfluß auf die Entstehung und den Fortbestand der pathologischen  $\beta$ -Amyloid Plaques besitzt [52]. Auch die 10tägige Depletion von Mikrogliazellen in unserer Arbeit stützt diese Erkenntnis. Obwohl nicht alle Aspekte der Alzheimerpathologie – exemplarisch die schwere Neurodegeneration – durch APP transgene Mäuse widergespiegelt werden, sprechen sowohl die vorherige



Publikation [52] als auch diese Arbeit gegen einen durch Mikroglia ausgelösten, neuritischen Schaden bei der Alzheimerschen Erkrankung. Es ist belegt worden, dass vom Knochenmark abstammende myeloische Zellen, die bei einem Alzheimer-Mausmodell ins Gehirn rekrutiert worden sind, eine spezifische Immunreaktion auf A $\beta$  zeigen. Zudem enthalten die myeloiden Zellen A $\beta$  in Lysosomen, was darauf hinweist, dass diese Zellen möglicherweise effizienter als endogene Mikroglia sind, in der ihnen eigenen Fähigkeit, A $\beta$  Plaques zu phagozytieren [44]. Dazu passend hat eine weitere Studie gezeigt, indem das anti-inflammatorische Chemokin TGF $\beta$ 1 und die ihm folgende Signalkaskade Smad2/3 gehemmt worden sind, dass dadurch die A $\beta$ -Plaque-Pathologie bei Mäusen vermindert worden ist. Dies ist insbesondere auf den vermehrten Zustrom peripherer, aktivierter Zellen in das ZNS zurückgeführt worden [87]. Unsere Daten weichen eher von dieser Hypothese ab, da kein signifikanter Unterschied der Kongorot bedeckten Fläche [%] zwischen APPPS1-wt-Tieren versus APPPS1-TK-Mäusen nach 4wöchiger Repopulation existiert. Einerseits könnte dies daran liegen, dass sich Mikroglia und frisch aus der Peripherie rekrutierte myeloische Zellen *nicht* in der Fähigkeit unterscheiden, die Entstehung und den Fortbestand der pathologischen  $\beta$ -Amyloid Plaques zu beeinflussen. Auf der anderen Seite könnte auch der nur 1monatige Zeitraum, in dem das ZNS wieder besiedelt worden ist, zu kurzfristig gewählt sein, um eine Signifikanz in der „Repopulationssituation“ zwischen APPPS1-wt- versus APPPS1-TK-Mäusen, zu erzeugen. Dafür würde sprechen, dass ein (zwar nicht signifikanter) Trend – Reduktion von Kongorot bedeckter Fläche [%] bei TK-, verglichen mit wt-Tieren in der „Repopulationssituation“, und sogar noch deutlicher in der „Repopulation - kontinuierliches GCV - Situation“ – zu erkennen ist. Um diese Frage endgültig zu klären, sollten Experimente durchgeführt werden, in denen APP transgene Tiere (noch) langfristiger wieder besiedelt werden.

#### 5.4 Limitationen und methodische Einschränkungen

Es ist bereits erörtert worden, dass in dieser Arbeit keine vollständige, sondern lediglich eine Depletion der Mikrogliazellen um etwa 70 % erreicht werden konnte. Es handelt sich vermutlich um eine funktionell höhere Ablation des endogenen Immunsystems des Gehirns, da die verbleibenden Mikrogliazellen eine Morphologie mit übermäßig verzweigten Fortsätzen aufweisen („*hyper-ramified*“) und damit einen apoptotischen Phänotyp zeigen. Insofern findet eben „nur“ ein „fast“ vollständiger Austausch der Mikrogliazellen durch periphere myeloische Zellen statt. Ergänzend ist deswegen eine endogene Wiederbesiedlung

des ZNS – also eine von den übrig bleibenden Zellen ausgehende – sowohl bei nicht rekonstituierten TK-, als auch bei nicht rekonstituierten CCR2<sup>-/-</sup> TK-Tieren nicht vollends auszuschließen.

Die bekannten Nachteile der Knochenmarktransplantation im Vergleich mit der Parabiosetechnik werden detailliert im Abschnitt Diskussion 5.2.1 diskutiert. Überdies führt die Pumpenimplantation, welche zur *intracerebroventrikulären* Gabe des Ganciclovir notwendig ist zu einem fokalen Defekt der BHS (siehe ebenfalls Abschnitt Diskussion 5.2.1).

Die Alzheimersche Erkrankung ist nach Alter des Ausbruchs (engl. *Onset*) und dem Vererbungsmuster kategorisiert. Die meisten klinischen Fälle gehören zur spätmanifesten Form der Alzheimerschen Erkrankung (LOAD). Die betroffenen Individuen sind älter als 65 Jahre und werden als sporadisch eingeordnet. In ungefähr 5 % der Alzheimer-Erkrankungen handelt es sich um die frühmanifeste Form der AD (EAD), die alle klinischen Fälle umfasst, die vor dem 65igsten Lebensjahr auftreten [88, 89]. Bei dieser frühmanifesten Form wiederum besitzen 20 % der Individuen autosomal dominant vererbte Mutationen in den drei Genen: PSEN1, PSEN2 und APP, und werden dann der familiären Alzheimer-Erkrankung (FAD) zugeordnet [90]. Hemizygoten APPPS1-Tiere koexprimieren sowohl humanes APP mit der doppelten schwedischen Mutation (engl. *swedish double mutation*), als auch humanes PSEN1 mit der L16PP Mutation [46]. Missense-Mutationen in APP und PSEN1 führen zur familiären Form der Alzheimerschen Erkrankung durch unterschiedliche Mechanismen. Infolgedessen sind die Mutationen, die die cerebrale beta-Amyloid Pathologie beim APPPS1-Mausmodell auslösen, lediglich bei einem geringen Prozentsatz der Alzheimerpatienten vorhanden.

## 5.5 Ausblick

In dieser Arbeit wird ein Weg gewiesen, um mit Hilfe der CD11b-HSVTK-Maus das endogene Immunsystem des Säugergehirns zu ersetzen. Indem man die Ganciclovir-Behandlung unterbricht, wird bei diesen genetisch veränderten Tieren – nach initialer Depletion der aus dem Dottersack stammenden Mikrogliazellen – das ZNS durch peripher rekrutierte myeloische Zellen wiederbesiedelt. Allein die Existenz des sogenannten Repopulations-Phänomens legt offen, dass Mikrogliazellen im Gehirnmilieu des Tieres essentiell sind und verdeutlicht damit, wie anpassungsfähig der Organismus reagiert, um diese

Zellpopulation aufrecht zu erhalten. Ferner könnte diese Methode als ein Fundus dienen, die verschiedenen funktionellen Aspekte zwischen Mikroglia und peripher einwandernden myeloischen Zellen zu untersuchen, um beispielsweise ZNS spezifische Regulatoren des klassischen Mikroglia-Phänotyps aufzudecken. Darüber hinaus bietet diese neuartige und hochreproduzierbare Technik eine einzigartige Möglichkeit, ein verbessertes Verständnis über die Rolle von Mikroglia spezifischen Faktoren in der sowohl physiologischen also auch in der pathophysiologischen Umgebung zu gewinnen, etwa durch die Einführung von genetisch veränderten Zellen ins Gehirn, udgl. Letzthin erlaubt es diese neue Methode, einerseits den Einfluss, und andererseits auch das Heilungspotential von peripher rekrutierten myeloischen Zellen auf unterschiedliche ZNS Pathologien hin zu untersuchen, exemplarisch die ihnen eigene Fähigkeit, A $\beta$ -Plaques in einem Alzheimermausmodell zu beseitigen.

## 6. VERZEICHNISSE

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1387-94.
2. Lawson, L.J., V.H. Perry, and S. Gordon, *Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain*. Neuroscience, 1992. **48**(2): p. 405-15.
3. Perry, V.H., D.A. Hume, and S. Gordon, *Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain*. Neuroscience, 1985. **15**(2): p. 313-26.
4. Casano, A.M. and F. Peri, *Microglia: multitasking specialists of the brain*. Dev Cell, 2015. **32**(4): p. 469-77.
5. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 312-8.
6. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
7. Raivich, G., *Like cops on the beat: the active role of resting microglia*. Trends Neurosci, 2005. **28**(11): p. 571-3.
8. Streit, W.J., S.A. Walter, and N.A. Pennell, *Reactive microgliosis*. Prog Neurobiol, 1999. **57**(6): p. 563-81.
9. Vandenbunder, B., L. Pardanaud, T. Jaffredo, M.A. Mirabel, and D. Stehelin, *Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo*. Development, 1989. **107**(2): p. 265-74.
10. Labastie, M.C., F. Cortes, P.H. Romeo, C. Dulac, and B. Peault, *Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3624-35.
11. Kierdorf, K., D. Erny, T. Goldmann, V. Sander, C. Schulz, E.G. Perdiguero, P. Wieghofer, A. Heinrich, P. Riemke, C. Holscher, D.N. Muller, B. Luckow, T. Brocker, K. Debowski, G. Fritz, G. Opdenakker, A. Diefenbach, K. Biber, M. Heikenwalder, F. Geissmann, F. Rosenbauer, and M. Prinz, *Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways*. Nat Neurosci, 2013. **16**(3): p. 273-80.
12. Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M.F. Mehler, S.J. Conway, L.G. Ng, E.R. Stanley, I.M. Samokhvalov, and M. Merad, *Fate mapping*

- analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages.* Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
13. Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S.E. Jacobsen, J.W. Pollard, J. Frampton, K.J. Liu, and F. Geissmann, *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells.* Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
  14. Gomez Perdiguero, E., K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M.F. de Bruijn, F. Geissmann, and H.R. Rodewald, *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors.* Nature, 2015. **518**(7540): p. 547-51.
  15. Ajami, B., J.L. Bennett, C. Krieger, W. Tetzlaff, and F.M. Rossi, *Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life.* Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1538-43.
  16. Priller, J., A. Flugel, T. Wehner, M. Boentert, C.A. Haas, M. Prinz, F. Fernandez-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B.A. de Boer, M. Frotscher, G.W. Kreutzberg, D.A. Persons, and U. Dirnagl, *Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment.* Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1356-61.
  17. Asheuer, M., F. Pflumio, S. Benhamida, A. Dubart-Kupperschmitt, F. Fouquet, Y. Imai, P. Aubourg, and N. Cartier, *Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3557-62.
  18. Mildner, A., H. Schmidt, M. Nitsche, D. Merkler, U.K. Hanisch, M. Mack, M. Heikenwalder, W. Bruck, J. Priller, and M. Prinz, *Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions.* Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1544-53.
  19. Priller, J., M. Prinz, M. Heikenwalder, N. Zeller, P. Schwarz, F.L. Heppner, and A. Aguzzi, *Early and rapid engraftment of bone marrow-derived microglia in scrapie.* J Neurosci, 2006. **26**(45): p. 11753-62.
  20. Saederup, N., A.E. Cardona, K. Croft, M. Mizutani, A.C. Cotleur, C.L. Tsou, R.M. Ransohoff, and I.F. Charo, *Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice.* PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13693.
  21. Ajami, B., J.L. Bennett, C. Krieger, K.M. McNagny, and F.M. Rossi, *Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool.* Nat Neurosci, 2011. **14**(9): p. 1142-9.
  22. Li, Y.Q., P. Chen, V. Jain, R.M. Reilly, and C.S. Wong, *Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord.* Radiat Res, 2004. **161**(2): p. 143-52.

23. Diserbo, M., A. Agin, I. Lamproglou, J. Mauris, F. Staali, E. Multon, and C. Amourette, *Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002. **80**(7): p. 670-8.
24. Querfurth, H.W. and F.M. LaFerla, *Alzheimer's disease*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(4): p. 329-44.
25. Plassmann, H., J. O'Doherty, and A. Rangel, *Orbitofrontal cortex encodes willingness to pay in everyday economic transactions*. *J Neurosci*, 2007. **27**(37): p. 9984-8.
26. Gatz, M., L. Fratiglioni, B. Johansson, S. Berg, J.A. Mortimer, C.A. Reynolds, A. Fiske, and N.L. Pedersen, *Complete ascertainment of dementia in the Swedish Twin Registry: the HARMONY study*. *Neurobiol Aging*, 2005. **26**(4): p. 439-47.
27. Rocca, W.A., A. Hofman, C. Brayne, M.M. Breteler, M. Clarke, J.R. Copeland, J.F. Dartigues, K. Engedal, O. Hagnell, T.J. Heeren, and et al., *Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group*. *Ann Neurol*, 1991. **30**(3): p. 381-90.
28. Mirra, S.S., A. Heyman, D. McKeel, S.M. Sumi, B.J. Crain, L.M. Brownlee, F.S. Vogel, J.P. Hughes, G. van Belle, and L. Berg, *The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1991. **41**(4): p. 479-86.
29. Braak, H. and E. Braak, *Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections*. *Brain Pathol*, 1991. **1**(3): p. 213-6.
30. Selkoe, D.J., *Preventing Alzheimer's disease*. *Science*, 2012. **337**(6101): p. 1488-92.
31. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. *Science*, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
32. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
33. Gotz, J., F. Chen, J. van Dorpe, and R.M. Nitsch, *Formation of neurofibrillary tangles in P301 $\tau$  transgenic mice induced by A $\beta$  42 fibrils*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1491-5.
34. Lewis, J., D.W. Dickson, W.L. Lin, L. Chisholm, A. Corral, G. Jones, S.H. Yen, N. Sahara, L. Skipper, D. Yager, C. Eckman, J. Hardy, M. Hutton, and E. McGowan, *Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1487-91.
35. Hyman, B.T., K. Marzloff, and P.V. Arriagada, *The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993. **52**(6): p. 594-600.

36. Streit, W.J., R.E. Mrak, and W.S. Griffin, *Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective*. J Neuroinflammation, 2004. **1**(1): p. 14.
37. Krabbe, G., A. Halle, V. Matyash, J.L. Rinnenthal, G.D. Eom, U. Bernhardt, K.R. Miller, S. Prokop, H. Kettenmann, and F.L. Heppner, *Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60921.
38. Streit, W.J., H. Braak, Q.S. Xue, and I. Bechmann, *Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(4): p. 475-85.
39. Prokop, S., K.R. Miller, and F.L. Heppner, *Microglia actions in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2013. **126**(4): p. 461-77.
40. Guerreiro, R., A. Wojtas, J. Bras, M. Carrasquillo, E. Rogaeva, E. Majounie, C. Cruchaga, C. Sassi, J.S. Kauwe, S. Younkin, L. Hazrati, J. Collinge, J. Pocock, T. Lashley, J. Williams, J.C. Lambert, P. Amouyel, A. Goate, R. Rademakers, K. Morgan, J. Powell, P. St George-Hyslop, A. Singleton, and J. Hardy, *TREM2 variants in Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2013. **368**(2): p. 117-27.
41. Jonsson, T., H. Stefansson, S. Steinberg, I. Jonsdottir, P.V. Jonsson, J. Snaedal, S. Bjornsson, J. Huttenlocher, A.I. Levey, J.J. Lah, D. Rujescu, H. Hampel, I. Giegling, O.A. Andreassen, K. Engedal, I. Ulstein, S. Djurovic, C. Ibrahim-Verbaas, A. Hofman, M.A. Ikram, C.M. van Duijn, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, and K. Stefansson, *Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2013. **368**(2): p. 107-16.
42. Zhang, B., C. Gaiteri, L.G. Bodea, Z. Wang, J. McElwee, A.A. Podtelezhnikov, C. Zhang, T. Xie, L. Tran, R. Dobrin, E. Fluder, B. Clurman, S. Melquist, M. Narayanan, C. Suver, H. Shah, M. Mahajan, T. Gillis, J. Mysore, M.E. MacDonald, J.R. Lamb, D.A. Bennett, C. Molony, D.J. Stone, V. Gudnason, A.J. Myers, E.E. Schadt, H. Neumann, J. Zhu, and V. Emilsson, *Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease*. Cell, 2013. **153**(3): p. 707-20.
43. Jucker, M. and F.L. Heppner, *Cerebral and peripheral amyloid phagocytes--an old liaison with a new twist*. Neuron, 2008. **59**(1): p. 8-10.
44. Simard, A.R., D. Soulet, G. Gowing, J.P. Julien, and S. Rivest, *Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease*. Neuron, 2006. **49**(4): p. 489-502.
45. Varvel, N.H., S.A. Grathwohl, F. Baumann, C. Liebig, A. Bosch, B. Brawek, D.R. Thal, I.F. Charo, F.L. Heppner, A. Aguzzi, O. Garaschuk, R.M. Ransohoff, and M. Jucker, *Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(44): p. 18150-5.
46. Radde, R., T. Bolmont, S.A. Kaeser, J. Coomaraswamy, D. Lindau, L. Stoltze, M.E. Calhoun, F. Jaggi, H. Wolburg, S. Gengler, C. Haass, B. Ghetti, C. Czech, C. Holscher,

- P.M. Mathews, and M. Jucker, *Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology*. EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 940-6.
47. Heppner, F.L., M. Greter, D. Marino, J. Falsig, G. Raivich, N. Hovelmeyer, A. Waisman, T. Rulicke, M. Prinz, J. Priller, B. Becher, and A. Aguzzi, *Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 146-52.
48. Fyfe, J.A., P.M. Keller, P.A. Furman, R.L. Miller, and G.B. Elion, *Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine*. J Biol Chem, 1978. **253**(24): p. 8721-7.
49. Culver, K.W., Z. Ram, S. Wallbridge, H. Ishii, E.H. Oldfield, and R.M. Blaese, *In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors*. Science, 1992. **256**(5063): p. 1550-2.
50. Bush, T.G., T.C. Savidge, T.C. Freeman, H.J. Cox, E.A. Campbell, L. Mucke, M.H. Johnson, and M.V. Sofroniew, *Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice*. Cell, 1998. **93**(2): p. 189-201.
51. Herraiz, M., N. Beraza, A. Solano, B. Sangro, J. Montoya, C. Qian, J. Prieto, and M. Bustos, *Liver failure caused by herpes simplex virus thymidine kinase plus ganciclovir therapy is associated with mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA depletion*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(5): p. 463-72.
52. Grathwohl, S.A., R.E. Kalin, T. Bolmont, S. Prokop, G. Winkelmann, S.A. Kaeser, J. Odenthal, R. Radde, T. Eldh, S. Gandy, A. Aguzzi, M. Staufenbiel, P.M. Mathews, H. Wolburg, F.L. Heppner, and M. Jucker, *Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia*. Nat Neurosci, 2009. **12**(11): p. 1361-3.
53. Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi, and Y. Nishimune, *'Green mice' as a source of ubiquitous green cells*. FEBS Lett, 1997. **407**(3): p. 313-9.
54. Kuziel, W.A., S.J. Morgan, T.C. Dawson, S. Griffin, O. Smithies, K. Ley, and N. Maeda, *Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12053-8.
55. Ito, D., Y. Imai, K. Ohsawa, K. Nakajima, Y. Fukuuchi, and S. Kohsaka, *Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. **57**(1): p. 1-9.
56. Okere, C.O. and H. Kaba, *Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein (Iba1) in the mouse olfactory bulb*. Brain Res, 2000. **877**(1): p. 85-90.
57. Hirayama, A., Y. Okoshi, Y. Hachiya, Y. Ozawa, M. Ito, Y. Kida, Y. Imai, S. Kohsaka, and S. Takashima, *Early immunohistochemical detection of axonal damage and glial*



- activation in extremely immature brains with periventricular leukomalacia.* Clin Neuropathol, 2001. **20**(2): p. 87-91.
58. Imai, Y., I. Ibata, D. Ito, K. Ohsawa, and S. Kohsaka, *A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(3): p. 855-62.
59. Imai, Y. and S. Kohsaka, *Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of *Iba1*.* Glia, 2002. **40**(2): p. 164-74.
60. Hartman, R.E., Y. Izumi, K.R. Bales, S.M. Paul, D.F. Wozniak, and D.M. Holtzman, *Treatment with an amyloid-beta antibody ameliorates plaque load, learning deficits, and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease.* J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6213-20.
61. Beers, D.R., J.S. Henkel, Q. Xiao, W. Zhao, J. Wang, A.A. Yen, L. Siklos, S.R. McKercher, and S.H. Appel, *Wild-type microglia extend survival in *PU.1* knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 16021-6.
62. Tondravi, M.M., S.R. McKercher, K. Anderson, J.M. Erdmann, M. Quiroz, R. Maki, and S.L. Teitelbaum, *Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor *PU.1*.* Nature, 1997. **386**(6620): p. 81-4.
63. Gomez Perdiguero, E., C. Schulz, and F. Geissmann, *Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia.* Glia, 2013. **61**(1): p. 112-20.
64. Bertrand, J.Y., N.C. Chi, B. Santoso, S. Teng, D.Y. Stainier, and D. Traver, *Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development.* Nature, 2010. **464**(7285): p. 108-11.
65. Kissa, K. and P. Herbomel, *Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition.* Nature, 2010. **464**(7285): p. 112-5.
66. Boisset, J.C., W. van Cappellen, C. Andrieu-Soler, N. Galjart, E. Dzierzak, and C. Robin, *In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium.* Nature, 2010. **464**(7285): p. 116-20.
67. Ivanova, N.B., J.T. Dimos, C. Schaniel, J.A. Hackney, K.A. Moore, and I.R. Lemischka, *A stem cell molecular signature.* Science, 2002. **298**(5593): p. 601-4.
68. Kasper, L.H., F. Boussouar, P.A. Ney, C.W. Jackson, J. Rehg, J.M. van Deursen, and P.K. Brindle, *A transcription-factor-binding surface of coactivator *p300* is required for haematopoiesis.* Nature, 2002. **419**(6908): p. 738-43.
69. Mucenski, M.L., K. McLain, A.B. Kier, S.H. Swerdlow, C.M. Schreiner, T.A. Miller, D.W. Pietryga, W.J. Scott, Jr., and S.S. Potter, *A functional *c-myb* gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis.* Cell, 1991. **65**(4): p. 677-89.

70. Mukoyama, Y., N. Chiba, M.L. Mucenski, M. Satake, A. Miyajima, T. Hara, and T. Watanabe, *Hematopoietic cells in cultures of the murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region are induced by c-Myb*. *Curr Biol*, 1999. **9**(15): p. 833-6.
71. Sumner, R., A. Crawford, M. Mucenski, and J. Frampton, *Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor*. *Oncogene*, 2000. **19**(30): p. 3335-42.
72. Conductier, G., N. Blondeau, A. Guyon, J.L. Nahon, and C. Rovere, *The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases*. *J Neuroimmunol*, 2010. **224**(1-2): p. 93-100.
73. de Groot, C.J., W. Huppes, T. Sminia, G. Kraal, and C.D. Dijkstra, *Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques*. *Glia*, 1992. **6**(4): p. 301-9.
74. Hickey, W.F. and H. Kimura, *Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo*. *Science*, 1988. **239**(4837): p. 290-2.
75. Hickey, W.F., K. Vass, and H. Lassmann, *Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1992. **51**(3): p. 246-56.
76. Krall, W.J., P.M. Challita, L.S. Perlmutter, D.C. Skelton, and D.B. Kohn, *Cells expressing human glucocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation*. *Blood*, 1994. **83**(9): p. 2737-48.
77. Lassmann, H., M. Schmied, K. Vass, and W.F. Hickey, *Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation*. *Glia*, 1993. **7**(1): p. 19-24.
78. Massengale, M., A.J. Wagers, H. Vogel, and I.L. Weissman, *Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain*. *J Exp Med*, 2005. **201**(10): p. 1579-89.
79. Derecki, N.C., J.C. Cronk, Z. Lu, E. Xu, S.B. Abbott, P.G. Guyenet, and J. Kipnis, *Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome*. *Nature*, 2012. **484**(7392): p. 105-9.
80. Wang, J., J.E. Wegener, T.W. Huang, S. Sripathy, H. De Jesus-Cortes, P. Xu, S. Tran, W. Knobbe, V. Leko, J. Britt, R. Starwalt, L. McDaniel, C.S. Ward, D. Parra, B. Newcomb, U. Lao, C. Nourigat, D.A. Flowers, S. Cullen, N.L. Jorstad, Y. Yang, L. Glaskova, S. Vingeau, J. Kozlitina, M.J. Yetman, J.L. Jankowsky, S.D. Reichardt, H.M. Reichardt, J. Gartner, M.S. Bartolomei, M. Fang, K. Loeb, C.D. Keene, I. Bernstein, M. Goodell, D.J. Brat, P. Huppke, J.L. Neul, A. Bedalov, and A.A. Pieper, *Wild-type microglia do not reverse pathology in mouse models of Rett syndrome*. *Nature*, 2015. **521**(7552): p. E1-4.

81. Kierdorf, K., N. Katzmarski, C.A. Haas, and M. Prinz, *Bone marrow cell recruitment to the brain in the absence of irradiation or parabiosis bias*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58544.
82. Algotsson, A. and B. Winblad, *The integrity of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease*. Acta Neurol Scand, 2007. **115**(6): p. 403-8.
83. Bowman, G.L., J.A. Kaye, M. Moore, D. Waichunas, N.E. Carlson, and J.F. Quinn, *Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance*. Neurology, 2007. **68**(21): p. 1809-14.
84. Yan, S.D., X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern, and A.M. Schmidt, *RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 685-91.
85. Xie, Z., Y. Dong, M. Zhang, M.Z. Cui, R.A. Cohen, U. Riek, D. Neumann, U. Schlattner, and M.H. Zou, *Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6366-75.
86. Griciuc, A., A. Serrano-Pozo, A.R. Parrado, A.N. Lesinski, C.N. Asselin, K. Mullin, B. Hooli, S.H. Choi, B.T. Hyman, and R.E. Tanzi, *Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta*. Neuron, 2013. **78**(4): p. 631-43.
87. Town, T., Y. Laouar, C. Pittenger, T. Mori, C.A. Szekely, J. Tan, R.S. Duman, and R.A. Flavell, *Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology*. Nat Med, 2008. **14**(6): p. 681-7.
88. Finch, C.E. and R.E. Tanzi, *Genetics of aging*. Science, 1997. **278**(5337): p. 407-11.
89. Joshi, A., J.M. Ringman, A.S. Lee, K.O. Juarez, and M.F. Mendez, *Comparison of clinical characteristics between familial and non-familial early onset Alzheimer's disease*. J Neurol, 2012. **259**(10): p. 2182-8.
90. McKhann, G.M., D.S. Knopman, H. Chertkow, B.T. Hyman, C.R. Jack, Jr., C.H. Kawas, W.E. Klunk, W.J. Koroshetz, J.J. Manly, R. Mayeux, R.C. Mohs, J.C. Morris, M.N. Rossor, P. Scheltens, M.C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub, and C.H. Phelps, *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2011. **7**(3): p. 263-9.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung von Gefrierschnitten .....	24
Abbildung 2: Versuchsabläufe der nicht rekonstituierten Mausmodelle.....	29
Abbildung 3: Versuchsabläufe der rekonstituierten Mausmodelle.....	31
Abbildung 4: Versuchsabläufe des Alzheimer-Mausmodells.....	32
Abbildung 5: Mikrogliazelldepletion gefolgt von Repopulation Iba-1+ Zellen .....	36
Abbildung 6: Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen .....	42
Abbildung 7: Repopulations-Phänomen im zeitlichen Verlauf – getragen von peripher einwandernden myeloischen Zellen.....	47
Abbildung 8: Repopulations-Phänomen in Abwesenheit des CCL2/CCR2-Signalweges.....	51
Abbildung 9: Einfluss von Chimärismus und CCR2-Defizienz auf den Repopulations- prozess.....	53
Abbildung 10: Repopulation des ZNS bei kontinuierlicher GCV-Behandlung.....	56
Abbildung 11: Einfluss von ortständigen Mikrogliazellen und peripher einwandernden myeloischen Zellen auf die cerebrale beta-Amyloid Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell.....	58

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	18
Tabelle 2: Verwendete Software.....	18
Tabelle 3: Verdünnung der Primärantikörper .....	25
Tabelle 4: Verdünnung der Sekundärantikörper .....	25

## 7. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

Fortsetzung Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

## 8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Johannes Sebastian Hendrik von Büren, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Repopulations-Phänomen – Austausch ortständiger Mikrogliazellen mit von peripher rekrutierten myeloischen Zellen am HSVTK-Mausmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



## 9. DANKSAGUNG

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Heppner für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik für Neuropathologie absolvieren zu dürfen, für die konstruktive Begleitung meiner Arbeit und für die erste Einführung in die Wissenschaft.

Herrn Dr. Stefan Prokop danke ich für seine Unterstützung und die zuverlässige und engagierte Betreuung der Arbeit. Ich danke ihm, dass er seine ausgeprägte wissenschaftliche Expertise und Leidenschaft mit mir über die Jahre geteilt hat.

Ich danke Frau Dr. Kelly Miller für die praktische Umsetzung im Labor und die vielen wichtigen Hinweise. Bei vielen Problemen hat sie mich kontinuierlich unterstützt.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Dr. Roland Kälin, Frau Dr. Stefanie Kraft und dem gesamten Heppner-Team für ihre Kooperation danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und ermutigt hat.