Aus der Abteilung Neurologie (Prof. Dr. med. M. Bähr) im Zentrum Neurologische Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Effekt der Myelinphagozytose auf Makrophagen und Mikroglia *in vitro*: Suppression inflammatorischer Aktivität und Apoptoseinduktion

INAUGURAL – DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von **Miroslav Kulanga** aus Kežmarok (Slowakei)

Göttingen 2008

Dekan:

PROF. DR. MED. C. FRÖMMEL

I. Berichterstatter:

PROF. DR. MED. K. FAßBENDER

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

Ab	Abkürzungsverzeichnis				
1	Eir	nleit	ung	9	
	1.1	Mult	iple Sklerose	9	
	1.1.	.1	Klinische Symptome	9	
	1.1.	.2	Klinische Verläufe und Prognose der MS	11	
	1.1.	.3	Ätiologie	12	
	1.1.	4	Varianten und Analoga der MS-Erkrankung bei Menschen und Tieren	12	
-	1.2	Path	ologie und Pathophysiologie der MS	13	
	1.2.	1	Makropathologie	13	
	1.2.	2	Mikropathologie	13	
	1.2.	3	Angriffsstruktur und physiologische Verhältnisse	14	
	1.2.	4	Heterogenitätskonzept	15	
	1.2.	5	Allgemein akzeptierte Pathogenese	18	
-	1.3	Mult	iple Sklerose: Makrophagen und Mikroglia	19	
-	1.4	Poin	t of interest	22	
	1.4.	1	Phagozytiertes Myelin	23	
	1.4.	2	Inflammatorische Aktivität nach der Myelinphagozytose: TNF $lpha$ und IP-10	23	
	1.4.	.3	Vitalität von Makrophagen und Mikroglia nach der Myelinphagozytose	23	
-	1.5	Ziels	etzung dieser Arbeit	24	
2	Ma	teri	al und Methoden	26	
	2.1	Isola	tion, Quantifizierung und Markierung von Myelin	26	
	2.1.	.1	Isolation	26	
	2	.1.1.1	Grobe Myelinpräparation	26	
	2	.1.1.2	Auswaschen der Sucroselösung	26	
	2	.1.1.3	Erster osmotischer Schock und Entfernung kleiner Membranfragmente	26	
	2	.1.1.4	Zweiter osmotischer Schock	27	

2.1.1	2.5 Zentrifugieren eines diskontinuierlichen Sucrosegradienten zur Isolation des	
gere	inigten Myelins	27
2.1.2	Quantifizierung	27
2.1.3	Markierung	27
2.2 Ze	ellkultur von primären Mikroglia und peritonealen Makrophagen	28
2.2.1	Mikroglia	28
2.2.1	1.1 Isolation von primären Mikroglia	28
2.2.1	2.2 Kultur von primären Mikroglia	28
2.2.2	Makrophagen	28
2.2.2	2.1 Isolation von peritonealen Makrophagen	28
2.2.2	2.2 Kultur von peritonealen Makrophagen	28
2.2.3	Zellenberechnung	29
2.2.4	Puffer und Lösungen für die Zellkulturen	29
2.2.4	PM Medium	29
2.2.4	9.2 Mikroglia Medium	30
2.2.4	9.3 PBS	30
2.3 Au	uswertung der Phagozytose von Myelin <i>in vitro</i>	30
2.3.1	Lichtmikroskopie	30
2.3.2	Elektronenmikroskopie	31
2.3.2	2.1 Probenvorbereitung	31
2.3.2	2.2 Protokoll der Fixierung und Einbettung	31
2.3.2	2.3 Mikroskopie	32
2.3.3	Durchflusszytometrie	32
2.3.3	8.1 Prinzip	32
2.3.3	3.2 Durchführung	32
2.3.4	Konfokale Mikroskopie	33
2.4 M	essung inflammatorischer Zytokine	33
2.4.1	Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	33
2.4.1	.1 Prinzip	33

2.4.1.2 M	aterial	35
2.4.1.2.1	Antikörper, Substrat	
2.4.1.2.2	Puffer	
2.4.1.2	.2.1 Blockierungspuffer	35
2.4.1.2	.2.2 Reagent Diluent	
2.4.1.2	.2.3 Stopppuffer	
2.4.1.3 Pr	rotokoll am Beispiel von TNFα	35
2.5 Vitalitäts	messungen von Makrophagen und Mikroglia	
2.5.1 Mikı	roglia	
2.5.1.1 M	TT Assay	37
2.5.1.1.1	Prinzip	
2.5.1.1.2	Material	
2.5.1.1.3	Protokoll	
2.5.1.2 LI	DH Zytotoxizitätsassay	
2.5.1.2.1	Prinzip	
2.5.1.2.2	Material	
2.5.1.2.3	Protokoll	
2.5.2 Mak	rophagen	
2.5.2.1 M	essung der Aktivität der Caspasen 3 und 7	
2.5.2.1.1	Prinzip	
2.5.2.1.2	Material	40
2.5.2.1.3	Protokoll	40
2.5.2.2 M	essung des mitochondrialen Membranpotentials $arDelta arPsi$	40
2.5.2.2.1	Prinzip	40
2.5.2.2.2	Material	41
2.5.2.2.3	Protokoll	41
2.5.2.2.4	Quantitative Bestimmung – Fluorometrie	42
2.5.2.2.5	Qualitative Bestimmung - Fluoreszenzmikroskopie	42
2.3.2.2.5	Quantative Bestimmung - Fluoreszenzmikroskopie	

Erge	bnisse	43
3.1 F	hagozytose von Myelin <i>in vitro</i>	43
3.1.1	Makrophagen	43
3.1	1.1 Lichtmikroskopie	43
3.1	1.2 Elektronenmikroskopie	45
3.1.2	Mikroglia	48
3.1	2.1 Fluoreszenzmikroskopie: qualitativer Nachweis	48
3.1	2.2 Durchflusszytometrie: quantitativer Nachweis	49
3.2 F Mikrogl	hagozytose von Myelin supprimiert Sekretion inflammatorischer Zytokine in a	50
3.2.1	Zytokinsuppression in IFN γ -aktivierten Mikroglia	51
3.2.2	Zytokinsuppression in IFN γ - und LPS-stimulierten Mikroglia	53
3.3 Myelinp	lakrophagen und Mikroglia zeigen veränderte Vitalitätsparameter nach der hagozytose	55
3.3.1	Vitalitäts- und Zytotoxizitätsassay von Mikrogliazellkulturen	55
3.3.2	Erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 7 in Myelin-behandelten Makrophage	n 57
3.3.3	Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials in Makrophagen n	ach
der M	yelinphagozytose	59
3.4 2	usammenfassung	62
Disł	ussion	63
4.1 N	lakrophagen und Mikroglia phagozytieren Myelin <i>in vitro</i>	64
4.2 N	Iyelinphagozytose beeinflusst die Zytokinsekretion in Phagozyten	65
4.3 N	lechanismen der immunsuppressiven Wirkung von Myelin	67
4.3.1	ROS und oxidativer Stress	67
4.3.2	Deaktivierung von Makrophagen	68
4.3	2.1 Rolle der Lipide	69
4.3	2.2 Scavenger-Rezeptoren	69
4.3	2.3 Veränderung im Zytokinprofil der Umgebung	69
4.3	2.4 In-vivo-Studien	70
	Erge 3.1 P 3.1.1 3.1.1 3.1.2 3.1.2 3.1. 3.1.2 3.1. 3.2 P Mikrogli 3.2.1 3.2.2 3.3 M Myelinp 3.3.1 3.3.2 3.3.3 der M 3.3.1 3.3.2 3.3.3 der M 3.4 Z Disk 4.1 M 4.2 M 4.3 M 4.3.1 4.3.2 4.3.1	Ergebnisse 3.1 Phagozytose von Myelin in vitro 3.1.1 Makrophagen 3.1.1.1 Lichtmikroskopie 3.1.1.2 Elektronenmikroskopie 3.1.2 Elektronenmikroskopie: 3.1.2 Fluoreszenzmikroskopie: qualitativer Nachweis 3.1.2.2 Durchflusszytometrie: quantitativer Nachweis 3.1.2.2 Durchflusszytometrie: quantitativer Nachweis 3.2 Phagozytose von Myelin supprimiert Sekretion inflammatorischer Zytokine in Mikroglia

4.4	.4 Myelinphagozytose verändert die Vitalitäsparameter von Makrophagen			
und M	/ikroglia	70		
4.4	.1 "Scheinbare Vitalität"	70		
4.4	.2 Phagozytose von Myelin kann Apoptose induzieren	71		
4.5	Meinungswandel zu der Rolle von Makrophagen und Mikroglia im Rahmen der MS?	73		
4.6	Epilog	74		
Zusammenfassung75				
Literaturverzeichnis				

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Sonstige Abkürzungen werden direkt im Text oder in der Fußnote erklärt

	Α	<i>M</i>		
Abb.	Abbildung	M1	"klassisch" aktivierter Makrophage	
ANOVA	analysis of variance; einfaktorielle Varianzanalyse	M2	"alternativ" (de)aktivierter Makrophage	
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)	MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein	
	С	mFR	mittlere Fluoreszenzrate	
CAMs	Zelladhäsionsmoleküle	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	
CCRs	CC-Chemokin-Rezeptoren	MMPs	Matrix-Metalloproteinasen	
CXCRs	CXC-Chemokin-Rezeptoren	MS	Multiple Sklerose	
СуЗ	Carbocyanin 3		Ν	
	D	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid	
D	Deutschland	- 	Р	
	F	PGE2	Prostaglandin-E2	
EVE	experimentelle autoimmune	PNS	peripheres Nervensystem	
LAL	Enzephalomyelitis		R	
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted;	
ext.	Extinktion		CCL 5	
	I	rel.	relativ	
IFNγ	Gamma-Interferon	- ROS	reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffverbindungen	
IL-(X)	Interleukin z.B. 3		S	
IP-10	Gamma-Interferon-induzierbares Protein 10; CXCL10	SF	Standardfehler	
	L		Τ	
LAMP-2	lysosome-associated membrane	TCR	T-Zell Rezeptor	
	protein 2	TNFa	Tumornekrosefaktor-Alpha	
LPS	Lipopolysaccharid		7	
LT	Lymphotoxin	7NIS	Zentrales Nervensystem	
		2113	Lentrales incrychisystem	

1 EINLEITUNG

1.1 MULTIPLE SKLEROSE

Die Multiple Sklerose (MS), auch als Enzephalomyelitis disseminata oder Polysklerose bezeichnet, ist eine chronisch verlaufende, entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems. In disseminierten Entzündungsherden, vorwiegend in der weißen Substanz, kommt es zu einer Schädigung der periaxonalen Myelinscheiden und dadurch zur Verlangsamung oder vollständigen Unterbrechung der neuronalen Erregungsausbreitung. Langfristig kommt es zu einer Schädigung der neuronalen Axone. Die Störung der neuronalen Erregungsausbreitung manifestiert sich klinisch in einer vielfältigen neurologischen Symptomatik, die in eine dauerhafte und progrediente Behinderung übergehen kann.

Die Prävalenz der MS liegt zwischen 50 und 100 auf 100 000 Einwohner in Europa und in den USA. Die Frauen sind von dieser Erkrankung etwa doppelt so häufig betroffen wie die Männer. Dramatisch ist das Hauptmanifestationsalter, welches sich zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr aufspannt.

1.1.1 Klinische Symptome

Die Vielfältigkeit der klinischen Symptomatik ist bedingt durch Verteilung der Läsionen im gesamten ZNS. Bestehende neurologische Symptome müssen jedoch nicht immer mit pathomorphologisch fassbaren Läsionen korrelieren

Eine Reihe von typischen aber nicht spezifischen Frühsymptomen kann die Erkrankung ankündigen. Bei Patienten, die vor dem 30. Lebensjahr erkranken, sind die typischen Anfangssymptome eine Optikusneuritis mit Visusminderung und eventuell einem retrobulbären Schmerz oder Sensibilitätsstörungen vorwiegend an den unteren Extremitäten. Langsam auftretende Lähmungen werden besonders häufig bei Patienten beobachtet, die nach dem 30. Lebensjahr erkranken.

Im Verlauf der Erkrankung können weitere Spätsymptome hinzukommen. Dazu gehören motorische und sensible Beeinträchtigungen, Kleinhirn-, Hirnstammsymptome aber auch Schmerzen, vegetative Funktionsstörungen bis zu psychischen und kognitiven Störungen.

Eine besondere Bedeutung kommt den paroxysmalen Symptomen hinzu, die unabhängig von den MS-Schüben auftreten und auf eine erhöhte neuronale Erregbarkeit zurückzuführen sind. Eine Übersicht der Symptomvielfalt bietet die Tabelle 1.

Einleitung

Frühsymptome	Spä	paroxysmale schubunabhängige Symptome	
 Sehstörungen/ Optikusneuritis Visusminderung Retrobulbärer Schmerz Verschwommen-, Schleier-, Nebelsehen Motorische Störungen Ermüdung der Beine Gangstörungen Sensible Störungen Kribbelparästhesien Ameisenlaufen Pelzigkeitsgefühl 	 Motorische Störungen Ermüdung der Beine / latente Parese Gangstörungen Atrophische Paresen Gesteigerte Muskeleigenreflexe Pathologische Reflexe (z.B. Babinski) Kombination von Paresen und Spasmen Streckspasmen Beugespasmen Kontrakturen Sensible Störungen Kribbelparästhesien Ameisenlaufen Kältemissempfindung Lhermitte-Zeichen pseudoplyneuropathische Symptome (socken- und handschuhförmige Sensibilitätsstörungen) Hirnsytammsymptome Nystagmus (v.a. symmetrischer horizontaler Blickrichtungsnystagmus) Augenmuskelparesen/ Doppelbilder Internukleäre Ophtalmoplegie Drehschwindel 	 Kleinhirnsymptome Intentionstremor Intentionsmyoklonus heftige, unkontrollierbare myokloniforme Extremitätbewegungen Dysarthrie und skandierende Sprache Verwaschene Sprache (bulbär und pseudobulbär) Schmerzen akut, subakut, chronisch paroxysmale Dysästhesien Trigeminusneuralgie Lhermitte-Zeichen Retrobulbäre Schmerzen Diffuse Brennschmerzen Orgeinkontinenz Dysurie Darnmotilitätsstörungen oft mit Obstipation Erektile Dysfunktion Ejakulationsstörungen Psychische und kognitive Störungen MS-Fatigue Depression Euphorie Kognitive Einschränkungen bis zur Demenz 	 epileptische Anfälle Motorische, sensomotorische oder schmerzhafte Hirnstamm- und spinale Anfälle Paroxysmale Ataxie Paroxysmale Atonie Paroxysmale Atonie Paroxysmale sensible Symptome Paroxysmale Diplopie Paroxysmales Erbrechen Paroxysmaler Husten Spasmus hemifacialis Lhermitte-Zeichen Spinale Automatismen

 Tabelle 1: Klinische Symptome im Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose

1.1.2 Klinische Verläufe und Prognose der MS

Die Verläufe der Erkrankung im Bezug auf die klinische Symptomatik und deren Persistenz als Grad der Behinderung sind interindividuell unterschiedlich. Besonders häufig konnte man jedoch folgende drei Verlaufsformen beobachten:

Die primär schubförmige MS ist die häufigste (85%-90%) Verlaufsform (Abb. 1A). Besonders junge Patienten sind von dieser Verlaufsform betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim 28. Lebensjahr. Die primär schubförmige MS zeichnet sich durch Wechsel zwischen Phasen mit Exazerbation klinischer Symptome und Phasen völliger oder partieller Symptomremission. Die einzelnen Schübe repräsentieren relativ akut aufgetretene neurologische Symptome bei einem bisher Gesunden bzw. bei einem in der betroffenen Funktion bisher noch nicht beeinträchtigten Patienten. Ein Wiederauftreten oder eine Verschlechterung früher aufgetretener Symptome kann ebenfalls als Schub gewertet werden, wobei sich die Beschwerden frühestens nach 24 Stunden zurückbilden.

Die Hälfte der Patienten mit einem primär schubförmigen Verlauf entwickelt nach 10 bis 15 Jahren einen sekundär progredienten Verlauf (Abb. 1B). Eine progrediente Verschlechterung der Symptomatik ist das Charakteristikum dieser Verlaufsform, wobei diese auch mit intermittierenden Schüben und partiellen Remissionen kombiniert sein kann.

Ungefähr bei 10%-15% der Patienten ist die klinische Symptomatik von Anfang an progredient. Man spricht dann von einer primär progredienten MS (Abb. 1C).



Klinische Krankheitsverläufe der MS

Die Prognose der MS hängt von mehreren Faktoren (Erkrankungsalter, Geschlecht, Erstsymptome, Zahl der Schübe, zeitliche Entwicklung des Behinderungsgrades, MRT-Befunde, Arbeits- und Gehfähigkeit) ab. Zwischen der Prognose der Erkrankung und den besprochenen klinischen Verlaufsformen besteht ein wichtiger Zusammenhang.

Die primär <u>schubförmige</u> MS hat die beste Prognose und eine kaum erniedrigte Lebenserwartung (ca. 4 Jahre), wohingegen die primär <u>progrediente</u> MS die schlechteste Prognose bezüglich der Behinderungsausprägung und der Lebenszeitverkürzung aufweist (ca. 16-20 Jahre). Grundsätzlich führt die MS in allen Krankheitsverläufen nicht zu einer gravierenden Lebenszeitverkürzung jedoch zu einer frühzeitigen Lebensqualitätsbeeinträchtigung, die über Jahre bis Jahrzehnte andauert. Die MS-Patienten streben selten unmittelbar an der MS, sondern eher an den MS-Komplikationen. Am häufigsten an Bronchopneumonien, Polyneuropathien oder an einer Sepsis (% der Patienten), % versterben an MS-unabhängigen Erkrankungen.

1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie der MS ist unklar. Derzeit werden drei Faktoren als bedeutend diskutiert.

- 1. Einflüsse von Faktoren aus der Umwelt
- 2. Einflüsse genetischer Determinanten als genetische Prädisposition
- 3. Autoimmune Reaktion

Eine Überschneidung dieser Faktoren im Sinne einer multifaktoriellen Ätiologie ist sehr wahrscheinlich. Es gibt eine Reihe von Vermutungen über äußere Einwirkungen, die für die Entstehung der Krankheit verantwortlich sein könnten bzw. den Verlauf der MS günstig oder ungünstig beeinflussen. Häufig werden in diesem Zusammenhang Infektionen, Impfungen, Traumata, psychische Faktoren, Hypovitaminosen oder Schwangerschaft genannt.

1.1.4 VARIANTEN UND ANALOGA DER MS-ERKRANKUNG BEI MENSCHEN UND TIEREN

Die MS gehört zu den demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS (Tabelle 2). Diesen Erkrankungen liegen zwar unterschiedliche pathogenetische und ätiologische Mechanismen zugrunde, gemeinsam ist jedoch die Zielstruktur der Schädigung — das Myelin.

Eine präzise differentialdiagnostische Abklärung gegenüber den Varianten und sonstigen demyelinisierenden Erkrankungen ist aus therapeutischer und pathophysiologischer Sicht notwendig.

Sonderformen und Varianten der MS	sonstige demyelinisierende Erkrankungen
- Akute MS Typ Marburg	- Akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM)
- Neuromyelitis optica Devic	- Akute nekrotisierende hämorrhagische
- Enzephalitis periaxialis diffusa Schilder	Enzephalomyelitis (ANHE)
- Enzephalitis periaxialis concentrica Balo	- Zentrale pontine Myelinolyse
	- Marchiafava-Bignami Syndrom
	- Subakute sklerosierende Panenzephalitis

Tabelle 2: Demyelinisierende Erkrankungen des ZNS.

Ein tierexperimentelles Analogon der MS ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die durch Injektion von Myelinbestandteilen (MOG, MBP, PLP) ausgelöst wird und im Sinne einer autoimmunen Entzündung zur Demyelinisierung und axonalem Schaden führt. Es lassen sich ähnliche pathogenetische und klinische Merkmale in den EAE-Tieren wie bei der MS nachweisen (Gold et al. 2006). Ähnliche Erkrankungsbilder zeigen auch Tiere, die mit neurotrophen Viren wie Theiler-Virus (Lipton und Dal Canto 1976) oder Maus-Hepatitis-Virus (Houtman und Fleming 1996; Weiner 1973) infiziert worden sind.

1.2 PATHOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER MS

1.2.1 MAKROPATHOLOGIE

Die entzündlichen MS-Läsionen entstehen typischerweise in der weißen Substanz des ZNS wo sie disseminiert verteilt sind. Dementsprechend sind im Gegensatz zu den Großhirnhemisphären die Läsionen im Stammhirn und im Rückenmark bereits an der Oberfläche sichtbar (Kumar et al. 2005C).

Makropathologisch sind die einzelnen Läsionen bräunlich-gräulich, unregelmäßig geformt aber scharf begrenzt und oft von einer festen Konsistenz. Die Größe der Läsionen variiert von mikroskopisch kleinen Herden bis zu mehreren Zentimeter großen konfluierenden Plaques. Die bevorzugte Lokalisation für die Entstehung der Herde ist das periventrikuläre Mark der lateralen Ventrikel. Häufig findet man Läsionen auch im Bereich der Nervi optici, des Chiasmas, im Hirnstamm, Kleinhirn, Rückenmark und den auf- bzw. absteigenden Bahnen (Kumar et al. 2005C).

Das Vorkommen der Plaques in der grauen Substanz ist ebenfalls möglich, jedoch schwieriger und oft nur auf mikroskopischer Ebene nachweisbar, wobei das involvierte Areal auch mehrere Zentimeter groß sein kann (Kumar et al. 2005C).

1.2.2 Mikropathologie

Aus histopathologischer Sicht imponieren die Plaques durch eine Demyelinisierung von neuronalen Axonen sowie durch Infiltrate aus aktivierten Makrophagen, Mikroglia und T- und evtl. B-Lymphozyten (Sospedra und Martin 2005).

Im akuten Entmarkungsstadium kommt es zu einer ausgeprägten perivaskulären (perivenösen) lymphozytären Infiltration und einer Markscheidendegeneration mit zahlreichen Makrophagen im Vordergrund. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem vollständigen Myelinverlust unter Erhaltung der Axone. Die entzündlichen Infiltrate können sich weitgehend zurückbilden. Ältere bzw. chronische Entmarkungsherde zeigen eine ausgeprägte reaktive Astrogliose. Die Abgrenzung des entmarkten Areals zu der unbetroffenen weißen Substanz ist scharf zu erkennen.

1.2.3 ANGRIFFSSTRUKTUR UND PHYSIOLOGISCHE VERHÄLTNISSE

Die Oligodendrozyt-Myelin-Axon-Einheit repräsentiert einen einzigartigen strukturellen und funktionellen Grundbaustein des Zentralen Nervensystems. Das Myelin wird von den Oligodendroglia gebildet. Ein Oligodendrozyt kann mehrere Axone mit seinen Ausläufern umhüllen (Abb. 2 und Abb. 3).

Von der restlichen oligodenroglialen Membran unterscheidet sich das Myelin vor allem in der Proteinfraktion. Der Wassergehalt beträgt etwa 40%. Die Trockensubstanz des Myelins besteht zu 70% aus Lipiden und zu 30% aus Proteinen wie z.B. dem Basischen Myelinprotein (MBP), dem Myelin-assoziierten Glykoprotein (MAG), dem Proteolipidprotein (PLP) und dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), welches spezifisch für das ZNS ist. Eine detaillierte Übersicht über die einzelnen Lipidfraktionen des Myelins ist in der Abb. 4 zusammengestellt. Cholesterol und Cerebroside sind mengenmäßig die größten Fraktionen.

Oligodendrozyten umwickeln mit ihren Membranausläufern kurze Abschnitte der neuronalen Axone. Durch spiralförmige Umwickelung von Myelin um einen Axonabschnitt entsteht eine Mark- bzw. Myelinscheide (Abb. 5), die den axonalen Membranabschnitt elektrochemisch von der Umgebung isoliert, so dass an dieser Stelle keine Depolarisation der Membran möglich ist. Die Markscheiden sind entlang des Axons perlschnurartig angeordnet und durch marklose bzw. "nackte" Areale sog. Ranvier-Schürringe (Abb. 2) voneinander getrennt. Nur an den marklosen Membranabschnitten ist eine Depolarisation der axonalen Membran möglich. Durch diesen ultrastrukturellen Aufbau wird die Leitungsgeschwindigkeit der neuronalen Aktionspotentiale deutlich erhöht (= saltatorische Erregungsfortleitung).

Gleichzeitig vergrößert die Markscheide den Gesamtquerschnitt des Axons, wodurch ebenfalls die Leitgeschwindigkeit der Axone zunimmt (z.B. $11-16\mu m = 60-80 m/s$; $3\mu m = 3-15m/s$).

Eine weitere wichtige Funktion des Myelins beruht im Schutz und in der Ernährung der neuronalen Axone (Wilkins et al. 2003).

Im Rahmen der MS-Pathologie stellt gerade das Myelin bzw. die Myelinscheide das primäre Angriffsziel der entzündlichen Kaskade dar.

Die Beeinträchtigung oder der Zusammenbruch der Myelinscheide und Ausfall Ihrer physiologischen Leit- und Schutzfunktionen ist die Grundlage der klinischer Symptomatik (Bitsch et al. 2000; Kornek et al. 2000; Trapp et al. 1998).



Abb. 2

Schematische Darstellung eines myelinbildenden Oligodendrozyts. In der Regel ist 1 Oligodendrozyt für mehrere (bis zu 50) Axone zuständig. Modifiziert nach missinglink.ucsf.edu (2007)



Abb. 4

Die Komposition des Myelins unterscheidet sich von der Komposition gewöhnlicher Zellmembranen durch quantitative Unterschiede in den Lipidfraktionen und durch qualitativ unterschiedliche Proteinausstattung (v.a. MBP, MAG, MOG, PLP).

Zahlenquelle: Morell und Quarles (1999)





Analoge Darstellung zur Abb. 2 als
elektronenmikroskopische Aufnahme.
O – Oligodendrozyt, N – Nukleus, * - marklose
Nervenfaser, ⇒ - myelinisierte Axone.
Modifiziert nach neuropathologyweb.org (2007)





Markscheide aus Myelin gewickelt um ein Axon. Charakteristisch ist die geriffelte Struktur, die durch aneinandergelegte Zellmembran der Oligodendrozyten entsteht. Im Axon imponieren viele Neurofilamente und Mikrotubuli.

Übernommen von neuropathologyweb.org (2007)

1.2.4 Heterogenitätskonzept

In Subgruppen von MS-Patienten wurden verschiedene histopathologische Muster der Demyelinisierung gefunden (Lucchinetti et al. 1999; Lucchinetti et al. 2000; Lucchinetti et al. 1996). Die derzeit häufig zitierte histopathologische und Therapie-relevante Klassifikation der MS-Läsionen stammt von der Arbeitsgruppe Lucchinetti, Brück und Lassman (Lucchinetti et al. 2000). Die Untersuchungen an mehr als 200 MS-Fällen ergaben eine Aufteilung in 4 Klassen bzw. Typen.

In allen 4 Formen sind T-Zellen und Makrophagen in den entzündlichen Läsionen nachweisbar, aber offenbar in variabler Ausprägung aktiviert. Darüber hinaus sind andere Zelltypen wie z.B. B-Lymphozyten mit Antikörperproduktion und das Komplementsystem unterschiedlich involviert.

In den Typen I und II zeigt sich eine ausgeprägte entzündliche Komponente mit Infiltration der Läsionen mit T-Zellen und Monozyten/Makrophagen.

Der Typ I wird auch als sog. Makrophagen-vermittelte Demyelinisierung bezeichnet, da die Sekretionsprodukte von Makrophagen, wie z.B. $TNF\alpha$, die Pathologie vermitteln.

Im Typ II findet sich zusätzlich zu der T-Zell- und Monozyten-/Makrophageninfiltration der Nachweis von Komplementfaktoren und Immunglobulinen.

Das typische Merkmal der Typen III und IV ist die Schädigung der Oligodendrozyten.

Der Typ III zeichnet sich durch eine Oligodendrozytendysfunktion und den Verlust des myelinassoziierten Glykoproteins (MAG) aus der Myelinmembran.

Bei dem Typ IV imponiert durch einen apoptotischen Untergang der Oligodendrozyten insbesondere in der periläsionalen weißen Substanz. Eine detailliierte Übersicht der 4 histopathologischen Varianten bietet die Tabelle 3.

Lucchinetti, Brück und Lassman (Lucchinetti et al. 2000) postulierten durch mehrere Beobachtungen, dass neben dieser (4-fachen) interindividuellen histopathologischen Heterogenität doch eine strenge intraindividuelle Läsionshomogenität besteht.

Später, 2004, zeigten jedoch Barnett und Prineas, dass bei einem Patienten gleichzeitig unterschiedliche Läsionstypen auftreten können (Barnett und Prineas 2004). Barnett und Prineas erwähnten auch die Möglichkeit, das die einzelnen histopathologischen Typen evtl. bestimmte Stadien der Läsionsentwicklung im Rahmen der MS repräsentieren könnten (Barnett und Prineas 2004). Dies deutet darauf hin, dass die erwähnte Klassifikation noch nicht endgültig ist.

	Subtyp	Histopathologische Merkmale	Immunologische Mechanismen	Schematische Darstellung
Ι	Makrophagen-vermittelte Demyelinisierung	Perivenöse Verteilung der Läsionen mit radialer Ausbreitung, Infiltrate aus T- Zellen und Makrophagen	Demyelinisierung, durch Makrophagentoxine wie TNF-alpha, IFN- gamma und andere. Die Makrophagen und Mikroglia werden T- Zell- vermittelt aktiviert.	
Π	Antikörper-vermittelte Demyelinisierung	Muster ähnlich wie für Subtyp I, mit zusätzlicher Ablagerung von Immunglobulinen und aktiviertem Komplement in Arealen der aktiven Myelinzerstörung.	T-Zell-vermittelte Entzündung mit Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia; zusätzliche Zerstörung von Antikörper-markiertem Myelin durch das Komplementsystem	
III	Distale Oligodenrogliopathie	T-Zell- und Makrophagen-vermittelte Entzündung; Vaskulitis kleiner Gefäße mit Endothelzerstörung und Mikrothrombosen; degenerative Veränderungen von distalen, hauptsächlich periaxonalen, Abschnitten der Oligodendroztyten (Rückwärtsdegeneration) gefolgt von deren Apoptose und Demyelinisierung.	T-Zell-vermittelte Vaskulitis kleiner Gefäße mit einer sekundären ischämischen Schädigung der weißen Substanz	
IV	Primäre Oligodendropathie mit sekundärer Demyelinisierung	nicht- apoptosevermittelte Degeneration von Oligodendrozyten an der Grenze zwischen Läsion(Plaque) und weißer Substanz.	T-Zell-vermittelte Entzündung mit Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia. Demyelinisierung v.a. durch Makrophagen vor allem bei bereits metabolisch geschädigten Zellen	

Tabelle 3: Heterogenität der MS. Klassifikation nach Lucchinetti et al. (2000).

1.2.5 Allgemein Akzeptierte Pathogenese

In Anbetracht der pathogenetischen Heterogenität der MS ist es verständlich, dass man sich bisher auf keine eindeutige Pathogenese dieser Erkrankung festgelegt hatte.

Es wird diskutiert, dass die Pathogenese der MS grob funktionell in 2 Phasen eingeteilt werden könnte: Die initiale Phase zeichnet sich durch eine Aktivierung und Rekrutierung von Myelinspezifischen T-Lymphozyten in das ZNS aus. In der Effektorphase kommt es zur Aktivierung der autoreaktiven T-Zellendurch durch einen Kontakt mit antigenpräsentierenden Mikroglia und nachfolgend zur Induktion einer neuroinflammatorischen Kaskade, die dann zur Gewebsdestruktion und Demyelinisierung führt (Platten und Steinman 2005).

Im Detail lassen sich mehrere Teilschritte beschreiben. Zur Illustration dient die Abb. 6:

- In der Peripherie kommt es zur Bildung und Aktivierung von Autoreaktiven CD4+-T-Lymphozyten die vor allem gegen Proteinbestandteile des Myelins (MBP, MOG, MAG) gerichtet sind.
- 2. Durch Chemotaxis, Adhäsion und Migration überqueren die autoreaktiven CD4+-T-Lymphozyten die Bluthirnschranke und gelangen in das Zentrale Nervensystem (ZNS). Der Vorgang der transendothelialen Migration wird von einem komplexen Zusammenspiel aus zellulären Adhäsionsmolekülen (CAMs), Chemokinen und Chemokinrezeptoren (CCRs, CXCRs) sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) reguliert (*gekennzeichnet mit 1*). Die Expression von Adhäsionsmolekülen wird dabei von einigen Zytokinen (Interleukin 1, Interferon-γ und Tumornekrosefaktor α) positiv beeinflusst.
- Innerhalb des ZNS werden die CD4+-T-Zellen erneut durch antigenpräsentierende Zellen

 Mikroglia, Makrophagen und evtl. Astrozyten ,welche die Myelinbestandteile an dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse II präsentieren, reaktiviert (*gekennzeichnet mit 2*) (Greter et al. 2005). Dies bedarf der Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem gleichzeitigen Vorhandensein kostimulatorischer Signale.
- 4. Durch verstärkte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-2, IFNγ, TNFα) und Chemokinen (RANTES, IP-10, IL-8) aus Makrophagen und den CD4⁺-T_H1-T-Lymphozyten selbst, kommt es zur Aktivierung und Anlockung weiterer Makrophagen, Mikroglia und T-Zellen (*gekennzeichnet mit 3*). Außerdem stimuliert IFNγ die APC, die vermehrt MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren und somit zunehmend an der Antigenpräsentation beteiligt werden.
- 5. Die Demyelinisierung erfolgt durch aktivierte Makrophagen und Mikroglia mit gesteigerter Phagozytosefähigkeit und einer vermehrten Produktion von Zytokinen und freien Radikalen, wie z. B. TNFα, reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS), Lymphotoxin (LT), Stickstoffmonoxid (NO) und MMPs (*gekennzeichnet mit 4*), aber auch durch direkte

zelluläre Toxizität (Lassmann 1998; Neumann 2003; Sospedra und Martin 2005). Die gleichen Mechanismen werden für den späteren axonalen Schaden ursächlich gemacht.

- 6. Autoantikörper, welche von B-Zellen bzw. Plasmazellen produziert werden, tragen ebenfalls zur Gewebezerstörung bei (*gekennzeichnet mit 5*). Zudem können sie die Komplementkaskade aktivieren, was die Bildung des sog. Membran-Angriffs-Komplexes (C5b-9) zur Folge hat und zur Auflösung der Zielstruktur führt (*gekennzeichnet mit 6*).
- 7. Die Rolle der CD8⁺-T-Zellen in der MS-Pathogenese ist nicht schlüssig, scheint aber in letzter Zeit sehr große Relevanz zu bekommen. Es wurde beschrieben, dass das Ausmaß des axonalen Schadens mit der Anzahl infiltrierter zytotoxischer T-Zellen korreliert.
- Burch eine zeitversetzte Aktivierung von T-Supressorzellen und CD4+-T_H2-T-Lymphozyten kommt es zur Ausschüttung diverser antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, Il-10, TGF-β). Eine weitere Beruhigung der Entzündung wird durch die Apoptose der T-Helferzellen (CD4+-T_H1-T-Lymphozyten) gewährleistet. (Berlit 2006; Brück und Stadelmann 2005; Prat und Antel 2005)

1.3 MULTIPLE SKLEROSE: MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA

Die aktiven MS-Läsionen zeichnen sich durch eine prompte Infiltration mit zahlreichen aktivierten Makrophagen und Mikroglia aus. Diese übertreffen in ihrer Anzahl die restlichen, immunologisch aktiven Zellen um den Faktor 10-20, und unterstreichen dadurch ihre wichtige Rolle in diesem Geschehen. Sie werden mit dem Prozess der Demyelinisierung in direkten Zusammenhang gebracht (Barnett et al. 2006; Prineas und Graham 1981; Prineas et al. 1989; Prineas und Raine 1976).

Makrophagen und Mikroglia gehören zum mononukleären Phagozytensystem. Sie sind mesodermaler Herkunft und entstammen aus dem Knochenmark. Zu den grundlegenden Funktionen und Charakteristika dieser Zellen gehören: Entzündungs- und Granulomazellen, Antigenpräsentation, Phagozytose, Gewebereorganisation und Narbenbildung, Lipidstoffwechsel. Mikroglia sind gegenüber den Makrophagen ortsständig und gehören zu der Gruppe der Gewebsmakrophagen. Weitere typische Beispiele für die Gewebsmakrophagen sind die Kupffer-Sternzellen in der Leber, die Langerhans-Zellen in der Haut, Alveolarmakrophagen der Lunge, Osteoklasten im Knochen, Chondroklasten im Knorpel, Hofbauerzellen in der Plazenta. Die Mikroglia werden wegen der Ortsständigkeit auch als "residente Makrophagen des ZNS" bezeichnet (Ziegler-Heitbrock 1989). Im Falle einer inflammatorischen Aktivierung können Mikroglia zu Makrophagen umdifferenzieren (Li et al. 1996).



Abb. 6

Überblick über die Immunpathogenese der MS und die beteiligten Komponenten des Immunsystems. Modifiziert nach R&D-Systems (2006) und Kleinschnitz et al. (2007)

Die MS-Läsionen bestehen zum einen aus umgewandelten – aktivierten – Mikrogliazellen (Li et al. 1996) und zum anderen aus neu rekrutierten Makrophagen aus der Blutbahn (Barnett et al. 2006; Brück et al. 1995).

Wie bereits erwähnt, werden gegenwärtig Makrophagen und Mikroglia als Schlüsselzellen der entzündlichen Vorgänge in der Pathogenese der MS angesehen. Der Grund für ihren "Angriff" auf das normal-erscheinende Myelin ist bislang nicht bekannt. Ob es sich aber tatsächlich um einen "Angriff" handelt, ist fraglich. Die Wissenschaftler sind sich heute einig, dass die Makrophagen und Mikroglia die Hauptarbeit bei der Beseitigung von Myelin verrichten. Die Meinungen gehen aber auseinander, wenn es um die Art und Weise geht, in der dieser Prozess erfolgt. Wie wir bereits bei der Besprechung der MS-Pathogenese erwähnten, wird allgemein angenommen, dass Makrophagen und Mikroglia eine große Anzahl proinflammatorischer Substanzen bei der Myelinphagozytose produzieren und die Neurone und Oligodendrozyten dadurch schädigen. Somit werden sie von einigen Autoren für die eigentlichen "Vernichter" bei der MS gehalten (Brosnan und Raine 1996; Constantinescu et al. 2000; Mosley und Cuzner 1996; van der Laan et al. 1996; Williams et al. 1994). Die Arbeitsgruppen van der Laan et al. und Williams et al. zeigten, dass Makrophagen, die in vitro mit Myelin inkubiert worden sind, proinflammatorische Produkte, insbesondere TNF α und Stickoxide, ausschütten (van der Laan et al. 1996; Williams et al. 1994). Hierfür spricht auch, dass eine Suppression von Makrophagen und Mikroglia in Mäusen, die an EAE litten, ein deutlich milderer Krankheitsverlauf beobachtet werden konnte (Bauer et al. 1995; Brosnan et al. 1981; Huitinga et al. 1990), und die Induktion als auch die Aufrechterhaltung der EAE dadurch suppressiv zu beeinflussen war (Heppner et al. 2005).

Einige Autoren präsentieren aber eine andere Betrachtungsweise. Es gibt Hinweise dafür, dass die mononukleären Phagozyten in den MS-Läsionen hauptsächlich als Nekrophagen (Scavenger Zellen, Aasfresser) fungieren und das umliegende Gewebe nicht zerstören, sondern eher zu regenerieren scheinen (Barnett et al. 2006; Boven et al. 2006; Diemel et al. 1998; Liu et al. 2006).

Es ist bekannt, dass Makrophagen in zwei diametral unterschiedliche Richtungen aktiviert werden können (Gordon 2003; Mantovani et al. 2004; Mantovani et al. 2002; Mosser 2003; Stout und Suttles 1997). Die klassische Aktivierung der Makrophagen (=M1) wird typischerweise durch IFN γ , TNF α oder LPS induziert, wohingegen die alternative Aktivierung von Makrophagen (=M2) z.B. durch IL-10, IL-4 oder PGE₂ eingeleitet wird. Dabei ist die wichtigste Erkenntnis, dass alternativ aktivierte Makrophagen anti-inflammatorische und regenerative Eigenschaften aufweisen im Gegensatz zu klassisch aktivierten Makrophagen, die proinflammatorisch und destruktiv auf die Umgebung wirken. Eine schematische Darstellung dieser Erkenntnis bietet die Abb. 7. Boven et al. identifizierte im *post-mortem*-Nervengewebe von MS-Patienten durch Immunohistochemie von intrazellulären und oberflächlichen Marker sog. M2-Schaumzellen⁽¹⁾, welche den alternativ (de)aktivierten Makrophagen entsprechen (Boven et al. 2006). Er postulierte, dass Makrophagen aus MS-Läsionen gerade diesem Typus entsprechen und somit als Stabilisatoren der entzündlichen Reaktion fungieren können.

⁽¹⁾ **Schaumzellen** sind mit Lipiden überladene Makrophagen.



Abb. 7

Schematisch vereinfachte Darstellung der möglichen Aktivierungswege von Makrophagen.

In (A) ist der klassische Weg dargestellt (=M1). Die typischen Induktoren sind LPS, IFNγ und TNFα. In (B), Darstellung der alternativen Aktivierung (=M2) durch IL-4, IL-10, IL-13 und PGE₂. Die mittleren Abbildungen (rote Hintergründe) zeigen den aktivierten Zustand der Makrophagen mit dem typischen Sekretionsprofil von Signalmolekülen. In den Abbildungen rechts wurde der Effekt dieser Aktivierungswege auf das umliegende Gewebe dargestellt.

Modifiziert nach R&D-Systems (2004).

1.4 POINT OF INTEREST

Unsere Untersuchungen richten sich auf die Interaktion von Makrophagen und Mikroglia mit Myelin im Rahmen der MS-Pathogenese und die daraus resultierenden Effekte (repräsentiert durch den Punkt 4 in der Abb. 6).

Unser Interesse richtet sich dabei konkret auf die frühe Phase (bis 48h) nach der Myelinphagozytose und die Auswirkung von Myelin bzw. von der Myelinphagozytose auf die inflammatorische Aktivität und Vitalität von Makrophagen und Mikroglia. In der Abb. 7 sind diese Punkte im Bezug auf die MS-Pathogenese hervorgehoben.

1.4.1 PHAGOZYTIERTES MYELIN

Die Myelinphagozytose durch Makrophagen und Mikroglia wurde bereits von mehreren Autoren dokumentiert (Bauer et al. 1994; Epstein et al. 1983; Mosley und Cuzner 1996; Tanaka et al. 1975; van der Laan et al. 1996; Williams et al. 1994). Wenige Autoren liefern aber Erkenntnisse über das intrazelluläre Schicksal des Myelins nach der Phagozytose. Gerade die Myelin-Metabolite sollen nach Boven et al. eine wichtige immunmodulatorische Funktion erfüllen (Boven et al. 2006).

Wir möchten diese biologische Aktivität durch ultrastrukturelle und supplementäre *in-vitro*-Untersuchungen detaillierter betrachten, um in weiteren Untersuchungen deren Auswirkung auf die Makrophagen und Mikrogliazellen demonstrieren zu können. Schematisch hervorgehoben durch den Punkt 1 in der Abb. 8.

1.4.2 INFLAMMATORISCHE AKTIVITÄT NACH DER MYELINPHAGOZYTOSE: TNF α UND IP-10 Die inflammatorische Aktivierung dieser Zellen möchten wir anhand von 2 typisch proinflammatorischen Zytokinen überwachen - Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und das IFN γ induzierte Protein 10 (IP-10). Schematisch hervorgehoben durch den Punkt 2 in der Abb. 8.

TNF α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Mikroglia ausgeschüttet (Cannella und Raine 1995; Chao et al. 1995; Lee, S. C. et al. 1993; Merrill et al. 1993; Zajicek et al. 1992). Dieses Zytokin wurde im Rahmen der MS als die Substanz erkannt, deren Ausschüttung in aktiven MS-Läsionen zur Schädigung von Myelin und Oligodendrozyten führt (Selmaj und Raine 1988; Selmaj et al. 1991).

IP-10 (CXCL10) ist ein chemotaktisch wirksames Zytokin aus der Gruppe der CXC-Chemokine, und wird ebenfalls hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Mikroglia sezerniert. Die Sekretion von IP-10 kann durch IFN γ drastisch hochreguliert werden. Dieses Chemokin kann weitere Zellen des Immunsystems an den Ort des Geschehens rekrutieren. Hauptsächlich werden T-Lymphozyten und Makrophagen angelockt. Granulozyten werden nur minimal beeinflusst. Simpson et al. fand im *post-mortem*-Gewebe von MS-Patienten eine erhöhte Konzentration von IP-10 und ordnete es den aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen zu (Simpson et al. 2000).

1.4.3 VITALITÄT VON MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA NACH DER MYELINPHAGOZYTOSE

Bis dato gibt es wenige Berichte darüber, dass das Myelin bzw. die Myelinphagozytose eine Auswirkung auf die Vitalität der Immunzellen haben könnte. Kuhlmann et al. zeigten jedoch in einem Experiment, dass Makrophagen, die Myelin aus den peripheren Nerven phagozytiert haben, durch Apoptose absterben (Kuhlmann et al. 2001). Zudem fanden Nguyen, K. B. et al. apoptotisch veränderte mononukleäre Phagozyten in Meningen, perivaskulären Räumen und im Parenchym der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks bei Ratten, die an EAE oder an der chronisch schubförmigen EAE litten (Nguyen, K. B. et al. 1994). Es ist bekannt, dass Immunzellen, die in ihrer Funktion beeinträchtigt sind oder deren Funktion nicht mehr gebraucht wird, wie z.B. nach Beendigung einer inflammatorischen Reaktion, still durch Apoptose beseitigt werden können.

Der schubförmige Verlauf der MS deutet darauf hin, dass die immunologisch-entzündliche Maschinerie wiederholend selbstständig zum Erliegen kommt. Ob es durch die von Boven et al. beschriebenen (Boven et al. 2006) immunsuppressiven Effekte oder durch das Absterben der Zellen im Sinne eines programmierten Zelltodes (Kuhlmann et al. 2001; Nguyen, K. B. et al. 1994) geschieht, ist fraglich. Jedenfalls wäre der Hinweis, dass sich die Myelinphagozytose auf die Vitalität der Makrophagen und Mikrogliazellen auswirken kann, eine wichtige Beobachtung in diesem Zusammenhang (schematisch hervorgehoben durch den Punkt 3 in der Abb. 8).

1.5 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Als Erstes möchten wir zeigen, dass Makrophagen und Mikrogliazellen *in vitro* Myelinbruchstücke aus dem zentralen Nervensystem, suffizient und ohne eine notwendige Opsonisierung mit Komplementfaktoren, phagozytieren können. Die Bestätigung dieser Hypothese durch mikroskopische und fluorometrische Methoden ist die Grundvoraussetzung für unsere weiteren Untersuchungen.

Zum weiteren möchten wir die Wirkung der Myelinphagozytose, oder des Myelins selbst, auf die Makrophagen und Mikroglia demonstrieren. Dazu gehört zum einen die zeitliche und die dosisabhängige Analyse der Sekretion proinflammatorischer Zytokine TNF α und IP-10 in Myelin-behandelten Mikrogliazellkulturen. Zum anderen soll überprüft werden, ob sich die Myelinphagozytose auf die Vitalität der Makrophagen und Mikroglia auswirken kann, oder ob diese unbeeinträchtigt bleibt.



Abb. 8

Schematische Hervorhebung der in dieser Arbeit untersuchten Prozesse im Bezug auf die MS-Pathogenese. 1.Phagozytose von Myelin durch Makrophagen und Mikroglia. 2.Sekretion proinflammatorischer Zytokine TNF in IP-10 nach der Myelinphagozytose. 3.Vitalität der Makrophagen und Mikrogliazellen nach der Myelinphagozytose. Modifiziert nach R&D-Systems (2006)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ISOLATION, QUANTIFIZIERUNG UND MARKIERUNG VON MYELIN

2.1.1 ISOLATION

Myelin wurde aus dem Nervengewebe von 6 Monate alten Mäusen nach dem bekannten Protokoll von Norton und Poduslo (1973) gewonnen.

Die Isolation erfolgte in 5 Schritten.

2.1.1.1 Grobe Myelinpräparation

Ein Mausgehirn (ca. 500mg) wurde gewogen und mit 10ml einer 0,32 M Sucroselösung (5% Gewicht/Volumen) in einem Glashomogenisator (Dounce homogeniser) homogenisiert. In 2 Zentrifugenröhrchen wurden dann jeweils 5ml des Homogenates über die äquivalente Menge von 0,85 M Sucroselösung aufpipettiert. In einer auf 10°C vorgekühlten Ultrazentrifuge wurden die Lösungen bei 75 000 x g über 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die mittlere Fraktion bzw. Interphase (siehe Abb. 9), die grobes Myelin beinhaltet, entnommen. Der Rest wurde verworfen.



vor dem Zentrifugieren	nach dem Zentrifugieren	isoliertes Myelin	in der
	bei 75 000 × g	Interphase	

2.1.1.2 Auswaschen der Sucroselösung

Die Interphasen wurden jeweils in ein Zentrifugenröhrchen mit 10ml sterilem Wasser pipettiert und bei 75 000 x g über 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen.

2.1.1.3 Erster osmotischer Schock und Entfernung kleiner Membranfragmente Das Sediment wurde erneut mit 10ml sterilem Wasser resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis gelegt und anschließend bei 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen.

2.1.1.4 Zweiter osmotischer Schock

Identisch mit dem 3. Schritt.

2.1.1.5 Zentrifugieren eines diskontinuierlichen Sucrosegradienten zur Isolation des gereinigten Myelins

Die Sedimente aus beiden Röhrchen wurden insgesamt in 5,5ml einer 0,32 M Sucroselösung resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen auf 5,5ml einer 0,85 μ M Sucroselösung aufpipettiert. Analog zum Schritt 1 und 2 wurde das Myelin erneut zentrifugiert und von der Sucroselösung befreit. Zum Schluss wurde das gewonnene Myelin, je nach Ausbeute, mit 100 bis 1000 μ l PBS resuspendiert.

2.1.2 QUANTIFIZIERUNG

Die Myelinkonzentration wurde anhand des Proteingehalts im Myelin mit der Bradford-Assay bestimmt.

Als Standard wurde Bovines Serum-Albumin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) in einer Konzentrationsverdopplungsreihe bis 200 μ g/ml verwendet.

Protokoll:

- In eine 96-Well-Mikrotiterplatte jeweils doppelt 20μl Wasser, 20μl aus der Konzentrationsverdopplungsreihe und 20μl des 1:20 verdünnten Myelins pipettieren
- In jedes Well 200µl einer 1:5 verdünnten Lösung des BioRad dye reagent (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) pipettieren
- 3. Wellinhalt mischen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 4. In einem Photometer, bei 590nm für Messfilter und 540nm für Referenzfilter, auswerten.

2.1.3 MARKIERUNG

Myelin wurde mit Cy3, einem Cyanin-Farbstoff, markiert, um die Analysen mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie zu ermöglichen. Dazu wurde ein Cy3 Mono-Reactive Dye Pack von der Firma Amerrsham, Freiburg, D verwendet.

Myelin wurde in einer 0,1M NaHCO₃–Na₂CO₃ Lösung auf die Konzentration von 1mg/ml verdünnt. Dann wurde 1ml der verdünnten Lösung mit dem Cy3-Farbstoffpulver gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der ungebundene Farbstoff wurde mittels Gel-Chromatographie abgetrennt. Die finale Myelinkonzentration wurde mittels Photometrie bei 552nm bestimmt.

2.2 ZELLKULTUR VON PRIMÄREN MIKROGLIA UND PERITONEALEN MAKROPHAGEN

2.2.1 MIKROGLIA

2.2.1.1 Isolation von primären Mikroglia

Primäre Mikroglia wurden entsprechend der Methode nach Giulian und Baker (Giulian und Baker 1986) von Gehirnen neugeborener C57BL/6NCrl Wildtyp-Mäuse im Alter von 3-5 Tagen präpariert. Die Gehirne wurden von Meningen manuell befreit, im Kulturmedium für Mikroglia mechanisch zertrümmert und nachfolgend im PBS mit 0,25% Tripsin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) homogenisiert.

2.2.1.2 Kultur von primären Mikroglia

Die Zellen wurden in einer Zellkulturflasche (75cm²) mit 10ml Kulturmedium für Mikroglia und 10% Bovines Serum-Albumin (BSA) bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Eine Zelldichte von 85x10⁴ Zellen/ml wurde angestrebt. Nach 7 Tagen wurden die primären Mikroglia durch intensives Schaukeln der Zellkulturflasche für 2 Stunden bei 37°C und 200rpm ins Medium mobilisiert. Die Astrozyten blieben dabei am Boden der Zellkulturflasche haften. Die gesammelten Zellen wurden in einer neuen Zellkulturflasche mit 10ml oder direkt in einer 24-Well-Mikrotiterplatte mit 300µl/Kammer Kulturmedium für Mikroglia und 10⁶ Zellen /ml ausplattiert. Die Adhärenz und Morphologie der Zellen wurde mittels Lichtmikroskopie kontrolliert.

2.2.2 MAKROPHAGEN

2.2.2.1 Isolation von peritonealen Makrophagen

Die Peritonealmakrophagen wurden aus C57BL/6NCrl-Wildtyp-Mäusen (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, D) im Alter zwischen 7 und 13 Wochen gewonnen.

Um vermehrte Migration von Makrophagen in die Bauchhöhle zu induzieren, wurde das etablierte Modell einer durch Thioglykolat induzierten abakteriellen Peritonitis verwendet (Taylor et al. 2000). Die Maus wurde mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden) betäubt. Danach wurde 1 ml vom sterilen 3%-igen Thioglykolat (BD GmbH, Heidelberg, D) intraperitoneal appliziert. Nach 3 Tagen wurden die Makrophagen mittels Peritoneallavage isoliert und im Nährmedium durch Zentrifugieren bei $250 \times g$ mehrfach gewaschen.

2.2.2.2 Kultur von peritonealen Makrophagen

Für die Zellkultur wurden 24-Well-Zellkulturplatten verwendet. In ein Well mit 300μ l Nährmedium wurden $3x10^5$ Makrophagen pipettiert. Die Zellkulturplatte wurde für 24 Stunden bei 37° C und 10% CO₂ in einen Zellinkubator platziert, um die Makrophagen auf den Boden der Zellkulturplatte adhärieren zu lassen. Nach dieser Inkubationszeit wurden alle Wells unter

einem Lichtmikroskop auf Adhärenz und Morphologie der Makrophagen kontrolliert. Es wurde gleichzeitig eine Fotodokumentation erstellt.

2.2.3 Zellenberechnung

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurden 10µl des resuspendierten Sediments mit 90µl Trypanblau (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vermischt.

Trypanblau wird aufgrund der Membrandurchlässigkeit nur von den toten Zellen aufgenommen. Dabei erscheinen vitale Zellen klein und lichtbrechend, während tote Zellen vergrößert und blau-gefärbt erscheinen. Sowohl die Gesamtzellzahl pro Milliliter als auch der Prozentsatz vitaler Zellen in der Suspension kann mit dieser Methode bestimmt werden.

10µl von der Trypanblau-Zell-Suspension wurden an den Deckglasrand der Neubauer angebracht. Die Zellen wurden ausgezählt und auf Vitalität überprüft.

2.2.4 Puffer und Lösungen für die Zellkulturen

Alle Medien und Lösungen wurden mit Millipore Express® PLUS 0,22µm [Millipore, USA] filtriert.

2.2.4.1 PM Medium

Nährmedium für Peritonealmakrophagen in allen Versuchsphasen.

Menge	Produkt	Hersteller
435 ml	RPMI-1640	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
50 ml [10%]	Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
10 ml [2%]	Glutamax	Gibco, Eggenstein, D
5 ml [1%]	Penicillin / Streptavidin	Gibco, Eggenstein, D

Zusammensetzung für 500 Milliliter Medium:

2.2.4.2 Mikroglia Medium

Nährmedium für Mikroglia in allen Versuchsphasen.

Zusammensetzung für 500 Milliliter Medium:

Menge	Produkt	Hersteller
217,5 ml	DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
217,5 ml	HAM.F10	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
50 ml [10%]	Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
10 ml [2%]	Glutamax	Gibco, Eggenstein, D
5 ml [1%]	Penicillin / Streptavidin	Gibco, Eggenstein, D

2.2.4.3 PBS

Verdünnungsmedium und Waschmedium für ELISA.

Zusammensetzung für 1000 Milliliter Medium.

Menge	Produkt	Hersteller
1000 ml	Steriles Wasser	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
9,6 g	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

2.3 AUSWERTUNG DER PHAGOZYTOSE VON MYELIN IN VITRO

2.3.1 LICHTMIKROSKOPIE

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen von Makrophagenzellkulturen erfolgten nativ in einer 24-Well-Mikrotiterplatte und ohne Fixierung.

Dafür wurde das invertierte Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL der Firma Zeiss, Göttingen verwendet. Digitale Aufnahmen wurden mit einer Canon PowerShot G5 Digitalkamera erstellt.

2.3.2 Elektronenmikroskopie

2.3.2.1 Probenvorbereitung

Peritoneale Makrophagen wurden in einer 25cm^2 -Zellkulturflasche mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml (= 4,2x10⁶ Zellen/4,2ml) ausplattiert und bei 37°C, 10% CO₂ über Nacht inkubiert. Danach wurde die Zellkultur mit 5µg/ml Myelin für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellkultur mit frischem Medium 2-mal gewaschen. Die adhärenten Makrophagen wurden mit einem Zellschaber ins Medium mechanisch abgelöst und bei 250 × g, 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS resuspendiert und gewaschen. Der Waschprozess wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet mit 3% Glutaraldehyd (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) für 1-2 Stunden fixiert und 2-mal mit PBS gewaschen.

2.3.2.2 Protokoll der Fixierung und Einbettung

Das Zellpellet wurde nach folgendem Protokoll aufgearbeitet. Alle Reagenzien wurden von Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D erworben.

Nachfixieren				
1% OsO ₄	1 Stunde bei +4°C			
Auswaschen in PBS	2 x5 Minuten			
Dehydrieren				
50%-Ethanol	1x10 Minuten			
0,5% Uranylacetat in 70%-Ethanol	1 Stunde im Kühlschrank			
80%-Ethanol	1x10 Minuten			
96%-Ethanol	1x10 Minuten			
100% - Ethanol	1x15 Minuten			
Propylenoxid	2x10 Minuten			
Einbetten				
Araldit : Propylenoxid = 1:1	1x35 Minuten			
Araldit : Propylenoxid = 2:1	1x35 Minuten			
Araldit	1 Stunde (davon 20 Minuten bei Raumtemperatur und 40 Minuten im Brutschrank bei 40°C)			

Trocknen

In vorgetrocknete Kunststoffkapseln Araldit einfüllen, 48 Stunden bei 60°C Zellpellet einlegen

Schneiden

<0,1 µm dünne Schnitte mit dem Mikrotom Ultracut von der Firma Reichert Jung – heute Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D

2.3.2.3 Mikroskopie

Die Proben wurden mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop EM-10 der Firma Zeiss, Göttingen, D mikroskopiert.

2.3.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

2.3.3.1 Prinzip

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch gesaugt und eine Kapillare passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Vorher ist eine Inkubation mit Fluorophor-markierten Antikörpern notwendig. Die Zelle emittiert dabei Streulicht. woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Die Zellen Abb. 10 können in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden. Schematische Darstellung findet



Prinzip der Durchflusszytometrie

sich in der Abb. 10.

2.3.3.2 Durchführung

Primäre Mikroglia wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte und 3x10⁵ Zellen/Kammer inkubiert. Cy3-markiertes Myelin wurde den Zellen in Konzentration von 2µg/ml für 1, 2, 6 oder 24 Stunden zugegeben. Als Positivkontrolle wurden die Zellen zuerst mit 5µM Cytochalasin D für eine Stunde inkubiert und nachfolgend mit 2µg/ml Myelin. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D)

vom Kammerboden abgelöst. Die mittlere Fluoreszenzintensität vom Cy3-markierten Myelin wurde unmittelbar danach in einem Durchflusszytometer gemessen.

2.3.4 Konfokale Mikroskopie

Primäre Mikroglia wurden in einem Chamber Slide System (Objektträger mit Zellkammer) der Firma Nunc ausplattiert. Für 2 Stunden wurden die Zellen mit 2µg/ml Cy3-markierten Myelin bei 37°C und 10 CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) fixiert und mit 0,2% Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) permeabilisiert. Nach der Blockierung mit 10% Ziegenserum wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit Rattenantikörpern gegen das Lysosomenassoziierte-Membarnprotein-2 (LAMP-2) inkubiert. Das Zellsystem wurde mit PBS gewaschen und mit Cy5-markierten Ziegenantikörpern gegen Ratten-IgG für eine Stunde inkubiert. Schematische Darstellung der Zellpräparation findet sich in der Abb. 11



Markierung der Zielstrukturen für die Fluoreszenzmikroskopie. Lysosomen wurden mit Cy5 (grün) markiert. Myelin wurde mit Cy3 (rot markiert.) Modifiziert nach R&D-Systems (2004)

Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Mowiol fixiert. Die Objektträger wurden bis zur Durchführung der konfokalen Mikroskopie an einem dunklen Ort aufbewahrt.

2.4 Messung inflammatorischer Zytokine

Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IP-10, wurden in dieser Arbeit aus dem Zellkulturmedium mittels ELISA bestimmt.

2.4.1 SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

2.4.1.1 Prinzip

Diese Methode verwendet zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Epitopen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Eine schematische Veranschaulichung dieses Prinzips findet sich in der Abb. 12.

Der erste Antikörper (Capture Antibody) wird Boden 96-Wellam einer Mikrotiterplatte gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die Wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen (Target Protein). Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die ungebundenen Platte gewaschen. Die Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am



Abb. 12

Prinzip der ELISA. Beschreibung im Text. Modifiziert nach Cell-Signaling-Technology (2007).

(Capture-) Antikörper gebundene Antigen (Target Protein). Im nächsten Schritt wird ein Detektionsantikörper (Detection Antibody) zugegeben, der als prosthetische Gruppe das Vitamin Biotin besitzt. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex (deshalb der Name Sandwich-ELISA - das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Danach wird der Überschuss mit PBS ausgewaschen. Nun wird Streptavidin (Strep.) gebunden an die Meerrettichperoxidase (HRP) zugegeben. Streptavidin (Strep.) besitzt eine hohe Affinität zu Biotin, mit welchem die Detektions(Detection)-Antikörper konjugiert sind. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige Streptavidin-HRP Komplex ausgewaschen. Ein Chromogensubstrat (TMB Substrate) aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird zugegeben. Die Meerrettichperoxidase metabolisiert das Chromogensubstrat (klar durchsichtig) zu einem Chromogenprodukt, welches eine blaue Farbe aufweist. Die Farbenintensität ist proportional zur Menge des gesuchten Proteins bzw. Antigens. Die enzymatische Reaktion wird mit Stopppuffer beendet. Dabei ändert sich die Farbe des Chromogenproduktes in Gelb. Die quantitative Analyse erfolgt im Photometer.

2.4.1.2 Material

Produkt	Hersteller		
Mouse TNF-alpha/TNFSF1A DuoSet	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D		
Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D		
Substrate Reagent Pack (Color reagent A, Color reagent B)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D		

2.4.1.2.2 Puffer 2.4.1.2.2.1 Blockierungspuffer

arritight biochterungspunet			
Menge	Produkt	Hersteller	
	PBS		
1%	Bovine Serum Albumin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D	
5%	Sucrose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D	

2.4.1.2.2.2 Reagent Diluent

Menge	Produkt	Hersteller				
	PBS					
1%	Bovine Serum Albumin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D				

2.4.1.2.2.3 Stopppuffer

Menge	Produkt	Hersteller
2N	H_2SO_4	Merck KGaA, Darmstadt, D

2.4.1.3 Protokoll am Beispiel von $\mbox{TNF}\alpha$

- Capture Antibody im Verhältnis 1:180 mit PBS verdünnen und in eine 96-Well-Mikrotiterplatte 100µl pro Well pipettieren
- 2. Die Platte mit Klebefolie verschließen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubieren lassen
- 3. Platte ausschlagen und 3-mal mit PBS + 0,05% Tween waschen, auf Papier abtrocknen

- 4. 300μl Blockierungspuffer in jedes Well pipettieren und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- 5. Standard vorbereiten. Rekombinant hergestelltes TNFα auf eine vom Hersteller empfohlene Konzentration bringen (TNFα: 2000pg/ml) und in einer Serie 6-mal 1:2 im Reagent Diluent verdünnen. Als letzten Standard nur Reagent Diluent verwenden. Jeweils 100 µl in jedes Well pipettieren. Dieses zusätzlich als Duplikat in eine zweite Wellreihe wiederholen.

Well Nr.	1.	2.	3.	4 .	5.	6.	7.	8.
Konzentration	2000	1000	500	250	125	6 <i>2,5</i>	31,25	0
von TNFα	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml

- 6. Von den Zellüberständen (Proben) jeweils 100µl pro Well pipettieren. Duplikate erstellen.
- 7. Platte mit Folie verschließen und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubieren.
- 8. Platte ausschlagen und 3-mal mit PBS + 0,05% Tween waschen, auf Papier abtrocknen
- Detection Antibody 1:180 mit Reagent Diluent verdünnen und 100µl in jedes Well pipettieren.
- 10. Platte mit Folie verschließen und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubieren.
- 11. Platte ausschlagen und 3-mal mit PBS + 0,05% Tween waschen, auf Papier abtrocknen
- 12. Streptavidin-HRP mit Reagent Diluent 1:200 verdünnen und 100μl in jedes Well pipettieren.
- 13. Platte mit Folie verschließen und bei Raumtemperatur 20 Minuten im Dunkeln inkubieren.
- 14. Platte ausschlagen und 3-mal mit PBS + 0,05% Tween waschen, auf Papier abtrocknen
- 15. Chromogensubstrat aus 1:1 Color Reagent A (H_2O_2) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin) vorbereiten und 100 μ l in jedes Well pipettieren.
- 16. Platte mit Folie verschließen und bei Raumtemperatur 20 Minuten im Dunkeln inkubieren.
- 17. 50µl Stopppuffer pro Well pipettieren
- 18. Die Platte im Photometer mit 450nm für Messfilter und 540nm für Referenzfilter auswerten.
2.5 VITALITÄTSMESSUNGEN VON MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA

2.5.1 MIKROGLIA

2.5.1.1 MTT Assay

2.5.1.1.1 Prinzip

Der MTT Assay (Mosmann 1983) ist ein kolorimetrischer Test und beruht auf einer NADPHabhängigen Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes zu violetten Formazankristallen (siehe Abb. 13). Die Formazankristalle sind im Wasser unlöslich, weswegen es erforderlich ist, diese vor der photometrischen Messung z.B. mit Propanol aufzulösen.



Abb. 13

Prinzip und Ablauf der chemischen Reaktion bei dem MTT Assay.

Die Reduktion von MTT wird allgemein als "zelluläre Reduktionsaktivität" betrachtet (Marshall et al. 1995). Somit eignet sich der MTT Assay als Vitalitäts-(Satoh et al. 1996; Shearman 1996) und Zellproliferationsassay (Scudiero et al. 1988). Die Reaktion soll hauptsächlich durch mitochondriale Enzyme und Elektronentransporter, wie die Komplexe der Atmungskette, katalysiert werden (Marshall et al. 1995; Pereira et al. 1998; Satoh et al. 1996). Einige Arbeitsgruppen weisen aber darauf hin, dass die Reduktion von MTT auch durch eine Reihe von nicht-mitochondrialen Enzymen katalysiert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass das endoplasmatische Retikulum (Berridge und Tan 1993; Goodwin et al. 1996), das Zytosol (Goodwin et al. 1996) selbst und die Plasmamembranen (Bernas und Dobrucki 2000; Green und Pratt 1990; Nisimoto und Otsuka-Murakami 1990) an der Reduktion von MTT beteiligt sind. Bernas und Dobrucki (2002) haben gezeigt, dass nur 25%-45% des reduzierten Formazans in der unmittelbaren Nähe von Mitochondrien lokalisiert ist.

2.5.1.1.2 Material

Produkt	Hersteller
TACS TM MTT Cell Proliferation Assay	Trevigen Inc., Gaithersburg, USA

2.5.1.1.3 Protokoll

- Zellen in eine 24-Well-Platte ausplattieren, mit Myelin bzw. positiver Kontrolle (H₂O₂) behandeln.
- Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in jedes Well mit 300µl Inhalt 30µl von MTT pipettieren.
- 3. Die Platte für 2-4 Stunden bei 37°C inkubieren lassen.
- 300µl Detergent Reagent in jedes Well pipettieren und bei Raumtemperatur und im Dunklen f
 ür maximal 24 Stunden inkubieren.
- 5. Wellinhalt mischen und 100μ l in eine 96-Well-Platte umpipettieren.
- 6. Im Photometer mit Messfilter 570nm und Referenzfilter 650nm auswerten.

2.5.1.2 LDH Zytotoxizitätsassay

2.5.1.2.1 Prinzip

Assay

auf.

Der LDH-Zytotoxizitätsassay ist eine kolorimetrische Methode, welche die Aktivität bzw. Konzentration der freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) misst. Die Laktatdehydrogenase

(LDH) ist ein Enzym, welches die Oxidation von Laktat zu Pyruvat und die gleichzeitige Umwandlung von NAD+ zu NADH katalysiert. Steigt die LDH-Aktivität im Extrazellulärraum, so ist dies auf einen Zerfall von Zellen zurückzuführen. Dadurch kann die Zytotoxizität der zu behandelnden Substanz erfasst werden.

Auch

hier

werden -





Laborchemisch baut die LDH-Freisetzung
auf dem gleichen Prinzip wie der MTT-
Zytotoxizitätsassay.Prinzip und Ablauf der chemischen Reaktion bei dem LDH
Zytotoxizitätsassay.

Tetrazoliumsalze für die kolorimetrische Auswertung eingesetzt. Die ablaufende chemische Reaktion ist in der Abb. 14 dargestellt.

2.5.1.2.2 Material

Produkt	Hersteller
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega GmbH, Mannheim, D

2.5.1.2.3 Protokoll

- 1. Zellen in eine 24-Well-Platte ausplattieren, mit gewünschter Konzentration von Myelin bzw. positiver Kontrolle behandeln.
- Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden aus jedem Well 50µl Zellüberstand in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettieren.
- 3. 50µl von aufgelöstem Substrat in jedes Well dazu pipettieren
- 4. Die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne Lichteinwirkung inkubieren lassen.
- 5. 50µl von der Stop-Lösung in jedes Well pipettieren
- 6. Im Photometer bei 490nm (Messfilter) auswerten.

2.5.2 MAKROPHAGEN

2.5.2.1 Messung der Aktivität der Caspasen 3 und 7

2.5.2.1.1 Prinzip

Die Messung der Caspasen 3 und 7 basiert auf der Spaltung eines profluoreszenten Substrats durch die Caspasen 3 und 7. Das Substrat Rhodamine 110 (bis-[N-CBZL-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide; Z-DEVD-R110]) besitzt 2 Peptidmoleküle, die verhindern, dass es als Fluorophor aktiv wird. Nach der Abspaltung der Peptidmoleküle durch die Caspasen 3/7 und Exzitation bei 499nm, emittiert das Fluorophor grünes Licht von der Wellenlänge 521nm. Die Intensität ist proportional zur Caspasenaktivität. Die Messung erfolgt mit einem Fluoreszenzreader. Schematische Darstellung der ablaufenden Reaktion findet sich in der Abb. 15.



Abb. 15

Prinzip und Ablauf der chemischen Reaktion bei der Bestimmung der Caspasenaktivität 3 und 7. Enzymatische Spaltung des profluoreszenten Rhodamins 110 in ein fluoreszentes Produkt durch die Caspasen 3 und 7.

2.5.2.1.2 Material

Produkt	Hersteller
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim, D

2.5.2.1.3 Protokoll

- Zellen in einer schwarzen, undurchsichtigen 96-Well-Platte ausplattieren, mit Myelin bzw. positiver Kontrolle behandeln. Maximalvolumen 100µl/Well.
- Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in jedes Well 100μl des Substrat-Reaktionsgemisches pipettieren.
- 3. 30 Sekunden auf einem Mikrotiterplattenmischer bei 300-500 rpm schütteln lassen
- 4. Mindestens 30 Minuten und maximal 18 Stunden bei Raumtemperatur ohne Lichteinwirkung inkubieren.
- 5. Messung im Fluoreszenzreader Tecan Safire², bei Exzitation = 499nm und Emission=521nm

2.5.2.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta \Psi$

2.5.2.2.1 Prinzip

Das mitochondriale Membranpotential $\Delta \Psi$ wurde mit dem lipophilen Fluorophor JC-1 (5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazole-carbocyanine iodide) gemessen, welches selektiv in die Mitochondrien der Zelle diffundieren kann. JC-1 kann als Monomer oder als Polymer vorkommen. Ist das $\Delta \Psi$ intakt, so kann JC-1 die Mitochondrienmembran passieren und bildet unter der inneren Mitochondrienmembran, in der mitochondrialen Matrix, Polymere aus. Kommt es jedoch zur Schädigung der Mitochondrien, äußert sich das durch Zusammenbruch des $\Delta \Psi$ (Depolarisation). JC-1 bleibt dann als Monomer im Zytoplasma der Zelle.

Das JC-1 Monomer-unterscheidet sich von dem Polymer durch die Exzitations- und Emissionswellenlänge. Die Abb. 16 verdeutlicht diese Zusammenhänge.



2.5.2.2.2 Material

Produkt	Hersteller
Mitochondria Staining Kit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

2.5.2.2.3 Protokoll

- 1. Die Makrophagen in einer 24-Well-Mikrotiterplatte (für Fluoreszenzmikroskopie) oder einer schwarzen, undurchsichtigen 96-Well-Mikrotiterplatte inkubieren
- Die Zellkultur mit Myelin und positiven Kontrollsubstanzen behandeln. Mindestens 2 Wells für negative Kontrolle unbehandelt lassen.
- 3. 24 Stunden bei 37°C und 5%CO₂ inkubieren.
- 4. Vorbereitung der Färbelösung (Staining Solution):
 - a. 25µl der JC-1-Stock-Lösung (200x) mit 4ml Wasser (im Kit enthalten)
 - b. durch "Vortexen" die Lösung gut mischen
- Die F\u00e4rbel\u00f6sung mit dem Zellkulturmedium vermischen, so dass sich eine Konzentration von 5µg/ml JC-1 ergibt (Final Solution).
- $6. \quad 50 \mu l \ pro \ 100 \mu l \ Wellinhalt \ von \ der \ Final \ Solution \ in \ jedes \ Well \ pipettieren$
- 7. Ab hier vor Licht schützen!

- 8. 30 Minuten bis 1 Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubieren
- 9. Wells 2x mit PBS waschen
- 10. Mit PBS auf den ursprünglichen Wellinhalt auffüllen.

2.5.2.2.4 Quantitative Bestimmung – Fluorometrie

So schnell wie möglich einmal bei Exzitation 485nm / Emission 535nm (=Monomer) und einmal

bei Exzitation 535nm / Emission 590nm (=Polymer) im Tecan Safire² messen.

2.5.2.2.5 Qualitative Bestimmung - Fluoreszenzmikroskopie

So schnell wie möglich einmal beim grünen und einmal beim roten Filter mikroskopieren und digitale Aufnahmen erstellen. Verwendet wurde Nikon Eclipse TE2000-U.

3 ERGEBNISSE

Makrophagen und Mikroglia sind im Rahmen der Multiplen Sklerose die wichtigsten Effektorzellen, die in aktiven Läsionen Myelin bzw. Myelinbruchstücke phagozytieren. Die Meinung bezüglich der Rolle von mononukleären Phagozyten in inflammatorischen MS-Läsionen ist nicht schlüssig. Auf der einen Seite sollen Makrophagen und Mikroglia die inflammatorische Antwort potenzieren und den substantiellen Defekt vergrößern (Benveniste 1997; Mosley und Cuzner 1996; Probert et al. 1995; Raivich und Banati 2004; Selmaj und Raine 1988; Selmaj et al. 1991; Sospedra und Martin 2005; van der Laan et al. 1996; Williams et al. 1994), auf der anderen Seite wird diesen eine wichtige antiinflammatorische und regenerative Aufgabe zugeschrieben (Boven et al. 2006; Fadok et al. 1998).

Wir haben ein *in-vitro*-Modell der Myelinphagozytose nachgebaut, indem wir Makrophagen und Mikroglia mit unterschiedlichen Konzentrationen von Myelin inkubierten. Dabei fokussierten wir unsere Untersuchungen an das Verhalten der Zellen nach der Myelinphagozytose.

3.1 PHAGOZYTOSE VON MYELIN IN VITRO

Um die Auswirkungen der Myelinphagozytose auf die mononukleären Phagozyten untersuchen zu können, war es notwendig zu zeigen, dass in unserer *in-vitro*-Versuchsanordnung das Myelin sowohl von Makrophagen als auch von Mikroglia suffizient phagozytiert wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Myelin an der Zelloberfläche haftet und von den Zellen nicht internalisiert wird (Trotter et al. 1986). In weiteren vertiefenden Untersuchungen konnten wir die zellulären Kompartimente bestimmen, in denen sich das phagozytierte Myelin befindet, und eine quantitative Erfassung der Myelinphagozytose abhängig von der Zeit darstellen.

3.1.1 MAKROPHAGEN

3.1.1.1 Lichtmikroskopie

Murine peritoneale Makrophagen wurden in einer 24-Well-Zellkulturplatte (10^6 Zellen/ml) für 24 Stunden mit Myelin (0, 50, 100μ g/ml) inkubiert (37° C, 10% CO₂). Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Mittels Lichtmikroskopie wurden die unterschiedlich behandelten Zellen auf morphologische Veränderungen untersucht.

Die Zellen adhärieren am Boden der Platte und bilden eine Teppichschicht (Monolayer). Unbehandelte Makrophagen zeigen eine typische gezogene bis sternförmige Morphologie. Mit zunehmender Myelinkonzentration werden die Zellen runder und balloniert, sind aber weiterhin adhärent. Myelin imponiert in den Makrophagen als gelb-braune Bläschen. Ähnlich wie in den atheromatösen Plaques der Atherosklerose, kommt es durch eine starke Lipidbeladung zur Ausbildung sog. Schaumzellen.





Adhärierte **unbehandelte (0 µg/ml Myelin)** Makrophagen.

(24 nach Inkubation = 48 Stunden nach Isolation)





Makrophagen mit **5µg/ml Myelin**. Myelin imponiert als gelb-braune Bläschen. Pseudopodien-reiche Morphologie. (24 nach Inkubation)



Abb. 19

Makrophagen mit **50µg/ml Myelin**. Veränderung der Morphologie in ballonierte Zellen, kaum erkennbare Pseudopodien. (24 nach Inkubation)



Abb. 20

Makrophagen mit **100µg/ml Myelin**. Veränderungen ähnlich zur Abb. 19. (24 nach Inkubation)

3.1.1.2 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie bietet detaillierte Einsicht in die Ultrastruktur der Myelinphagozytose und schließt definitiv die Möglichkeit aus, dass Myelinpartikel an der Zelloberfläche haften ohne internalisiert zu werden.

Die Makrophagen wurden in einer 25cm^2 -Zellkulturflasche (10^6 Zellen/ml) für 24 Stunden mit $15 \mu \text{g/ml}$ Myelin inkubiert und anschließend nach dem Protokoll für die Elektronenmikroskopie präpariert.

In den Übersichtsaufnahmen in Abb. 21 und Abb. 22 kann man jeweils einen peritonealen Makrophagen mit multiplen Phagosomen erkennen, in denen sich phagozytiertes Myelin befindet. Gleichzeitig sind mehrere Lipidansammlungen (Lipidtröpfchen) in den Zellen zu finden. Diese besitzen keine begrenzende Membran und sind Ausdruck eines aktiven Myelinabbaus. Aus der Zelloberfläche stülpen sich multiple Pseudopodien aus, was auf eine Phagozytoseaktivität hindeutet. Extrazellulär findet sich noch unphagozytiertes Myelin.



Abb. 21

Makrophage mit phagozytiertem Myelin: Φ – Makrophage, **My** – Myelin, * – Phagolysosom, **Lip** – Lipidtröpfchen, **Nu** – Nukleus; 5.000-fache Vergrößerung





Makrophage mit phagozytiertem Myelin: Φ – Makrophage, **My** – Myelin, **PLys** – Phagolysosom, **Lip** – Lipidtröpfchen, **Nu** – Nukleus, **grünes Rechteck** – Vergrößerung in der Abb. 23; 5.000-fache Vergrößerung

Innerhalb der Phagolysosome erkennt man die intakte Myelinstruktur (*) mit spiralartig umwickelten Zellmembranen. Gleichzeitig findet eine aktive Auflösung und Degeneration (¤) der Myelinstruktur (Abb. 23 und Abb. 24) statt.



Abb. 23

Degeneration von Myelin in Phagolysosom: Φ – Makrophage, **My** – Myelin, **Ex** – Extrazellulärraum, **Ps** – Pseudopodium, * - intakte Myelinstruktur, **¤** – aufgelöste und degenerierte Myelinschichtung 100.000-fache Vergrößerung



Abb. 24

Degeneration von Myelin im Phagolysosom: Φ – Makrophage, **My** – Myelin, **Ex** – Extrazellulärraum, **PLys** – Phagolysosom, * - intakte Myelinstruktur, **¤** – aufgelöste und degenerierte Myelinschichtung, **Mit** – Mitochondrium Typ Cristae. 80.000-fache Vergrößerung

Myelin wird von den Zellen internalisiert und befindet sich in Phagolysosomen. In diesen kommt es zur aktiven Auflösung und Zerstörung der physiologischen Ultrastruktur. In den Makrophagen sind mehrere Lipidablagerungen als Lipidtröpfchen zu finden.

3.1.2 MIKROGLIA

3.1.2.1 Fluoreszenzmikroskopie: qualitativer Nachweis

Mikroglia, auch als residente Makrophagen des ZNS bezeichnet, sind genauso wie die peritonealen Makrophagen befähigt Myelin zu phagozytieren.

Um dies für unsere *in-vitro*-Versuchsanordnung verifizieren zu können, haben wir das isolierte Myelin unspezifisch mit einem Cy3-Fluorophor markiert. Eine Mikrogliazellkultur wurde dann für 24 Stunden mit 2µg/ml markiertem Myelin inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und mit einem zweiten, gegen LAMP-2 gerichteten und Cy5-Fluorophorkonjugierten, Antikörper behandelt. LAMP-2 (lysosome-associated membrane protein 2) ist ein hoch N-glykosiliertes Protein in der Lysosomenmembran. Es findet sich nicht in der Zellmembran (Eskelinen et al. 2003).

Mittels Fluoreszenzmikroskopie war es dann möglich die Myelinbruchstücke im Bezug zu den (Phago-)Lysosomen zu lokalisieren. Die Abb. 25 zeigt in der überlagerten Aufnahme eine örtliche Übereinstimmung von phagozytierten Myelinpartikel und (Phago-)Lysosomen. Hiermit konnten wir zeigen, dass auch Mikroglia Myelin *in vitro* internalisieren und dieses sich in (Phago-)Lysosomen befindet.



Myelin



Überlagerung

Abb. 25

Lokalisation des internalisierten Myelins innerhalb der Lysosome. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Im linken Bild: Lokalisation von Cy3-markiertem Myelin (dargestellt in rot). Im mittleren Bild: Lokalisation von (Phago-)Lysosomen mittels Cy5-markierten LAMP-2 Antikörper (dargestellt in grün). Im rechten Bild eine Überlappung. Messbalken entsprechen 10µm.

3.1.2.2 Durchflusszytometrie: quantitativer Nachweis

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen lediglich im Sinne einer Momentaufnahme (Auswertung nach 24 Stunden) den qualitativen Nachweis, dass Myelin von Mikroglia und Makrophagen phagozytiert wurde.

Um die Dynamik der Myelinaufnahme zu eruieren, wurden die Mikroglia in einer 24-Well-Mikrotiterplatte kultiviert und mit 2 μ g/ml Cy3-markierten Myelin für 0, 1, 2, 6 und 24 Stunden behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde dann die mittlere Fluoreszenzrate (mFR) gemessen, welche die ingestierte Myelinmenge repräsentiert.

Die Abb. 26 zeigt die resultierende Dynamik der Myelinaufnahme durch Mikroglia.

Die Myelinphagozytose steigt proportional mit der Zeit an und ist bereits 1 Stunde nach der Behandlung mit Myelin messbar. Ein Maximum wurde nach einer 6-stündigen Inkubation erreicht. Nach einer 24-stündigen Inkubation ist die mittlere Fluoreszenzrate überraschend erniedrigt.

Als Kontrolle wurde eine Zellkultur für 1 Stunde mit 5µM Cytochalasin D prä-inkubiert und danach für 1 weitere Stunde mit 2µg/ml Cy3-Myelin und 5µM Cytochalasin D behandelt. Dies führte zu einer annähernd vollständigen Blockierung der Myelinphagozytose. Cytochalasin D ist ein bekannter Inhibitor der Phagozytose, der die Aktinfilamentformation und –polymerisation hemmt (Mimura und Asano 1976).



Abb. 26

Quantitative Unterschiede in der Myelinphagozytose durch Mikroglia abhängig von der Zeit. Die Menge am phagozytierten Myelin, hier als mittlere Fluoreszenzrate (mFR) des Cy3-Fluorophors gemessen, steigt mit der Inkubationszeit an. Bereits nach 1 Stunde ist ein signifikantes Signal zu messen. Maximum wurde nach 6 Stunden erreicht. Die Inkubation über 24 Stunden lieferte einen erniedrigten Wert.

Bei den mit Cytochalasin D behandelten Zellen kam es zu einer Blockierung der Myelinphagozytose (Alle Messungen wurden unabhängig voneinander, mit gleicher Tendenz, mindestens 3-mal durchgeführt. Statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA), verglichen mit der Inkubation zum Zeitpunkt 0 Stunden, *p<0,05; n=3 pro Säule, SF=Standardfehler).

3.2 Phagozytose von Myelin supprimiert Sekretion inflammatorischer Zytokine in Mikroglia

Wie bereits erwähnt, wird in der Literatur die Rolle der Makrophagen und Mikroglia im Rahmen der MS, und deren Tiermodell - EAE, sehr kontrovers besprochen. Einige Autoren sehen diese Zellen als die eigentlichen "Vernichter" bzw. die Ursache für die aktive Myelinzerstörung und den axonalen Schaden in aktiven in EAE- und MS-Läsionen (Brosnan und Raine 1996; Constantinescu et al. 2000; Mosley und Cuzner 1996; van der Laan et al. 1996; Williams et al. 1994). Pathophysiologisch wird dieser Effekt durch das Ausschütten einer Reihe von inflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-6, IP-10, freien Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid erklärt.

Im Gegenteil sehen andere Autoren mononukleäre Phagozyten als Nekrophagen bzw. *Scavenger*-Zellen und "Stabilisatoren" der Inflammation mit Ausschüttung neurotropher und antiinflammatorischer Substanzen (Boven et al. 2006; Kerschensteiner et al. 1999). Die Myelinphagozytose wird dabei als physiologische Antwort auf eine vorausgegangene Schädigung und Zerstörung des Myelins interpretiert.

Unser Ziel war, durch ein geeignetes *in vitro* Modell, die Sekretion inflammatorischer Zytokine (TNFα und IP-10) nach der Myelinphagozytose in Mikrogliazellen zu untersuchen.

3.2.1 Zytokinsuppression in IFN γ-aktivierten Mikroglia

IFN_γ wird vor allem von autoreaktiven T-Lymphozyten sezerniert und spielt eine wichtige Rolle in der Induktion und Unterhaltung einer lokalen inflammatorischen Antwort in der MS-Pathogenese. Zu den Hauptrespondern von IFN_γ gehören vor allem die mononukleären Phagozyten. Diese werden somit aktiviert, was bedeutet, dass z.B. die Zellgröße, Anzahl der Lysosome, metabolische Aktivität und die Phagozytosefähigkeit zunehmen (Kumar et al. 2005B). Durch IFN_γ kommt es auch zur erhöhten Transkription von TNF α (Noronha et al. 1993) und IP-10 (IFN_γ-induziertes Protein 10). Die Ausschüttung von TNF α führt zur Schädigung von Myelin und Oligodendrozyten (Selmaj und Raine 1988; Selmaj et al. 1991) und IP-10 rekrutiert weitere Immunzellen in das "Zentrum des Geschehens".

Wir aktivierten primäre Mikroglia mit IFN γ (100 IU/ml) und behandelten diese anschließend für 24 Stunden mit 0, 5, 10, 50 µg/ml Myelin bzw. für die Positivkontrolle mit Latexpartikel. Die Zytokinsekretion (TNF α , IP-10) wurde anschließend mittels ELISA aus dem Zellkulturmedium bestimmt.

Die Myelin-behandelten (5, 10, 50 μ g/ml Myelin) Zellen zeigten (Abb. 27 A und C) nach 24 Stunden eine reduzierte Sekretion von TNF α und IP-10. Die Sekretion von TNF α verhielt sich umgekehrt proportional zur steigenden Myelinkonzentration.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (0 μ g/ml Myelin), führten die Latexpartikel zur keinen signifikanten Veränderung der TNF α und IP-10 Sekretion.





Myelinphagozytose supprimiert die Sekretion von TNFα und IP-10 in IFNγ-aktivierten Mikroglia

Die Zellkultur primärer Mikroglia wurde 24 Sunden mit IFNy prästimuliert, anschließend

(A),(C) mit 0, 5, 10 oder 50µg/ml Myelin und IFNγ für weitere 24 Stunden

oder

(B),(D) mit 10 μ g/ml Myelin und IFN γ für weitere 0, 1, 3, 6, 24 oder 48 Stunden

inkubiert.

(Alle Messungen wurden unabhängig voneinander mindestens 3-mal durchgeführt. Statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) verglichen mit unbehandelten IFNγ-aktivierten Zellen, *p< 0,05; #p> 0,05; n=3-10 pro Säule).

In einer Folgeuntersuchung behandelten wir IFN γ -aktivierte Mikroglia mit 10 μ g/ml Myelin für unterschiedliche Zeitintervalle (0, 1, 3, 6, 24, 48 Stunden). Dadurch wollten wir die sekretorische Aktivität inflammatorischer Zytokine abhängig von der Zeit darstellen. Die Sekretion von TNF α und IP-10 wurde ebenfalls mittels ELISA aus dem Zellkulturmedium bestimmt. Die Behandlung mit Myelin führte (Abb. 27 B und D) zu einer passageren Sekretionserhöhung der proinflammatorischen Zytokine (TNF α und IP-10) in der ersten Phase (\leq 6 Stunden) und zu einer zunehmenden und schließlich signifikanten Suppression beider Zytokine in der zweiten Phase (6-48 Stunden).

Mit dieser Untersuchung konnten wir einen Zusammenhang zwischen der Myelinphagozytose und Suppression der inflammatorischen Zytokine $TNF\alpha$ und IP-10 abhängig von der Zeit demonstrieren.

3.2.2 Zytokinsuppression in IFN y- und LPS-stimulierten Mikroglia

Das bakterielle Endotoxin, Lipopolysaccharid (LPS), aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, ist ein potenter Stimulator von Makrophagen und Mikroglia (Nguyen, M. D. et al. 2002; Toshchakov et al. 2002). LPS vermittelt seine Wirkung, gebunden an das LPS-bindende-Protein (LBP), über den membranständigen CD14-Rezeptor (Nguyen, M. D. et al. 2002). Dadurch entsteht ein Aktivatorkomplex (CD14/LPS/LBP), der durch den Toll-like-Rezeptor (TLR)-4 die Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia einleitet (schematische Darstellung in Abb. 28).



Abb. 28

Abfolge der Aktivierung von mononukleären Phagozyten durch das LPS. Modifiziert nach Janeway (2001).

Die Phagozytoseaktivität wird hochreguliert (Blander und Medzhitov 2004; Doyle et al. 2004), und der inflammatorische "Zytokinhintergrund" durch vermehrte Sekretion von TNF α , IL-6 und IL-1-beta angehoben. Bell et al. zeigten, dass Makrophagen und Mikroglia eine erhöhte Expression von *Scavenger*–Rezeptoren nach einer LPS-Exposition aufweisen (Bell et al. 1994). Gerade das *Scavenger*-Rezeptor ist einer der Kandidaten, die an der Myelinphagozytose beteiligt sein könnten (Mosley und Cuzner 1996; Smith 2001). 2006 zeigte Vallieres et al., dass eine systemische LPS-Injektion die Myelinphagozytose während der Wallerschen-Degeneration nach traumatischer Rückenmarksschädigung in Mäusen beschleunigt (Vallieres et al. 2006). Diese aktivierenden LPS-Effekte eignen sich, um die von uns postulierte inflammatorischsuppressive Wirkung des Myelins bzw. der Myelinphagozytose auf die Mikroglia zu verdeutlichen.

Die Zellkultur primärer Mikroglia wurde mit der Kombination von IFN γ (100 IU/ml) und LPS (100 ng/ml) für 24 Stunden prä-aktiviert. Es folgte eine Behandlung der so aktivierten Zellen mit Myelin in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10 und 50 µg/ml) über 24 Stunden.

Die Abb. 29 zeigt supprimierte Sekretion von TNF α und IP-10 in Myelin-behandelten Mikroglia. Die Sekretionshemmung von TNF α verhielt sich proportional zu der zugegebenen Myelinkonzentration.

Die Inkubation mit Latexpartikeln führte zu keiner Veränderung in der Sekretion von TNF α und zu einer reduzierten Sekretion von IP-10.





Myelinphagozytose supprimiert Sekretion von TNF α und IP-10 in einer mit IFN γ und LPS prä-stimulierten Mikrogliazellkultur

Die Zellkultur wurde mit IFNγ und LPS prä-stimuliert und für 24 Stunden mit 0, 5, 10 oder 50µg/ml Myelin und den Prästimulatoren inkubiert.

(A) TNF α Sekretion wurde direkt proportional zur Myelinkonzentration supprimiert

(B) IP-10 Sekretion wurde unabhängig von der Myelinkonzentration reduziert

(Alle Messungen wurden unabhängig voneinander, mindestens 3-mal durchgeführt. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA vs./verglichen mit IFNγ und LPS aktivierten Kontrolle, *p< 0,05, #p>0,05; n=3-8 pro Säule).

In einer Folgeuntersuchung haben wir Mikroglia zuerst mit Myelin für 24 Stunden ohne Prästimulatoren inkubiert. Anschließend wurde das nicht-phagozytierte Myelin, durch Wechsel des Kulturmediums, entfernt. Für weitere 6 Stunden wurde dann die Zellkultur nur mit 10 ng/ml LPS (post-)stimuliert.

Auch in dieser Versuchsanordnung wurde die Sekretion von TNF α in Myelin-behandelten Mikroglia supprimiert. Erst eine höhere Konzentration (200µg/ml) von Myelin zeigte eine signifikante Sekretionsminderung von TNF α (Abb. 30).



Abb. 30

Höhere Konzentrationen von Myelin supprimieren die Sekretion von TNF α aus LPS-aktvierten Mikroglia Primäre Mikroglia wurden mit 100 µg/ml oder 200 µg/ml Myelin für 24 Stunden inkubiert, dann wurde extrazelluläres Myelin durch Auswechseln des Kulturmediums ausgewaschen. Die Zellen wurden für weitere 6

Stunden in einem Kulturmedium mit 10 ng/ml LPS inkubiert.

Erst eine höhere Konzentration von Myelin (200µg/ml) führte zu einer signifikant reduzierten TNFα-Sekretion in den nachträglich mit LPS-stimulierten Mikroglia.

(Alle Messungen wurden unabhängig voneinander, mindestens 3-mal durchgeführt. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA vs./verglichen mit einer Kontrolle, die nicht mit Myelin behandelt wurde, *p< 0,05, #p> 0,05; n=3 pro Säule).

3.3 Makrophagen und Mikroglia zeigen veränderte Vitalitätsparameter nach der Myelinphagozytose

3.3.1 VITALITÄTS- UND ZYTOTOXIZITÄTSASSAY VON MIKROGLIAZELLKULTUREN

Wir überprüften die Vitalität der Mikroglia nach Myelinphagozytose mittels MTT-vitalitäts- und LDH-Zytotoxizitätsassay und verglichen sie mit Wasserstoffperoxid-behandelten (H₂O₂) Zellen.

Wasserstoffperoxid, als Vertreter der ROS, kann durch Induktion von oxidativem Stress zur Schädigung von vitalen Zellen führen. Abhängig von der verwendeten Konzentration, kann sowohl Apoptose als auch Nekrose ausgelöst werden (Forrest et al. 1994; Teramoto et al. 1999). Für beide Assays (MTT und LDH) wurden die Mikrogliazellkulturen für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen von Myelin (0, 5, 10, 50, 100 μ g/ml) und Wasserstoffperoxid (100, 200, 500, 100 μ M) behandelt. Die Kultivierung der Mikrogliazellen erfolgte analog zu den vorherigen Untersuchungen – in einer 24-Well-Zellkulturplatte (10⁶ Zellen/ml) bei 37°C und 10% CO₂.

Die Abb. 31 zeigt die Ergebnisse für beide Assays. Der Zytotoxizitätsassay zeigte eine LDH-Liberation lediglich bei Zellkulturen, die mit 500 und 1000 μ M H₂O₂ behandelt wurden. Bei Myelin-behandelten und mit niedrigen Konzentrationen (100, 200 μ M) von H₂O₂ behandelten Mikroglia war die LDH-Liberation den unbehandelten Zellen (0 μ g/ml Myelin) gleichzusetzen.

Der MTT-Vitalitätsassay korrelierte mit den Ergebnissen des LDH-Zytotoxizitätsassays.

Mit H_2O_2 behandelte Zellen zeigten bei niedrigen Konzentration (100, 200 μ M) keine Minderung der MTT-Reduktion und wiesen ähnliche Vitalität wie unbehandelte Zellen auf. Mit steigender H_2O_2 Konzentration, ab 500 μ M, verminderte sich signifikant die Fähigkeit der Zellen MTT zu reduzieren.

Überraschend sind die Ergebnisse der Myelin-behandelten Zellen, wo die MTT-Reduktion, die der unbehandelten Zellen weit überschreitet. Mikrogliazellkulturen, die z.B. mit 100µg/ml Myelin behandelt wurden, zeigen eine 2,5–fache MTT-Reduktionsfähigkeit, gegenüber den unbehandelten Mikroglia. Die MTT-Reduktionsaktivität stieg direkt proportional zur verwendeten Myelinkonzentration an.



Abb. 31

Einfluss der Myelinphagozytose auf die Vitalität und Zytotoxizität von Mikroglia

(A) Myelinphagozytose zeigt keine zytotoxischen Effekte auf Mikroglia. Hier als relative LDH-Liberation in Prozent dargestellt. Unbehandelte Zellen (0 μg/ml Myelin) entsprechen 100%. H₂O₂ wirkt in höheren Konzentrationen (500, 1000μM) zytotoxisch.

(B) In dem Vitalitätsassay wird MTT von Myelin-behandelten Mikroglia mit steigender Myelinkonzentration vermehrt reduziert. H_2O_2 führt in höheren Konzentrationen (500, 1000µM) zur Abnahme der MTT-Reduktionsfähigkeit. Quantitative Bestimmung von MTT mittels Photometrie. Hier als relative optische Dichte in Prozent dargestellt. Unbehandelte Zellen (0 µg/ml Myelin) entsprechen 100%.

(Alle Messungen wurden unabhängig voneinander, mindestens 3-mal durchgeführt. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA vs./verglichen mit einer Kontrolle, die nicht mit Myelin behandelt wurde, *p< 0,05; n=3-4 pro Säule).

3.3.2 Erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 7 in Myelin-behandelten Makrophagen

Für die Mikroglia haben wir bereits die Auswirkung der Myelinphagozytose auf die Vitalität gezeigt. Hierbei handelte es sich eher um einen Suchtest nach Nekrose und Zelllyse (LDH Freisetzung, Herabsetzung der MTT-Reduktion wegen Funktionsverlust der Mitochondrien), die nur bei starker und abrupter Zellschädigung entsteht.

Erfolgt jedoch die Schädigung langsam, bzw. nach und nach, kommt es zur Induktion der Apoptose in der Zelle (Kumar et al. 2005A). Mit den vorherigen Vitalitätstests lässt sich der programmierte Zelltod nicht suffizient erfassen.

Die Apoptose ist ein aktiver Prozess, charakterisiert durch nukleäre und zytoplasmatische Schrumpfung (Kondensation) und Zerfall der Zelle in kleine membranumhüllte Fragmente sog. *apoptotic bodies*. Diese morphologischen Veränderungen werden durch aktivierte Effektorcaspasen 3 und 7 eingeleitet (Kumar et al. 2005A). Durch die Aktivitätsmessung dieser Caspasen konnten wir zeigen, dass Myelin bzw. Myelinphagozytose zur Induktion der Apoptose in Makrophagen führt.

Wir behandelten Zellkulturen von peritonealen Makrophagen mit Myelin (0, 2, 5, 10, 50, 100 μ g/ml) und für die Positivkontrolle mit Ceramid (10, 20, 40 μ M) oder Wasserstoffperoxid (600, 1000 μ M von H₂O₂) in unterschiedlichen Konzentrationen über 24 Stunden.

Ceramid ist ein potenter Induktor der Apoptose in Makrophagen (Hannun und Obeid 1995; Kolesnick und Golde 1994; Lakics und Vogel 1998). Es ist ein Lipid, welches als *second messenger* in der Zelle fungiert und von den membranständigen Sphingomyelinasen gebildet wird.

Die Verwendung von H₂O₂ als Positivkontrolle erfolgte zur Abgrenzung von der Nekrose.

Die Aktivität der Caspasen 3/7 wurde direkt in den Mikrotiterplatten mittels Luminometrie gemessen.

Ergebnisse

Die Abb. 32 zeigt, dass mit steigender Myelinkonzentration die 3/7 Caspasenaktivität proportional zunimmt. Die Caspasenaktivität ist bei der Inkubation mit 50 und 100 μ g/ml Myelin nahezu gleich und im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant erhöht. Auch Ceramid induziert Apoptose bei peritonealen Makrophagen. Die Inkubation mit 40 μ M führte zu einem signifikanten Anstieg der Caspasenaktivität, jedoch nicht so ausgeprägt, wie bei den Myelin-behandelten Zellen in höheren (50, 100 μ g/ml) Konzentrationen. Wasserstoffperoxid führte in den Konzentrationen von 600 und 1000 μ M zur signifikanten Minderung der Caspasenaktivität und wurde hier als Positivkontrolle der Nekrose verwendet.





Myelinphagozytose induziert Apoptose in peritonealen Makrophagen

Relative Aktivitätsmessung der Caspasen 3/7 in Prozent als Apoptoseindikator. Unbehandelte Makrophagen (0 µg/ml) stellen mit 100% den Ausgangszustand (vitale Zelle, keine Caspasenaktivierung) dar.

In den Myelin-behandelten Makrophagen erhöhte sich die Caspasenaktivität proportional zur verwendeten Myelinkonzentration. Als Positivkontrolle für die Apoptose wurden Makrophagen mit Ceramid behandelt. Bei 40µM kam es zur signifikanten Apoptoseinduktion. Wasserstoffperoxid-behandelte Makrophagen repräsentieren die Positivkontrolle der Nekrose.

(Alle Messungen wurden unabhängig voneinander, mindestens 2-mal durchgeführt. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA vs./verglichen mit einer Kontrolle, die nicht mit Myelin behandelt wurde, *p< 0,05, #p> 0,05; n=2-5 pro Säule).

3.3.3 Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials in Makrophagen Nach der Myelinphagozytose

Um die Ergebnisse der vorherigen Untersuchung zu verifizieren, haben wir eine zusätzliche Methode zu Apoptosebestimmung eingesetzt.

Energie, die durch oxidative Prozesse in der mitochondrialen Atmungskette freigesetzt wird, wird als negativer elektrochemischer Protonengradient über der inneren mitochondrialen Membran gespeichert. Zu den ersten möglichen Zeichen der Apoptose, noch vor morphologischen Veränderungen der Zelle, gehört der Zusammenbruch dieses mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) (Castedo et al. 1995; Cossarizza et al. 1995; Petit et al. 1995; Zamzami et al. 1995; Zamzami et al. 1996).

Die Integrität der mitochondrialen Membran wurde mit dem lipophilen Fluorophor JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin Iodid) gemessen. Das Fluorophor bildet ein Polymer (rot, ext. 590nm), wenn es in die Mitochondrien mit intaktem $\Delta\Psi$ aufgenommen wird. Ist das $\Delta\Psi$ der Mitochondrien depolarisiert, bleibt JC-1 als Monomer (grün, ext. 535nm) im Zytoplasma (siehe Abb. 16 im Kapitel 2. Material und Methoden).

Wir inkubierten Zellkulturen von peritonealen Makrophagen mit Myelin (24 Stunden), und für positive Kontrolle mit Valinomycin (2 Stunden), Ceramid (24 Stunden) und Wasserstoffperoxid (24 Stunden). Valinomycin führt zur vollständigen Depolarisation der mitochondrialen Membran durch den Einstrom von Kalium-Ionen in die mitochondriale Matrix (Morrison et al. 2005). Die Werte von Valinomycin-behandelten Zellkulturen wurden somit durch Subtraktion als Nullpunkt der Messung gesetzt.

Die Änderung des $\Delta \Psi$ in der Abb. 33 repräsentiert den Quotienten aus intakten und defekten Mitochondrien. Dieser wurde als relative mittlere Fluoreszenzrate des JC-1-Polymers und des Monomers gemessen:

$$\Delta \Psi = \frac{\text{intakte Mitochondrien}}{\text{defekte Mitochondrien}} = \frac{\text{JC} - 1 \text{ Polymer (rot)}}{\text{JC} - 1 \text{ Monomer (grün)}} = \frac{\text{rel. mFR (590nm)}}{\text{rel. mFR (535nm)}}$$

Phagozytose von Myelin führt in niedrigen Konzentrationen (5 μ g/ml) zur mäßigen Erhöhung des Gesamt- $\Delta \Psi$.

Anders bei höheren Myelinkonzentrationen, wo das Gesamt- $\Delta \Psi$ der Zellkultur abfällt. Ceramid führt ebenfalls zum Abfall des Gesamt- $\Delta \Psi$, jedoch deutlich weniger im Vergleich zu den Myelinbehandelten Makrophagen. Wasserstoffperoxid wurde nur in niedrigen Konzentrationen zugegeben. Mit 100µM H₂O₂ kommt es zu keiner Änderung gegenüber den unbehandelten (0 μ g/ml) Makrophagen. Mit 200 μ M H₂O₂ zeigt sich eine mäßige Steigerung des Gesamt- $\Delta \Psi$, ähnlich wie bei Myelin-behandelten Makrophagen in niedriger Konzentration.



Abb. 33

Änderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta \Psi$) in Makrophagen

(Alle Messungen wurden unabhängig voneinander mindestens 3-mal durchgeführt. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA; mFR-mittlere Fluoreszenzrate, SF-Standardfehler).

Die Aufnahmen in der Tabelle 3 spiegeln qualitativ die Ergebnisse der vorherigen (quantitativen) JC-1-Signal-Messung wieder. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind Überlagerungen aus den Filteraufnahmen bei 590nm (rot) und 535nm (grün).

Die meisten unbehandelten Makrophagen zeigen ein eindeutiges rotes Signal, das sich gegenüber dem grünen Hintergrund abhebt. Mit steigender Myelinkonzentration verlieren sich die roten Signale aus den Zellen, was auf eine Störung des mitochondrialen Membranpotentials hindeutet. Bei 100μ g/ml sieht man vorwiegend grünes Signal. Zusätzlich kann man erneut die Veränderung der Zellmorphologie mit steigender Myelinkonzentration beobachten. Bei 50 und 100μ g/ml Myelin sind die Zellen rund und balloniert (Schaumzellen).

Valinomycin führt sowohl bei 55 μ g/ml als auch bei 200 μ g/ml in allen Zellen zum vollständigen Zusammenbruch des $\Delta\Psi$. Es ist kein rotes Signal vorhanden.

Mit Ceramid behandelte Zellen liefern nur leichte Abschwächung im roten Signal. Wasserstoffperoxid wurde in niedrigen Konzentrationen (100 und 200 μ M) den Zellen zugegeben. Hier steigt das rote Signal proportional zur verwendeten H₂O₂ Konzentration an.

Ergebnisse



3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Durch unsere Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Myelinpartikel vom murinen ZNS *in vitro* von Makrophagen und Mikroglia suffizient phagozytiert werden. Dafür ist keine Opsonisierung des Myelins notwendig. Wir konnten zeigen, dass internalisiertes Myelin in Phagolysosomen vorliegt, wo es aktiv verdaut wird und die lipophilen Spaltprodukte in Form von Lipidtröpfchen intrazellulär abgelagert werden. In der Lichtmikroskopie imponieren dadurch die Phagozyten als sog. Schaumzellen.

Die Myelinphagozytose führte in IFN γ -aktivierten Mikroglia zu einer anfänglich (< 6 Stunden) erhöhten und später (6-24) zu einer signifikant erniedrigten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine – TNF α und IP-10. Eine zusätzliche Aktivierung der Mikroglia mit LPS (+IFN γ) verdeutlichte den supprimierenden Effekt der Phagozytose von Myelin.

Eine Überprüfung der Vitalitätsparameter nach der Myelinphagozytose zeigte bei Mikroglia eine mehrfach erhöhte Zellvitalität, die proportional zur Myelinkonzentration anstieg. Die Zytotoxizitätsparameter waren nicht erhöht. In Makrophagen wurde proportional zu der steigenden Myelinkonzentration eine gesteigerte Caspasenaktivität (Caspasen 3 und 7) gemessen, die auf den programmierten Zelltod der Makrophagen nach der Myelinphagozytose hinweist. Ein von der Myelinkonzentration abhängiger Verlust des Membranpotentials an der inneren Mitochondrienmembran bekräftigt die mittels Caspasen gemessene Apoptoseaktivität.

4 DISKUSSION

Die Zerstörung der periaxonalen Myelinscheiden im ZNS ist das Hauptcharakteristikum der Multiplen Sklerose. Fokale demyelinisierte Plaques bilden das makroskopische und radiologische Korrelat, wobei sie zeitlich und örtlich disseminiert sind. Aktive Läsionen können narbig ausheilen, chronifizieren oder an einem anderen Fokus neu entstehen. Chronisch aktive Läsionen sind in der Regel scharf begrenzt und eine ungehinderte Ausbreitung *per continuitatem* erfolgt praktisch nicht (Frohman et al. 2006). Dies weist darauf hin, dass der inflammatorische Prozess limitiert ist und eingedämmt werden kann. Der wiederholte Ausbruch und Eindämmung der inflammatorischen Aktivität imponieren klinisch als schubförmig verlaufende MS.

Die wichtigsten Effektorzellen, die zerstörtes oder pathologisch verändertes Myelin aus dem ZNS entfernen, sind residente Mikroglia und die eingewanderten Monozyten. Eine Differenzierung der residenten Mikroglia in Makrophagen ist bekannt (Li et al. 1996). In aktiven MS-Läsionen übersteigt die Anzahl der eingewanderten mononukleären Phagozyten die anderen Immunzellen um den Faktor 10 bis 20 (Barnett et al. 2006). Das unterstreicht die Wichtigkeit der mononukleären Phagozyten im Rahmen der MS. Heutzutage wird allgemein angenommen, dass rekrutierte Makrophagen und Mikrogila zu der Entzündung beitragen und diese potenzieren (Benveniste 1997; Mosley und Cuzner 1996; Probert et al. 1995; Raivich und Banati 2004; Selmaj und Raine 1988; Selmaj et al. 1991; Sospedra und Martin 2005; van der Laan et al. 1996; Williams et al. 1994).

Auf der anderen Seite, deuten die zeitlichen Remissionen der MS-Läsionen und der selbstlimitierende Charakter der schubförmigen MS, mit einem partiellen Rückgang des Behinderungsgrades bei den Patienten, auf lokale Suppressionsmechanismen der destruktiven Inflammation und auf eine Gewebsheilung hin.

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass die Makrophagen und Mikroglia im Zusammenhang mit der Phagozytose von Myelin, gerade das inflammatorisch-suppressive Verhalten repräsentieren und langfristig nicht proinflammatorisch aktiviert werden.

Über dieses Verhalten der Makrophagen und Mikroglia wurde im Rahmen der MS in der bisherigen Literatur nur sehr unsicher und lückenhaft berichtet. Nur Boven et al. und Liu et al. aus unserer Arbeitsgruppe brachten konkrete Hinweise zu diesem Thema (Boven et al. 2006; Liu et al. 2006).

4.1 MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA PHAGOZYTIEREN MYELIN IN VITRO

Die Phagozytose von Myelin *in vitro* durch Makrophagen und Mikroglia wurde bereits von vielen Autoren beschrieben (Goldenberg et al. 1989; Mosley und Cuzner 1996; Smith 1993; Sommer et al. 1992; Vallieres et al. 2006). Einige Autoren berichten aber, dass das isolierte Myelin von den Zellen insuffizient internalisiert wird und vornehmlich an der Zelloberfläche haftet (Trotter et al. 1986). Nur durch zusätzliche Behandlung des Myelins, mittels Opsonisierung mit Komplementfaktoren (C3b), soll eine suffiziente Phagozytose *in vitro* möglich sein (Mosley und Cuzner 1996; Trotter et al. 1986).

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass sowohl Makrophagen, als auch Mikroglia suffizient unbehandeltes, nicht-opsonisiertes Myelin phagozytieren können. Dazu haben wir Mikroglia mit Fluorophor-markiertem Myelin über unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert. Myelinpartikel wurden bereits 1 Stunde nach der Myelinzugabe in Mikrogliazellen in der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Eine Inkubation über 6 Stunden lieferte den Maximalwert. Überraschend zeigten die über 24 Stunden mit Myelin behandelten Zellen ein niedriges Fluoreszenzsignal. Zu erwarten wäre ein kontinuierlicher Anstieg des Myelingehalts. Wir glauben, dass dieses Phänomen ein Artefakt darstellt. Die Abschwächung des Signals kommt bei langer Inkubationszeit wahrscheinlich durch die Degeneration des Fluorophors in den Lysosomen zustande.

Auch Mosley und Cuzner haben den zeitlichen Verlauf der Myelinphagozytose untersucht und erhielten sehr ähnliche Ergebnisse. Die Autoren haben das Myelin radioaktiv markiert und ausgewertet, so dass lysosomaler Abbau keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Sie haben einen kontinuierlichen Anstieg des Myelingehalts über die Zeit beobachtet (Mosley und Cuzner 1996).

Wie unsere elektron- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten, wurde das ingestierte Myelin in (Phago-)Lysosomen aktiv abgebaut und die Lipidspaltprodukte in Form von Lipidtröpfchen in den Zellen deponiert. Bei Verwendung höherer Myelinkonzentrationen (50, 100 μ g/ml) imponierten die Makrophagen in der Lichtmikroskopie als sog. Schaumzellen. Boven et al. berichtet auch über morphologische Veränderungen von Makrophagen und Mikroglia nach der Myelinphagozytose im Sinne der Bildung von Schaumzellen und zeigt, dass die Lipidablagerungen, als Folge des Myelinabbaus, wichtige immunregulatorische Eigenschaften aufweisen (Boven et al. 2006).

4.2 MYELINPHAGOZYTOSE BEEINFLUSST DIE ZYTOKINSEKRETION IN PHAGOZYTEN

In unserer *in-vitro*-Versuchsanordnung konnten wir zeigen, dass die Myelinphagozytose einen Einfluss auf die inflammatorische Aktivität von Mikroglia hat. Dazu inkubierten wir IFN γ -aktivierte primäre Mikroglia mit 10 μ g/ml Myelin über unterschiedlich lange Zeitintervalle (0, 1, 3, 6, 24, 48h).

Die initiale Phase (=die ersten Stunden nach Myelinzugabe, < 6h) zeichnete sich durch eine erhöhte Ausschüttung proinflammtorischer Zytokine aus. Mehrere Autoren haben bereits davon berichtet, dass die Myelinphagozytose durch Makrophagen und Mikroglia mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einhergeht (Mosley und Cuzner 1996; van der Laan et al. 1996; Williams et al. 1994). Diese Autoren berichteten jedoch von einem langanhaltenden Effekt, wo die erhöhte Zytokinsekretion auch nach 18-24 Stunden, nach der Zugabe von Myelin, gemessen werden konnte. Unsere Ergebnisse deuten eher auf eine "Sofortreaktion" hin. Die erhöhte Ausschüttung von dem Zytokin TNF α und dem Chemokin IP-10 erfolgte nur in den ersten Stunden (1-3h). Diese Zeit ist zu kurz für eine *de-novo*-Proteinsynthese. Es wäre denkbar, dass es sich hierbei um eine frühe physiologische "Hilferufaktion" handelt, die zum Ziel eine Rekrutierung weiterer Immunzellen hätte. Das erhöhte IP-10 ist ein potentes Chemokin, welches auch die Makrophagen und die T-Lymphozyten anlocken kann (Taub et al. 1993).

Abweichend zu den Autoren, die eine lang-anhaltende proinflammatorische Auswirkung der Myelinphagozytose beschrieben haben, konnten wir zeigen, dass die Myelinphagozytose in der späten Phase (24-48h) zu einer starken Unterdrückung der inflammatorischen Aktivierung von



Abb. 34

Schematische Darstellung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia nach Myelinzugabe basierend auf unseren Ergebnissen im Vergleich zu Beobachtungen anderer Autoren. Mikroglia führte. Dieses Ergebnis demonstrierten wir anhand der herunterregulierten Sekretion der bereits erwähnten proinflammatorischen Zytokinen.

Ähnliche Ergebnisse erzielte Boven et al. (Boven et al. 2006), der über anti-inflammatorische Effekte von Myelin-beladenen Makrophagen berichtete. Auch FADOK et al. zeigte, dass Makrophagen, welche apoptotische Zellen oder Zellfragmente phagozytiert haben, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine über autokrine/parakrine Mechanismen inhibieren können (Fadok et al. 1998).

Der in dieser Arbeit dargestellte zeitliche Verlauf der Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach der Myelinphagozytose, könnte eine Erklärung liefern, warum in der Literatur teilweise entgegengesetzte Ergebnisse präsentiert werden. Die Abb. 34 verdeutlicht schematisch diesen Sachverhalt.

Zusätzlich zu dem zeitlichen Verlauf des Zytokinprofils konnten wir zeigen, inwieweit in der späten Phase die Ausprägung der Zytokinsuppression mit der zugegebenen Myelinkonzentration korreliert. Dabei stellte sich heraus, dass die Steigerung der Myelinkonzentration auch die Steigerung der suppressiven Wirkung nach sich zog.

Dazu haben wir prä-aktivierte (mit IFN γ oder IFN γ +LPS) Mikrogliazellkulturen über 24 Stunden mit unterschiedlichen Myelinkonzentrationen (0, 10, 50, 100 µg/ml) behandelt. Bei hohen Myelinkonzentrationen (50 und 100 µg/ml) und einer kombinierten prä-Aktivierung mit IFN γ und LPS war der suppressive Effekt am deutlichsten. Dabei fungierte LPS als zusätzlicher Aktivator, der den nativen Zytokinhintergrund anhob und somit der Myelineffekt noch deutlicher war.

Es ist anzunehmen, dass je mehr Myelin den Zellen zugegeben wird, umso mehr Myelin wird phagozytiert. Dies spiegeln auch die morphologischen Änderungen in der Lichtmikroskopie bei hohen Myelinkonzentrationen wieder. Zusätzlich demonstrierten van der Laan et al. und Mosley und Cuzner diesen Sachverhalt in ähnlichen Myelindosis-versus-Myelinaufnahme-Untersuchungen (Mosley und Cuzner 1996; van der Laan et al. 1996). Kritisch kann man hier die Frage stellen, inwieweit die Steigerung der Myelinkonzentration *in vitro* der tatsächlich vorkommenden Myelinkonzentration *in vivo* entspricht?

Die Tatsache, dass die Sekretion proinflammatorischer Zytokine von der zugegebenen Myelinkonzentration auch quantitativ abhängt, bekräftigt die Aussage, dass diese beiden Prozesse miteinander gekoppelt sind.

Ob diese Kopplung unmittelbar direkt oder über andere bzw. "dritte" Mechanismen erfolgt, möchten wir im nächsten Abschnitt diskutieren.

4.3 MECHANISMEN DER IMMUNSUPPRESSIVEN WIRKUNG VON MYELIN

4.3.1 ROS UND OXIDATIVER STRESS

Ein Teil unserer Arbeitsgruppe forschte nach möglichen zellulären Mechanismen, die relevant für die suppressive Wirkung der Myelinphagozytose sein könnten. Eine wichtige Bedeutung wurde dem oxidativen Stress in der Zelle zugeschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass die Produktion von sog. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS⁽²⁾), durch die NADPH-abhängige Oxidase⁽³⁾, auch mit der Suppression proinflammatorischer Zytokine korreliert. Eine Blockierung der NADPH-abhängigen Oxidase, oder Ausschaltung des Genlocus für ihre Untereinheit p47-PHOX in knock-out Mäusen, führte zur Aufhebung der inflammatorischsuppressiven Wirkung der Myelinphagozytose *in vitro* (Liu et al. 2006). Van der Goes et al. und Williams et al. haben ebenfalls über die Produktion von ROS nach Myelinphagozytose im Rahmen der MS oder der tierexperimentellen EAE berichtet (van der Goes et al. 1998; Williams et al. 1994). Van der Goes et al. haben beschrieben, dass die ROS Produktion von essentieller Bedeutung für die Phagozytose von Myelin ist. Eine Blockierung der ROS Produktion blockiert auch die Myelinphagozytose (van der Goes et al. 1998).

Basierend auf diesen Ergebnissen, scheint der oxidative Stress und die ROS Produktion im Rahmen der Myelinphagozytose eine regulatorische Funktion auf die Zytokinsekretion auszuüben oder diesen suppressiven Effekt sogar zu vermitteln. Somit könnte der vorher erwähnte Kopplungsmechanismus zwischen der Myelinphagozytose und Sekretion proinflammatorischer Zytokine über die Produkte des oxidativen Stresses verschaltet sein.

Es ist bekannt, dass die immunologische Antwort und Reaktion auf den oxidativen Stress keinesfalls einheitlich ist. So unterscheidet Forman und Torres den "guten" (=niedrige oxidative Last) vom "schlechten" (=hohe oxidative Last) oxidativen Stress. Wo der "gute" oxidative Stress mit Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren und Regeneration assoziiert ist, wirkt der "schlechte" oxidativer Stress zerstörend und letal auf die Immunzellen und die Umgebung.

⁽²⁾ "Zu den **ROS** gehören freie Radikale, wie das Hyperoxid-Anion (alte Bezeichnung: Superoxid-Anion) $O_2 \bullet^-$, das hochreaktive Hydroxyl-Radikal OH \bullet , das Peroxylradikal LO \bullet und das Alkoxylradikal LO \bullet von Lipiden, stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid H₂O₂, Lipidhydroperoxid LOOH, Ozon O₃ und die hypochlorige Säure OCl⁻, sowie angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff ¹O₂)." (Wikipedia 2007 a)

⁽³⁾ **NADPH-abhängige Oxidase** = Phagozytenoxidase = PHOX. Dieser Enzymkomplex katalysiert die Bildung von hoch-reaktiven Superoxid-Anionen durch einen Elektronentransfer von NADPH auf den molekularen Sauerstoff. Der Elektronentransfer erfolgt transmembran, so dass Superoxide in die Phagosome oder aus der Zelle ausgeschüttet werden können. Die Phagozytenoxidase besteht aus 6 Untereinheiten, wobei die p47-PHOX Einheit unmittelbar an der Bildung von Superoxiden beteiligt ist. (Wikipedia 2007 b)

Oxidativer Stress übt also in diesem Zusammenhang eine wichtige regulatorische Funktion auf die Bestandteile des Immunsystems und auf die Art der immunologischen Antwort aus. Die Beeinträchtigung des Equilibriums zwischen Produktion und Abbau von ROS könnte somit auch im Rahmen der Myelinphagozytose zur pathologischen (De-)Aktivierung von Immunzellen führen.

4.3.2 DEAKTIVIERUNG VON MAKROPHAGEN

Eine andere, bessergesagt eine zusätzliche, Erklärung für die inflammatorisch-suppressive Wirkung von Myelin könnte ein "Switch" in der Aktivierung von Makrophagen darstellen – sog. alternative oder angeborene/erworbene Deaktivierung. Gordon fasste 2003 die möglichen De-Aktivierungswege von mononukleären Phagozyten zusammen (Gordon 2003). Die Deaktivierung von Makrophagen kann durch interne (angeborene) oder externe (erworbene) kommen. Übersicht Signaltransduktionen zustande Eine über die möglichen "Deaktivierungswege" veranschaulicht die Abb. 35. Die Folge ist eine Immunsuppression mit Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen und Downregulation von MHC Klasse II Rezeptoren.



Abb. 35

Angeborene und erworbene Deaktivierung von Makrophagen

Die Deaktivierung kann einen angeborenen oder erworbenen Ursprung haben. Die angeborene Deaktivierung ist Antigen-unspezifisch und unabhängig von T-Lymphozyten. Auch die Ingestion vom apoptotischen Zellmaterial oder Pathogenen kann eine Deaktivierung von Makrophagen auf diesem Wege einleiten. Dabei spielen die *Scavenger Rezeptoren* eine wichtige Rolle. Aber auch eine Ablagerung von Lipidspaltprodukten, wie bei der Phagozytose von Myelin, kann eine Deaktivierung auslösen. Abbildung übernommen von Gordon (2003).

Basierend auf den Aspekten, die Gordon zusammengefasst hat, könnte die Phagozytose von Myelin auf mehreren Wegen die Makrophagen und Mikroglia deaktivieren.

4.3.2.1 Rolle der Lipide

In Makrophagen, die Myelin phagozytiert haben, haben wir Lipidablagerungen in Form von Lipidtröpfchen in der Elektronenmikroskopie gefunden. Gordon berichtet, dass Ablagerungen von Lipidspaltprodukten, z.B. von Galaktocerebrosiden, eine Immunsuppression in Makrophagen hervorrufen können. Letztendlich besteht Myelin zu 70% aus Lipiden, wovon 22% Galaktocerebroside sind.

In der Lichtmikroskopie imponierten die Myelin-beladenen Makrophagen als sog. Schaumzellen. Interessanterweise wurde viel über den inflammatorisch-regulatorischen Charakter von Schaumzellen⁽⁴⁾, so wie sie morphologisch auch bei der MS durch die Ingestion von Myelin vorkommen (Boven et al. 2006), im Rahmen der Atherosklerose berichtet (Greaves und Gordon 2005; Harris et al. 2002; Joseph et al. 2004; Joseph et al. 2003; Lawrence et al. 2002; Pettus et al. 2002). Diese regulatorische Fähigkeit ist auch bei diesen Schaumzellen mit Lipidspaltprodukten, und mit den am Lipidstoffwechsel beteiligten Molekülen assoziiert. Es wurde gezeigt, dass Lipidbeladene Makrophagen anti-inflammatorischen Charakter aufweisen (Lawrence et al. 2002), und dass diese die TNF α -induzierte TNF α -Sekretion inhibieren und die Sekretion des typisch anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 steigern (Ares et al. 2002; Lo et al. 1999; Varadhachary et al. 2001) . In Anbetracht dessen, könnte es gewisse Parallelen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose und der Atherosklerose, sowie der immunregulatorischen Potenz der Lipide bzw. am Lipidstoffwechsel beteiligten Molekülen geben. Eine zunehmende Orientierung der MS-Forschung auf die Lipidebene und eine Abkoppelung von der strikten Proteinforschung könnte zu neuen Erkenntnissen in der Pathophysiologie beider Erkrankungen führen.

4.3.2.2 Scavenger-Rezeptoren

Auch eine Phagozytose von Zelltrümmern über den *Scavenger-Rezeptor*, soll nach Gordon an der Deaktivierung von Makrophagen beteiligt sein. Wie wir bereits erwähnten, ist der *Scavenger-Rezeptor* einer der wichtigsten Kandidaten, die sich an der Myelinphagozytose beteiligen könnten (Mosley und Cuzner 1996; Smith 2001).

4.3.2.3 Veränderung im Zytokinprofil der Umgebung

Stout et al. berichtete 2005 ebenfalls über eine alternative Aktivierung von Makrophagen, die hauptsächlich als eine Anpassungsreaktion an die veränderte Umgebung zu verstehen sind. Insbesondere handelt es sich um Veränderungen im Zytokinprofil. Unsere Untersuchungen zeigten, dass sich das Zytokinprofil Myelin-behandelter Mikrogliazellkulturen durch erniedrigte proinflammatorische Zytokine auszeichnet.

⁽⁴⁾ **Schaumzellen** sind mit Lipiden überladene Makrophagen. Dieser Begriff bezieht sich aber häufiger auf in atherosklerotischen Plaques befindliche Makrophagen, die die *low density lipoproteins* LDLs mittels Endozytose im Zellinneren akkumulieren. Nach dem Passieren der endothelialen Barriere wird das LDL durch reaktive Sauerstoff-Spezies (s.u.) oxidiert (Wikipedia 2007 c).

4.3.2.4 In-vivo-Studien

Boven et al. identifizierte, im *post-mortem*-Nervengewebe von MS-Patienten durch Immunohistochemie von intrazellulären und oberflächlichen Markern sog. M2 Schaumzellen, die den alternativ (de-)aktivierten Makrophagen entsprechen (Boven et al. 2006).

Die Beobachtungen von Stout et al., Boven et al. und Gordon zusammen mit unseren Ergebnissen verstärken die Hypothese, dass die Myelinphagozytose zu einer alternativen und immunsuppressiven (De-)Aktivierung von mononukleären Phagozyten führen kann.

4.4 MYELINPHAGOZYTOSE VERÄNDERT DIE VITALITÄSPARAMETER VON MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA

4.4.1 "Scheinbare Vitalität"

Wie bereits erwähnt, berichtete Liu et al. aus unserer Arbeitsgruppe über die Induktion von oxidativem Stress und ROS in Mikroglia nach der Myelinphagozytose, wobei dieser Prozess möglicherweise als negative Rückkopplung für die Inflammation fungiert (Liu et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde über veränderte Vitalitätsparameter der Mikrogliazellkulturen berichtet. Nach der Myelinphagozytose zeigten Mikroglia eine "höhere Vitalität" (250%) als die unbehandelten Zellen (100%). Diese "scheinbare Vitalität" stieg mit der zugegebenen Myelinkonzentration an. "Scheinbar" nennen wir die Vitalität deswegen, weil wir überzeugt sind, dass es sich bei diesem Ergebnis um einen Artefakt handelt.

Die Reduktion von Tetrazolium in dem MTT-Vitalitätsassay ist NADPH abhängig und wird teilweise durch mitochondriale Enzyme der Atmungskette (Marshall et al. 1995; Pereira et al. 1998; Satoh et al. 1996) aber auch durch nicht-mitochondriale, zytoplasmatische und membranständige Enzyme (Bernas und Dobrucki 2000; Berridge und Tan 1993; Goodwin et al. 1996; Green und Pratt 1990; Nisimoto und Otsuka-Murakami 1990) katalysiert. Die NADPH-abhängige Oxidase, die hauptsächlich an der Oxidation von molekularem Sauerstoff zu ROS beteiligt ist, benutzt ebenfalls NADPH als Elektronentransporter. Es ist möglich, dass die NADPH-abhängige Oxidase, die beim oxidativen Stress bereits stark aktiviert ist, sich zugleich an der Reduktion von MTT beteiligt.

Ein zusätzliches Argument, dass die vermehrte MTT Reduktion nicht durch die Enzyme der Atmungskette zustande kommt, liefert die Messung des $\Delta\Psi$. Hier haben wir gezeigt, dass mit zunehmender Myelinkonzentration die Anzahl intakter Mitochondrien, und somit die Menge funktionsfähiger Enzyme der Atmungskette, abnimmt. Da aber sowohl die MTT-Reduktion als auch die ROS Produktion erhöht ist, spricht dieses Ergebnis für eine Reduktion durch nichtmitochondriale Enzyme wie z.B. die NADP-Oxidase. Dementsprechend sollte die vermehrte MTT-Reduktion in diesem Fall nicht fälschlicherweise als Vitalitätsassay interpretiert bleiben, sondern als ein zusätzlicher Indikator für die verstärkte ROS Produktion angesehen werden.

Ähnliche Ergebnisse erzielte Lee, H. C. et al., der durch Verwendung von H₂O₂ einen zellulären oxidativen Stress provozierte und dabei erhöhte Reduktion von MTT beobachtete (Lee, H. C. et al. 2000). Er beschreibt auch eine Zunahme der Mitochondrienanzahl. Unsere Messungen zeigten eine Erhöhung des Gesamt- $\Delta \Psi$ bei H₂O₂ behandelten Makrophagen, was höchstwahrscheinlich auch mit der Erhöhung der Mitochondrienanzahl einhergeht. Hier würden unsere Ergebnisse mit denen von Lee, H. C. et al. übereinstimmen. Bei Myelin-behandelten Makrophagen haben wir aber eine Reduktion des $\Delta \Psi$ beobachtet, und zwar umgekehrt proportional zur verwendeten Myelinkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass es sich entweder um einen anderen Mechanismus der ROS Produktion als bei der Inkubation mit H₂O₂ handelt, oder um so eine starke "oxidative" Auswirkung von ROS, dass die Zellen absterben.

4.4.2 Phagozytose von Myelin kann Apoptose induzieren

Die Hypothese, dass die Myelinphagozytose in Makrophagen und Mikroglia den programmierten Zelltod auslösen kann, demonstrieren unsere Ergebnisse der Messung von Effektorcaspasen 3 und 7. Diese Effektorcaspasen, wie auch schon der Name sagt, vermitteln die Apoptoseeinleitung durch unterschiedliche Auswirkungen (Aktivierung sekundärer Zielproteine, Abbau von Laminin und Aktin, Unterdrückung der DNA-Reparatur) und stehen am Ende der Induktionskaskade. Auch hier scheinen hohe Myelindosen stärkeren Effekt auf die Apoptoseinduktion zu zeigen.

Liu et al. zeigte, dass die verstärkte ROS Produktion ebenfalls von der Myelinkonzentration abhängt (Liu et al. 2006). Man könnte spekulieren, dass die Apoptoseinduktion in Makrophagen mit der verstärkten ROS Produktion und dem oxidativen Stress zusammenhängt. Es ist bekannt, dass oxidativer Stress und ROS in vielen Zellarten die Apoptose auslösen können (Simon et al. 2000). Diese und andere Auswirkungen hängen von der Quantität der "oxidativen Last" ab. Die Abb. 36 von Forman und Torres verdeutlicht diese Zusammenhänge (Forman und Torres



Abb. 36

Biologische Antwort und Auswirkung von oxidativen Stress abhängig von der Menge der oxidativen Last Abbildung übernommen von Forman und Torres (2001). 2001).

Die Abb. 36 veranschaulicht präzise die Tatsache, dass die Übergänge zwischen den vielen möglichen Reaktionsarten sehr fließend sind. Dabei ist anzumerken, dass durch diese biologische Reaktionsvielfalt auch vielfältige, und phänotypisch teilweise entgegengesetzte, Antworten und Verhaltensweisen von Seiten des Immunsystems folgen (Apoptose [proinflammatorische Zytokine \downarrow] versus Nekrose [proinflammatorische Zytokine \uparrow]). Im Rahmen der MS-Pathologie könnte diese Betrachtungsweise mögliche Erklärungen zu der Heterogenität und/oder der klinischen Verlaufsform dieser Erkrankung liefern.

Auch diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der Messung von Gesamt- $\Delta \Psi$ in Makrophagenzellkulturen unterstützt. Hier ließ eine Behandlung mit 50 und 100µg/ml Myelin nahezu keine vitalen Mitochondrien mehr erkennen, ohne die auch keine effiziente Energieproduktion mehr möglich ist. Der Zusammenbruch des Gesamt- $\Delta \Psi$ ist einer der ersten Zeichen der Apoptoseinduktion in der Zelle (Castedo et al. 1995; Cossarizza et al. 1995; Petit et al. 1995; Zamzami et al. 1995; Zamzami et al. 1996).

Auch Kuhlmann et al. berichteten 2001, dass Makrophagen nach der Phagozytose von PNS-Myelin durch Apoptose absterben (Kuhlmann et al. 2001). In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass auch Myelin vom zentralen Nervensystem (ZNS) Apoptose in den Makrophagen induzieren kann, wobei die Menge der oxidativen Last die Wirkung bestimmt. Nach unserer Kenntnis sind wir die erste Arbeitsgruppe, die bis *dato* die Apoptoseinduktion in Makrophagen im direkten Zusammenhang mit der Phagozytose von ZNS-Myelin beschrieben hatte.

Unterstützend zu diesen Beobachtungen, zeigten Nguyen, K. B. et al. mittels Licht- und Elektronenmikroskopie im ZNS von Lewis Ratten, die an EAE oder an einer chronisch schubförmigen EAE litten, apoptotisch veränderte mononukleäre Phagozyten (Nguyen, K. B. et al. 1994). Die apoptotischen Phagozyten enthielten internalisierte Myelinbruchstücke und wurden in Meningen, perivaskulären Räumen und im Parenchym der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks gefunden.

Nach der Induktion der Apoptose in der Zelle konzentriert bzw. zentralisiert sich der gesamte Zellstoffwechsel auf die Durchführung der Apoptose und den Untergang der Zelle. Die ursprüngliche Zellfunktion gerät in den Hintergrund. Es ist möglich, dass die von uns beschriebene Apoptoseinduktion nach der Myelinphagozytose mit der Suppression der proinflammatorischen Zytokine korreliert. Es ist bekannt, dass Immunzellen, die in ihrer Funktion beeinträchtigt sind oder deren Funktion nicht mehr gebraucht wird, still durch Apoptose absterben. In diesem Fall ist es aber eine spezielle Situation, da normalerweise die apoptotischen Zellen von Makrophagen beseitigt werden. Hier sterben Makrophagen selbst
durch Apoptose. Die restlichen Makrophagen beseitigen außer Myelin auch die Zelltrümmer anderer Makrophagen, werden ggf. dadurch auch überladen und es resultiert möglicherweise ein *circulus vitiosus* mit Eindämmung der immunologischen Antwort. Hier stellt sich die Frage, was passiert, wenn die Steuermechanismen und die Apoptoseinduktion pathologisch dysreguliert werden? Kommt es zu einer unkontrollierten und chronischen Entzündung? Es ist bekannt, dass fehlende Apoptoseinduktion autoimmune Erkrankungen wie den Systemischen Lupus Erythrematodes oder die rheumatoide Arthritis begünstigen kann. Ob die Dysregulation der Apoptose auch im Verlauf der MS zur Pathogenese beiträgt, ist fraglich aber nicht unmöglich.

4.5 MEINUNGSWANDEL ZU DER ROLLE VON MAKROPHAGEN UND MIKROGLIA IM RAHMEN DER MS?

Die in dieser Arbeit beschriebenen Auswirkungen der Myelinphagozytose sind umfangreich, zeigen aber eine gemeinsame Tendenz. Die Phagozytose von Myelin scheint langfristig in den mononukleären Phagozyten nicht zu einer Auslösung, Unterhaltung oder gar Verstärkung der inflammatorischen Antwort zu führen, sondern umgekehrt einen anti-inflammatorischen Effekt durch eine supprimierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine zu entfalten.

Übertragen auf die MS könnte somit die Rolle der Makrophagen und Mikroglia missverstanden gewesen sein. In den letzten Publikationen zu diesem Thema ist ein Wandel der Meinung zu der Rolle und der (Patho-)Physiologie dieser Zellen zu spüren. Bereits 1998 hatten Diemel et al. in "Macrophages in CNS remyelination: friend or foe?" diese Frage klar aufgestellt. Er beschreibt, dass Makrophagen und Mikroglia für die Remyelinisierung der Axone und die Regeneration des neuronalen Gewebes nach einer Schädigung von essentieller Bedeutung sind. Mäuse, bei denen Makrophagen selektiv zerstört wurden, zeigten verzögerte Heilung und minimale Remyelinisierung nach einer Verletzung des neuronalen Parenchyms. 2006 fassten Barnett et al. in "The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion" zusammen, die wichtigsten Ergebnisse welche die hauptsächlich proinflammatorischen Zellen im neuen Licht erscheinen lassen (Barnett et al. 2006). Unter anderem präsentiert sie die Hypothese, das die Pathophysiologie der MS primär mit einer Schädigung des Myelins oder der Oligodendrozyten selbst anfängt und erst sekundär mit der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia einhergeht, wobei diese Zellen dabei eher einen neurotrophen und regenerativen, als einen destruktiv-inflammatorischen Charakter aufweisen.

4.6 Epilog

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass die Phagozytose von Myelin zu einer supprimierten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF α und IP-10) und Induktion vom programmierten Zelltod in mononukleären Phagozyten führen kann. Wir diskutierten die möglichen Wirkmechanismen (oxidativer Stress und alternative (De-)Aktivierung), die im Hintergrund an den präsentierten Effekten der Myelinphagozytose beteiligt sein könnten. Es handelt sich jedoch um wenige und nur ausgewählte Aspekte aus der Pathophysiologie der MS.

Wie die Konstellation dieser einzelnen Komponenten zueinander ist? Welche Abfolge dieser Prozesse ist die richtige? Und inwieweit spielen diese Komponenten eine Rolle bei der Myelinphagozytose *in vivo* und im Rahmen der MS? Die Beantwortung dieser Fragen und Erforschung dieser komplexen Zusammenhänge (Abb. 37) könnte zu neuen therapeutischen Strategien einer der häufigsten neurodegenerativen Erkrankung des jungen Erwachsenalters – der Multiplen Sklerose – führen.



Abb. 37

Komplexe Zusammenhänge der in dieser Arbeit angesprochenen Prozesse.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, die im jungen und mittleren Alter zur Behinderung führt und erweckt dadurch schon seit längerem das medizinische Forschungsinteresse. Die Zerstörung der periaxonalen Myelinscheiden im ZNS ist das Hauptcharakteristikum der MS-Pathophysiologie. Die Entzündungsherde werden durch zahlreiche Makrophagen und residente Mikroglia infiltriert, die als Exekutoren der Myelinphagozytose und somit der MS-Pathologie fungieren. Ob die Rolle der mononukleären Phagozyten in der Potenzierung oder in der Eindämmung der neuroinflammatorischen Prozesse beruht, wird kontrovers diskutiert: Freund oder Feind?

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Myelinphagozytose durch Makrophagen und Mikroglia in vitro und deren Auswirkung auf die inflammatorische Aktivität und die Vitalität dieser Effektorzellen. Mit unseren Ergebnissen möchten wir zur Klärung der kontrovers diskutierten Rolle dieser Schlüsselzellen im Rahmen der MS-Pathologie beitragen.

In einem *in-vitro*-Modell inkubierten wir Peritonealmakrophagen und primäre Mikroglia mit Myelinfragmenten aus dem murinen Zentralen Nervensystem. Wir konnten zeigen, dass Myelinpartikel von Makrophagen und Mikroglia suffizient phagozytiert und in Phagolysosomen aktiv abgebaut werden. Die Myelinaufnahme in die Zellen erfolgt proportional zur Inkubationszeit und erreicht das Maximum nach 6 Stunden. Die mononukleären Phagozyten ändern dabei ihre Morphologie zu Schaumzellen.

Die Untersuchungen der inflammatorischen Aktivität von Mikroglia fokussierten wir auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine TNF α und IP-10. Mikrogliazellkulturen wurden mit IFN γ prä-aktiviert. Eine Inkubation mit Myelin in Zeiträumen bis zu 48 Stunden ergab eine passagere Erhöhung der Zytokinsekretion in der frühen Phase (bis 6h) und nachfolgend eine kontinuierliche Suppression der Zytokinfreisetzung (6-48h). Eine prä-Aktivierung der Zellkulturen mit LPS und IFN γ verdeutlichte die suppressive Wirkung der Myelinphagozytose auf die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IP-10.

Die Auswirkungen der Myelinphagozytose auf die Zellvitalität konnten wir durch Indikatoren des nekrotischen und apoptotischen Zelluntergangs erfassen. In dem MTT-Proliferationsassay zeigte sich eine übermäßige Vitalität (bis zu 250%) der Myelin-behandelten Phagozyten gegenüber der unbehandelten Kontrolle (100%). Hinter diesem Ergebnis vermuten wir einen wichtigen Artefakt, der auf den oxidativen Stress der Zellen im Rahmen der Myelinphagozytose hindeutet. Durch die Messung der Caspasenaktivität 3/7 und des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta \Psi$ in den Myelin-behandelten Makrophagen ist es uns gelungen einen apoptotischen Zelluntergang Myelin-behandelter Makrophagen nachzuweisen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Phagozytose von Myelin durch mononukleäre Phagozyten zur Suppression der inflammatorischen Zytokine TNF α und IP-10 und zur Induktion eines apoptotischen Zelluntergangs führen kann. Damit ergibt sich ein Hinweis dafür, dass die Rolle der mononukleären Phagozyten im Rahmen der MS-Pathologie eher in der Suppression des neuroinflammatorischen Geschehens beruhen könnte. Die zeitlichen Remissionen der Symptomatik und der selbstlimitierende Charakter der schubförmigen MS könnten das klinische Korrelat darstellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ares, M. P., Stollenwerk, M., Olsson, A., Kallin, B., Jovinge, S., Nilsson, J. (2002): Decreased inducibility of TNF expression in lipid-loaded macrophages. *BMC Immunol* <u>3</u>, 13.
- Barnett, M. H., Prineas, J. W. (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* <u>55</u>, 458-68.
- Barnett, M. H., Henderson, A. P., Prineas, J. W. (2006): The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult Scler* <u>12</u>, 121-32.
- Bauer, J., Sminia, T., Wouterlood, F. G., Dijkstra, C. D. (1994): Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* <u>38</u>, 365-75.
- Bauer, J., Huitinga, I., Zhao, W., Lassmann, H., Hickey, W. F., Dijkstra, C. D. (1995): The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* <u>15</u>, 437-46.
- Bell, M. D., Lopez-Gonzalez, R., Lawson, L., Hughes, D., Fraser, I., Gordon, S., Perry, V. H. (1994): Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J Neurocytol* <u>23</u>, 605-13.
- Benveniste, E. N. (1997): Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* <u>75</u>, 165-73.
- Berlit, P., in: Klinische Neurologie., Berlit, P., Springer Medizin, Heidelberg, 2006, Seite(n) 1105-1137.
- Bernas, T., Dobrucki, J. (2000): The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Arch Biochem Biophys* <u>380</u>, 108-16.
- Bernas, T., Dobrucki, J. (2002): Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* <u>47</u>, 236-42.
- Berridge, M. V., Tan, A. S. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* <u>303</u>, 474-82.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., Brück, W. (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* <u>123 (Pt 6)</u>, 1174-83.

- Blander, J. M., Medzhitov, R. (2004): Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* <u>304</u>, 1014-8.
- Boven, L. A., Van Meurs, M., Van Zwam, M., Wierenga-Wolf, A., Hintzen, R. Q., Boot, R. G., Aerts, J. M., Amor, S., Nieuwenhuis, E. E., Laman, J. D. (2006): Myelinladen macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* <u>129</u>, 517-26.
- Brosnan, C. F., Raine, C. S. (1996): Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol* <u>6</u>, 243-57.
- Brosnan, C. F., Bornstein, M. B., Bloom, B. R. (1981): The effects of macrophage depletion on the clinical and pathologic expression of experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol <u>126</u>, 614-20.
- Brück, W., Stadelmann, C. (2005): The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol* <u>18</u>, 221-4.
- Brück, W., Porada, P., Poser, S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretzschmar, H. A., Lassmann, H. (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* <u>38</u>, 788-96.
- Cannella, B., Raine, C. S. (1995): The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* <u>37</u>, 424-35.
- Castedo, M., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Marchetti, P., Uriel, J., Kroemer, G. (1995): Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *Eur J Immunol* <u>25</u>, 3277-84.
- Cell-Signaling-Technology (2007): http://www.cellsignal.com/ddt/elisa.html; Abruf am 19.07.2007.
- Chao, C. C., Hu, S., Sheng, W. S., Peterson, P. K. (1995): Tumor necrosis factor-alpha production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev Neurosci* <u>17</u>, 97-105.
- Constantinescu, C. S., Goodman, D. B., Hilliard, B., Wysocka, M., Cohen, J. A. (2000): Murine macrophages stimulated with central and peripheral nervous system myelin or purified myelin proteins release inflammatory products. *Neurosci Lett* <u>287</u>, 171-4.
- Cossarizza, A., Franceschi, C., Monti, D., Salvioli, S., Bellesia, E., Rivabene, R., Biondo, L., Rainaldi, G., Tinari, A., Malorni, W. (1995): Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria. *Exp Cell Res* <u>220</u>, 232-40.
- Diemel, L. T., Copelman, C. A., Cuzner, M. L. (1998): Macrophages in CNS remyelination: friend or foe? *Neurochem Res* 23, 341-7.

- Doyle, S. E., O'Connell, R. M., Miranda, G. A., Vaidya, S. A., Chow, E. K., Liu, P. T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R. L., Yeh, W. C., Lane, T. F., Cheng, G. (2004): Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* <u>199</u>, 81-90.
- Epstein, L. G., Prineas, J. W., Raine, C. S. (1983): Attachment of myelin to coated pits on macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* <u>61</u>, 341-8.
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., Saftig, P. (2003): At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* <u>13</u>, 137-45.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., Henson, P. M. (1998): Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* <u>101</u>, 890-8.
- Forrest, V. J., Kang, Y. H., McClain, D. E., Robinson, D. H., Ramakrishnan, N. (1994): Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radic Biol Med* <u>16</u>, 675-84.
- Forman, H. J., Torres, M. (2001): Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* <u>22</u>, 189-216.
- Frohman, E. M., Racke, M. K., Raine, C. S. (2006): Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* <u>354</u>, 942-55.
- Giulian, D., Baker, T. J. (1986): Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* <u>6</u>, 2163-78.
- Gold, R., Linington, C., Lassmann, H. (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* <u>129</u>, 1953-71.
- Goldenberg, P. Z., Kwon, E. E., Benjamins, J. A., Whitaker, J. N., Quarles, R. H., Prineas, J. W. (1989): Opsonization of normal myelin by anti-myelin antibodies and normal serum. *J Neuroimmunol* <u>23</u>, 157-66.
- Goodwin, C. J., Holt, S. J., Riley, P. A., Downes, S., Marshall, N. J. (1996): Growth hormone-responsive DT-diaphorase-mediated bioreduction of tetrazolium salts. *Biochem Biophys Res Commun* 226, 935-41.

Gordon, S. (2003): Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 3, 23-35.

Greaves, D. R., Gordon, S. (2005): Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* <u>46</u>, 11-20.

- Green, T. R., Pratt, K. L. (1990): Detection and isolation of the NADPH-binding protein of the NADPH:O2 oxidoreductase complex of human neutrophils. *J Biol Chem* <u>265</u>, 19324-9.
- Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R. J., Becher, B. (2005): Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* <u>11</u>, 328-34.
- Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (1995): Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* <u>20</u>, 73-7.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., Phipps, R. P. (2002): Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* <u>23</u>, 144-50.
- Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hovelmeyer, N., Waisman, A., Rulicke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B., Aguzzi, A. (2005): Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* <u>11</u>, 146-52.
- Houtman, J. J., Fleming, J. O. (1996): Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J Neurovirol* <u>2</u>, 361-76.
- Huitinga, I., van Rooijen, N., de Groot, C. J., Uitdehaag, B. M., Dijkstra, C. D. (1990): Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med* <u>172</u>, 1025-33.
- Janeway, C.: An Introduction to Immunobiology and Innate Immunity, in: Immunobiology 5: the immune system in health and disease, hrsg. Garland Pub., New York, 2001, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=lps&rid=imm.figgrp.199.
- Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., Tontonoz, P. (2003): Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* <u>9</u>, 213-9.
- Joseph, S. B., Bradley, M. N., Castrillo, A., Bruhn, K. W., Mak, P. A., Pei, L., Hogenesch, J., O'Connell R, M., Cheng, G., Saez, E., Miller, J. F., Tontonoz, P. (2004): LXRdependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* <u>119</u>, 299-309.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V. V., Misgeld, T., Klinkert, W. E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R. L., Bartke, I., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R. (1999): Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* <u>189</u>, 865-70.
- Kleinschnitz, C., Meuth, S. G., Kieseier, B. C., Wiendl, H. (2007): [Update on pathophysiologic and immunotherapeutic approaches for the treatment of multiple sclerosis.]. *Nervenarzt* <u>78</u>, 1-5.

- Kolesnick, R., Golde, D. W. (1994): The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* <u>77</u>, 325-8.
- Kornek, B., Storch, M. K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M., Lassmann, H. (2000): Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* <u>157</u>, 267-76.
- Kuhlmann, T., Bitsch, A., Stadelmann, C., Siebert, H., Brück, W. (2001): Macrophages are eliminated from the injured peripheral nerve via local apoptosis and circulation to regional lymph nodes and the spleen. *J Neurosci* <u>21</u>, 3401-8.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., Cotran, R. S.: Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death in: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., Cotran, R. S., Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa.; [London], 2005A, Seite 26-32.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., Cotran, R. S.: Acute and Chronic Inflammation in: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., Cotran, R. S., Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa.; [London], 2005B, Seite 80.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., Cotran, R. S.: The Central Nervous System in: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Robbins, S. L., Cotran, R. S., Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa.; [London], 2005C, Seite 1382-1385.
- Lakics, V., Vogel, S. N. (1998): Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages. *J Immunol* <u>161</u>, 2490-500.
- Lassmann, H. (1998): Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. Mult Scler 4, 93-8.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A., Gilroy, D. W. (2002): Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* <u>2</u>, 787-95.
- Lee, H. C., Yin, P. H., Lu, C. Y., Chi, C. W., Wei, Y. H. (2000): Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* <u>348</u> <u>Pt 2</u>, 425-32.
- Lee, S. C., Liu, W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F., Berman, J. W. (1993): Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* <u>150</u>, 2659-67.
- Li, H., Cuzner, M. L., Newcombe, J. (1996): Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol* <u>22</u>, 207-15.

- Lipton, H. L., Dal Canto, M. C. (1976): Theiler's virus-induced demyelination: prevention by immunosuppression. *Science* <u>192</u>, 62-4.
- Liu, Y., Hao, W., Letiembre, M., Walter, S., Kulanga, M., Neumann, H., Fassbender, K. (2006): Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci* <u>26</u>, 12904-13.
- Lo, C. J., Fu, M., Lo, F. R., Cryer, H. G. (1999): Macrophage TNF mRNA expression induced by LPS is regulated by sphingomyelin metabolites. *Shock* <u>11</u>, 411-5.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Rodriguez, M., Lassmann, H. (1996): Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* <u>6</u>, 259-74.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. (1999): A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* <u>122 (Pt 12)</u>, 2279-95.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* <u>47</u>, 707-17.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* <u>23</u>, 549-55.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* <u>25</u>, 677-86.
- Marshall, N. J., Goodwin, C. J., Holt, S. J. (1995): A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* <u>5</u>, 69-84.
- Merrill, J. E., Ignarro, L. J., Sherman, M. P., Melinek, J., Lane, T. E. (1993): Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* <u>151</u>, 2132-41.
- Mimura, N., Asano, A. (1976): Synergistic effect of colchicine and cytochalasin D on phagocytosis by peritoneal macrophages. *Nature* <u>261</u>, 319-21.

missinglink.ucsf.edu

(2007): http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids_104_cns_injury/Response%20_to_Injury/Ol igodendroglia.htm; Abruf am 16.07.2007.

- Morell, P., Quarles, R. H.: Characteristic Composition of Myelin, in: Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, hrsg. Siegel, G. J., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=bnchm.section.259.
- Morrison, M. L., Williamson, K., Arthur, K., Price, G. J., Hamilton, P. W., Maxwell, P. (2005): Phenotypic changes in mitochondrial membrane potential (Delta psi(m)) during valinomycin-induced depolarisation and apoptosis. *Cell Oncol* <u>27</u>, 231-6.
- Mosley, K., Cuzner, M. L. (1996): Receptor-mediated phagocytosis of myelin by macrophages and microglia: effect of opsonization and receptor blocking agents. *Neurochem Res* <u>21</u>, 481-7.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* <u>65</u>, 55-63.
- Mosser, D. M. (2003): The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol 73, 209-12.
- Neumann, H. (2003): Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Curr Opin Neurol* <u>16</u>, 267-73.

neuropathologyweb.org

(2007): *http://www.neuropathologyweb.org/chapter1/chapter1cOligodendroglia*; Abruf am 16.07.2007.

- Nguyen, K. B., McCombe, P. A., Pender, M. P. (1994): Macrophage apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* <u>7</u>, 145-52.
- Nguyen, M. D., Julien, J. P., Rivest, S. (2002): Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* <u>3</u>, 216-27.
- Nisimoto, Y., Otsuka-Murakami, H. (1990): NADPH: nitroblue tetrazolium reductase found in plasma membrane of human neutrophil. *Biochim Biophys Acta* <u>1040</u>, 260-6.
- Noronha, A., Toscas, A., Jensen, M. A. (1993): Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* <u>46</u>, 145-53.
- Norton, W. T., Poduslo, S. E. (1973): Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* <u>21</u>, 749-57.
- Pereira, C., Santos, M. S., Oliveira, C. (1998): Metabolic inhibition increases glutamate susceptibility on a PC12 cell line. *J Neurosci Res* <u>51</u>, 360-70.
- Petit, P. X., Lecoeur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., Gougeon, M. L. (1995): Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasoneinduced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* <u>130</u>, 157-67.

- Pettus, B. J., Chalfant, C. E., Hannun, Y. A. (2002): Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* <u>1585</u>, 114-25.
- Platten, M., Steinman, L. (2005): Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med* <u>11</u>, 252-3.
- Prat, A., Antel, J. (2005): Pathogenesis of multiple sclerosis. Curr Opin Neurol 18, 225-30.
- Prineas, J. W., Raine, C. S. (1976): Electron microscopy and immunoperoxidase studies of early multiple sclerosis lesions. *Neurology* <u>26</u>, 29-32.
- Prineas, J. W., Graham, J. S. (1981): Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Ann Neurol* <u>10</u>, 149-58.
- Prineas, J. W., Kwon, E. E., Goldenberg, P. Z., Ilyas, A. A., Quarles, R. H., Benjamins, J. A., Sprinkle, T. J. (1989): Multiple sclerosis. Oligodendrocyte proliferation and differentiation in fresh lesions. *Lab Invest* <u>61</u>, 489-503.
- R&D-Systems (2004): Macrophage

Activation. *http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_SP04_MacrophageActi* vation.aspx.Abruf am 16.7.2007.

R&D-Systems (2006): Autoimmunity

Poster. *http://www.rndsystems.com/poster_detail_objectname_2006Autoimmunity.asp* x. Abruf am 16.7.2007.

- Satoh, T., Isobe, H., Ayukawa, K., Sakai, H., Nawata, H. (1996): The effects of pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on cell viability and DNA production of rat hepatocytes. *Life Sci* <u>59</u>, 1103-8.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* <u>48</u>, 4827-33.
- Selmaj, K., Raine, C. S. (1988): Tumor necrosis factor mediates myelin damage in organotypic cultures of nervous tissue. *Ann N Y Acad Sci* <u>540</u>, 568-70.
- Selmaj, K., Raine, C. S., Farooq, M., Norton, W. T., Brosnan, C. F. (1991): Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. J Immunol <u>147</u>, 1522-9.
- Shearman, M. S. (1996): Cellular MTT reduction distinguishes the mechanism of action of beta-amyloid from that of tachykinin receptor peptides. *Neuropeptides* <u>30</u>, 125-32.
- Simon, H. U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000): Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* <u>5</u>, 415-8.

- Simpson, J. E., Newcombe, J., Cuzner, M. L., Woodroofe, M. N. (2000): Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* <u>26</u>, 133-42.
- Smith, M. E. (1993): Phagocytosis of myelin by microglia in vitro. J Neurosci Res 35, 480-7.
- Smith, M. E. (2001): Phagocytic properties of microglia in vitro: implications for a role in multiple sclerosis and EAE. *Microsc Res Tech* <u>54</u>, 81-94.
- Sommer, M. A., Forno, L. S., Smith, M. E. (1992): EAE cerebrospinal fluid augments in vitro phagocytosis and metabolism of CNS myelin by macrophages. *J Neurosci Res* <u>32</u>, 384-94.
- Sospedra, M., Martin, R. (2005): Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* <u>23</u>, 683-747.
- Stout, R. D., Suttles, J. (1997): T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Front Biosci* <u>2</u>, d197-206.
- Tanaka, R., Iwasaki, Y., Koprowski, H. (1975): Ultrastructural studies of perivascular cuffing cells in multiple sclerosis brain. *Am J Pathol* <u>81</u>, 467-78.
- Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J., Oppenheim, J. J. (1993): Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* <u>177</u>, 1809-14.
- Taylor, P. R., Carugati, A., Fadok, V. A., Cook, H. T., Andrews, M., Carroll, M. C., Savill, J. S., Henson, P. M., Botto, M., Walport, M. J. (2000): A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. J *Exp Med* <u>192</u>, 359-66.
- Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsuse, T., Ouchi, Y. (1999): Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn J Pharmacol* <u>79</u>, 33-40.
- Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J., Vogel, S. N. (2002): TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* <u>3</u>, 392-8.
- Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L. (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* <u>338</u>, 278-85.

- Trotter, J., DeJong, L. J., Smith, M. E. (1986): Opsonization with antimyelin antibody increases the uptake and intracellular metabolism of myelin in inflammatory macrophages. *J Neurochem* <u>47</u>, 779-89.
- Vallieres, N., Berard, J. L., David, S., Lacroix, S. (2006): Systemic injections of lipopolysaccharide accelerates myelin phagocytosis during Wallerian degeneration in the injured mouse spinal cord. *Glia* <u>53</u>, 103-13.
- van der Goes, A., Brouwer, J., Hoekstra, K., Roos, D., van den Berg, T. K., Dijkstra, C. D. (1998): Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J Neuroimmunol* <u>92</u>, 67-75.
- van der Laan, L. J., Ruuls, S. R., Weber, K. S., Lodder, I. J., Dopp, E. A., Dijkstra, C. D. (1996): Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factoralpha and nitric oxide. *J Neuroimmunol* <u>70</u>, 145-52.
- Varadhachary, A. S., Monestier, M., Salgame, P. (2001): Reciprocal induction of IL-10 and IL-12 from macrophages by low-density lipoprotein and its oxidized forms. *Cell Immunol* <u>213</u>, 45-51.
- Weiner, L. P. (1973): Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. *Arch Neurol* <u>28</u>, 298-303.
- Wikipedia (2007 a): *http://de.wikipedia.org/wiki/Reaktive_Sauerstoff-Spezies*; Abruf am 05.07.2007.
- Wikipedia (2007 b): http://en.wikipedia.org/wiki/NADPH_oxidase; Abruf am 11.07.2007.
- Wikipedia (2007 c): http://en.wikipedia.org/wiki/Foam_cells; Abruf am 13.07.2007.
- Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A., Chandran, S. (2003): Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. J Neurosci 23, 4967-74.
- Williams, K., Ulvestad, E., Waage, A., Antel, J. P., McLaurin, J. (1994): Activation of adult human derived microglia by myelin phagocytosis in vitro. *J Neurosci Res* <u>38</u>, 433-43.
- Zajicek, J. P., Wing, M., Scolding, N. J., Compston, D. A. (1992): Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. *Brain* <u>115 (Pt 6)</u>, 1611-31.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., Kroemer, G. (1995): Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* <u>182</u>, 367-77.

- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Masse, B., Kroemer, G. (1996): Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* <u>384</u>, 53-7.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989): The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol* <u>49</u>, 1-12.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Faßbender für das Überlassen dieses Themas, die Bereitstellung der erforderlichen Geräte und benötigten Materialien, seine Geduld und ständige Unterstützung in vielen Sphären der Dissertationsentstehung bedanken.

Herrn Dr. Alex Liu bin ich zu großem Dank verpflichtet. Er gab meiner Arbeit in den kritischen Phasen immer ein neues Licht. Durch seine Korrektheit und sein enormes fachliches Wissen motivierte mich Herr Dr. Liu zu einer gewissenhaften und effektiven wissenschaftlichen Tätigkeit.

Frau Maryse Letiembre danke ich für die anfängliche Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Sie hat mir auf eine liebevolle, aber trotzdem effektive und sichere Weise viele Methoden und den Einblick in das wissenschaftliche Denken vermittelt.

Herrn Prof. Dr. Füzesi danke ich für seine motivierenden und unterstützenden Worte, die in der Endphase dieser Dissertationsarbeit eine immense Bedeutung hatten, und deren Ausarbeitung beschleunigte.

Miroslav Kulanga, Hamburg im Oktober 2008

LEBENSLAUF

Am 11. Dezember 1980 wurde ich, Miroslav Kulanga, als zweiter Sohn von František Kulanga und dessen Ehefrau Jarmila Kulangová, geb. Petríková, in Kežmarok in der Slowakei geboren.

In Tatranská Lomnica (SK) besuchte ich von 1987 bis 1995 die Grundschule. Nach erfolgreichen Aufnahmeprüfungen habe ich von 1995 bis 2000 das bilinguale Gymnasium in Poprad (SK) besucht und 2000 mit dem slowakischen Abitur und der deutschen allgemeinen Hochschulreife abgeschlossen.

Meinen Zivildienst leistete ich von Juni 2000 bis März 2001 im Krankenhaus Poprad (SK).

Zum Sommersemester 2001 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im April 2004 habe ich mit der experimentellen Durchführung meiner Doktorarbeit begonnen. Das Praktische Jahr habe ich von Februar 2006 bis Februar 2007 im Uni-Klinikum Göttingen mit dem Wahlfach Anästhesie absolviert. Am 28. November 2007 habe ich das Medizinstudium mit der Ärztlichen Prüfung erfolgreich abgeschlossen. Vom Dezember 2007 bis Mai 2008 habe ich als Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gearbeitet. Seit Juli 2008 arbeite ich in der medizinischen Industrie an der Entwicklung von Krankenhausinformationssystemen.

Miroslav Kulanga, Hamburg im Oktober 2008