

Aus dem Institut für Hirnforschung  
der Universität Tübingen  
Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

**Proteinexpression und Verteilung von Mikroglia  
im menschlichen Rückenmark**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Manuel Dominik Stoll  
aus Tübingen  
2007

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Skutella

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	5
1.1 Mikroglia	5
1.1.1 Historischer Rückblick	5
1.1.2 Herkunft von Mikrogliazellen	7
1.1.3 Morphologie und Funktion von Mikrogliazellen	9
1.1.3.1 Amöboide Mikroglia	9
1.1.3.2 Ramifizierte Mikroglia	9
1.1.3.3 Reaktive / phagozytierende Mikroglia	10
1.1.3.4 Perivaskuläre Zellen	11
1.1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften	13
1.1.5 Marker zur Detektion der Mikroglia	14
1.1.6 Verteilung im Großhirn und Rückenmark	18
1.2 Ziele der Arbeit und Fragestellung	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Patientendaten	21
2.1.1 Normalrückenmark	21
2.1.2 Pathologisches Rückenmark	22
2.1.3 Klinische Daten	23
2.2 Standardisierung der untersuchten Regionen	25
2.3 Herstellung der histologischen Präparate	28
2.4 Immunhistochemie	28
2.4.1 Auswahl der Antikörper	28
2.4.1.1 AIF-1	28
2.4.1.2 CD4	29
2.4.1.3 COX-1	29
2.4.1.4 CD68 / PG-M1	30
2.4.1.5 EMAP-II	31

2.4.1.6	CD45 (LCA)	31
2.4.1.7	IL-16 (LCF)	32
2.4.1.8	MHC-II (HLA-DR; -DP; -DQ)	32
2.4.1.9	MRP-8 / MRP-14	33
2.4.2	Antikörper zum Ausschluß pathologischer Alterationen	33
2.4.2.1	β-APP	33
2.4.2.2	Neurofilament	34
2.4.2.3	Ki-67	34
2.4.3	Antikörper zur Darstellung von Astrozyten	35
2.4.4	Lektinhistochemie mit RCA-1	35
2.4.5	Vorbehandlung, Immunhistochemie und Lektinhistochemie	35
2.4.6	Doppelfärbungen zu Überprüfung der Selektivität	37
2.4.7	Isotypenkontrolle	37
2.5	Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung	37
2.6	Statistische Methoden	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	39
3.1.1	Ausschluss pathologischer Alterationen	39
3.1.2	Statistisch nicht ausgewertete Antikörper	39
3.1.3	Von ruhender Mikroglia nicht exprimierte Proteine	40
3.1.4	Ergebnisse der Doppelfärbungen	41
3.1.5	Proteinexpression der Normalfälle	43
3.1.5.1	Expression von AIF-1	45
3.1.5.2	Expression von CD68	48
3.1.5.3	Expression von IL-16 (LCF)	51
3.1.5.4	Expression von MHC-II (HLA-DR; -DP; -DQ)	54
3.1.6	Erstellung eines Referenzbereiches	58
3.1.7	Proteinexpression der pathologischen Fälle	61
3.1.7.1	Fälle mit diffuser Erhöhung der mikroglialen Proteinexpression	62

3.1.7.2	Fälle mit selektiver Erhöhung der mikroglialen Proteinexpression	63
3.1.7.3	Fälle ohne mikrogliale Reaktion	64
3.1.7.4	Fälle mit verminderter mikroglialer Proteinexpression	64
4	DISKUSSION	66
4.1	Proteinexpression der Normalfälle	66
4.1.1	Homogene Verteilung der Mikroglia im Rückenmark	66
4.1.2	Heterogenität der Proteinexpression auf ruhender Mikroglia	68
4.1.2.1	Proteine mit hohen Expressionsraten: CD68, MHC-II	68
4.1.2.2	Proteine mit geringen Expressionsraten: AIF-1, IL-16	71
4.1.2.3	Nicht exprimierte Proteine: MRP-8, MRP-14	72
4.2	Proteinexpression der pathologischen Fälle	74
4.2.1	Expression von MRP-8 und MRP-14	74
4.2.2	Zunahme der Proteinexpression auf Mikroglia	75
4.2.3	Beurteilung der pathologischen Fälle anhand der Referenzintervalle	75
4.2.3.1	Fälle mit diffuser Zunahme mikroglialer Proteinexpression	75
4.2.3.2	Fälle mit selektiver Zunahme mikroglialer Proteinexpression	76
4.2.3.3	Fälle ohne mikrogliale Reaktion	77
4.2.3.4	Fälle mit erniedrigter mikroglialer Proteinexpression	78
4.3	Schlussfolgerung	80
4.4	Ausblick	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	82
6	LITERATURVERZEICHNIS	84
7	ANHANG	99
7.1	Tabellen	99
7.2	Diagramme	103

---

7.3	Publikationen	135
7.4	Abkürzungen	136
7.5	Danksagung	139
7.6	Lebenslauf	140

## **1 Einleitung**

### **1.1 Mikroglia**

#### **1.1.1 Historischer Rückblick**

Die ersten Beschreibungen von mikroglialen Zellen liegen mehr als anderthalb Jahrhunderte zurück. Gluge beschrieb bereits 1841 phagozytierende Zellen, welche er als „Entzündungskugeln“ bezeichnete. Virchow (1846 / 1851 / 1867) beobachtete als einer der ersten mit Fett gefüllte, phagozytierende Zellen im ZNS („Schaumzellen“) und Boll entdeckte 1874 sogenannte granulierende Wanderzellen in Hühnerembryonen. 1875 berichtete Eichhorst über extravasale Zellen im humanen embryonalen Rückenmark, welche nach der Migration ein sternförmiges Aussehen annahmen. Erste Ansätze zur Bedeutung der Mikroglia wurden 1899 von dem deutschen Psychiater Franz Nissl vorweggenommen. Er bezeichnete die Zellen auf Grund ihrer Morphologie als Stäbchenzellen und postulierte eine Beteiligung derselben an vielen pathologischen Prozessen, ferner wies er eine gliale Reaktion bei Axonläsionen von Motoneuronen und den korrespondierenden Kerngebieten nach. Alzheimer (1904) konnte durch seine Arbeiten über pathologische Veränderungen des Nervensystems zu dieser These beitragen. Vor dem zwanzigsten Jahrhundert herrschte die Meinung vor, das Nervensystem bestünde aus zwei Zellarten, nämlich Nervenzellen und Neuroglia. Durch eine Modifikation der Golgi-Technik gelang Robertson 1900 der Nachweis, dass Neuroglia aus zwei verschiedenen Zellarten bestehen und nicht aus einer, wie bisher angenommen. Dieser neu entdeckten Zellart gab Robertson den Namen Mesoglia, da sie aufgrund der Morphologie und des Färbeverhaltens Ähnlichkeiten mit mesodermalem Gewebe aufwies. Ramón y Cajal beschrieb diese Zellen später als drittes Element (tercer elemento) neben Nervenzellen und Neuroglia (1913).

Ein bedeutender Wendepunkt wurde 1919 durch Del Rio-Hortega vollzogen. Er unterteilte das sogenannte dritte Element in zwei morphologisch und funktionell völlig verschiedene Zellen, welche er Oligodendroglia und Mikroglia nannte. Dabei sah er erstere neuroektodermaler und letztere mesenchymaler Herkunft. Mit Hilfe der Silberimprägnierungstechnik gelang es ihm, die grundlegenden morphologischen Unterschiede zwischen ruhender und aktivierter Mikroglia aufzuzeigen (Rio-Hortega

1932). Dabei sah er die ramifizierte Mikroglia als voll differenzierte und ruhende Form an, und gelangte zu der Ansicht, dass selbige unter pathologischen Bedingungen zu einer Metamorphose in die amöboide Form fähig sind, welche dann migratorische und phagozytierende Eigenschaften besitzt. Bezüglich der Herkunft der Mikroglia glaubte er an ein Auswandern embryonaler Teilchen aus der Pia mater, zog aber aufgrund der funktionellen Ähnlichkeiten auch ein Abstammen von mononukleären Blutzellen in Betracht. Damit gilt er zu Recht als der „Vater der Mikroglia“ und Begründer der Kontroverse über die mikrogliale Abstammung.

Der zweite Weltkrieg brachte die Mikrogliaforschung zum Stillstand. Erst mit dem Aufstieg der Elektronenmikroskopie erfolgte eine weitere Untersuchung ihrer strukturellen Eigenschaften. Aufgrund der vielen gegensätzlichen Auffassungen zu dieser Zeit wurde die Existenz der ramifizierten Mikroglia von einigen Autoren in Frage gestellt. (Eager und Eager 1966, Fujita 1965, Fujita und Kitamura, 1975, Kruger und Maxwell 1966). Einen Durchbruch brachten hier die Arbeiten von Mori und Leblond (1969), welche als erste die Silberimprägnierungstechnik auf das Elektronenmikroskop übertrugen und damit eine genaue Identifizierung und Charakterisierung ramifizierter Mikroglia ermöglichten. Dadurch konnte die ramifizierte Mikroglia weiter als eigenständige zelluläre Entität im ZNS etabliert werden und es entbrannte erneut der seit Rio-Hortegas Arbeiten bestehende Streit um ihre Herkunft.



### 1.1.2 Herkunft von Mikrogliazellen

Bezüglich der Herkunft der Mikroglia gab es vier wichtige Thesen.

Eine weit verbreitete Theorie sah Mikroglia als von mesodermaler pialer Herkunft. Diese Ansicht wurde erstmals von Rio-Hortega (1919) vertreten. Er war der Meinung, dass während der embryonalen Entwicklung polyblastische Zellen mesodermalen Ursprungs aus der weichen Hirnhaut in das Gehirn einwandern. Diese Zellen bezeichnete er als Mikroglioblasten.

Andere Autoren (Lewis 1968, Rydberg 1932) sahen das subependymal gelegene Hirnparenchym in der Nähe des Seitenventrikels als Quelle der ramifizierten Mikroglia an. Die Ansicht, dass Mikroglia damit neuroektodermalen Ursprungs sind wurde auch in neuerer Zeit noch von einigen Forschern vertreten (Fedoroff et al. 1997, de Groot et al. 1992, Kitamura et al. 1984, Schelper und Adrian 1986).

Die Theorie der perizytären Herkunft der Mikroglia wurde von Mori und Leblond (1969) entwickelt. Diese waren der Meinung, dass mit Blutgefäßen assoziierte Perizyten zur Migration ins Neuropil befähigt seien, da ihre Basalmembranen an einigen Stellen Unterbrechungen aufwiesen. Diese Sichtweise wurde auch später von Baron und Gallego geteilt (1972).

Die Theorie der monozytären Abstammung wurde erstmals 1933 von Santha und Juba vertreten. Ihnen fiel auf, dass die Vaskularisierung des Gehirns in engem zeitlichem Zusammenhang mit dem ersten Auftreten ramifizierter Mikroglia steht. Daraus zogen sie den Schluß, dass Mikroglia von im Blut zirkulierenden Monozyten abstammen.

Die heute am häufigsten verbreitete Meinung sieht den Ursprung der Mikroglia im Mesoderm. In Versuchen mit Knochenmarkchimären wurden Empfängertiere einer myeloablativen Bestrahlung ausgesetzt, und kurz danach mit Knochenmark eines Spendertieres rekonstruiert. Spenderzellen können dabei aufgrund von Unterschieden im MHC-System, durch transgene Konstrukte oder durch Transplantation von männlichen Spenderzellen in weibliche Empfängertiere nachgewiesen werden. Bei diesen Experimenten ließen sich Donorzellen hämatopoetischen Ursprungs später im Gehirn nachweisen (Hess et al. 2004, Hickey und Kamura 1988, Hickey et al. 1992, Simard und Rivest 2004, Ting et al. 1983, Unger et al. 1993). Des weiteren konnten

exogen markierte Monozyten im sich entwickelnden ZNS nachgewiesen werden (Ling et al. 1980). Während der Embryogenese wurde ein Einwandern amöboider Zellen aus dem Blut in das Gehirn und die dortige Phagozytose von im Rahmen der ZNS-Entwicklung untergehenden Nervenzellen beobachtet (Ling und Wong 1993). Als weiteren Hinweis kann man die Differenzierungsantigene von Mikroglia ansehen, die sich ansonsten nur auf hämatopoetischen Zellen und Makrophagen finden lassen (Perry und Gordon 1988, Streit et al 1988).

Neuere Studien unterstützen jedoch eine zweite Hypothese. Alliot et al. (1999) und Pessac et al. (2001) zeigten, dass ein Großteil der Mikroglia im perinatalen Hirn durch Proliferation in situ entstehen. Des weiteren lassen sich Mikroglia ab dem siebten embryonalen Tag aus dem Dottersack und einen Tag später auch aus dem Hirnrudiment kultivieren. Später konnten mikrogliale Vorläuferzellen durch Markierung mit Isolektinen ab dem achten embryonalen Tag im Dottersack und kurz darauf auch im mesenchymalen paraneuroepithelialen Bindegewebe in situ nachgewiesen werden (Kaur et al. 2001).

Da die Hirnanlage zu diesem Zeitpunkt noch nicht vaskularisiert ist, müssen die Vorläuferzellen auf einem anderen als dem Blutweg dorthin gelangt sein.

Damit ergeben sich zwei mesenchymale Quellen für die mikroglialen Zellen im adulten Gehirn:

1. aus dem Dottersack eingewanderte Vorläuferzellen
2. nach der Vaskularisierung des Gehirns eingewanderte Monozyten, bzw. myelomonozytäre Vorläuferzellen

### **1.1.3 Morphologie und Funktion von Mikrogliazellen**

Die Mikroglia stellt im ZNS die immunologische Haupteffektorzelle dar (Graeber und Streit 1990a). Es handelt sich jedoch nicht um einen einheitlichen Zelltyp. Anhand der Lokalisation, Morphologie, Expression von Oberflächenmolekülen und Funktion lassen sich mehrere Unterformen dieser Zelle unterscheiden.

#### **1.1.3.1 Amöboide Mikroglia**

Ein erstes Auftreten von Mikroglia erfolgt während der fetalen und postnatalen Entwicklung in Form von amöboiden Zellen. Es handelt sich hierbei um große abgerundete Zellen mit nur wenigen Ausläufern. Sie besitzen die Fähigkeit zur Proliferation, Migration und Phagozytose. Ihre Funktion besteht in der Eliminierung des während der Entwicklung durch Umbauvorgänge entstehenden Zellmaterials. Des Weiteren sind sie am Wachstum von Axonen, Gefäßen, Nervenzellen und Gliazellen beteiligt (Dheen et al. 2002). Mit zunehmender Entwicklung erfolgt eine Umwandlung der amöboiden Form in die ramifizierte Mikroglia (Leong und Ling 1992, Ling und Wong 1993).

#### **1.1.3.2 Ramifizierte Mikroglia**

Ramifizierte Mikroglia besitzen einen kleinen Kern, wenig Zytoplasma und mehrere dünne, verzweigte Ausläufer. Sie stellt die ruhende Form der Mikroglia im ausgereiften, gesunden Gehirn dar. In diesem Stadium sind die ortsständigen Zellen weder zur Phagozytose noch zur Proliferation befähigt, und weisen eine niedrige Expression von Membranliganden und Oberflächenrezeptoren auf, welche für die Ausübung makrophagentypischer Funktionen notwendig sind (Kreutzberg 1996, Sedgwick und Hickey 1997). Bei den dünnen verzweigten Ausläufern handelt es sich um sehr mobile und bewegliche Gebilde, welche ständig die nähere Umgebung überwachen und sehr schnell auf Störungen der Blut-Hirnschranke und auf Zellschädigungen reagieren (Nimmerjahn et al. 2005, Raivich 2005). Diese ruhenden Mikroglia reagieren sehr sensibel auf pathologische Veränderungen in ihrer Umgebung, wobei es keine Rolle spielt, auf welche Art diese Schädigungen erfolgen. So lässt sich eine Beteiligung der Mikroglia bei nahezu jeder Erkrankung des ZNS nachweisen, sei sie nun infektiösen, entzündlichen, traumatischen, ischämischen, neoplastischen oder degenerativen

Ursprungs (Stoll und Jander 1999). Die ramifizierten Mikroglia durchlaufen einen Austausch mit Vorläuferzellen des Knochenmarks, welche sich unter dem Einfluss des ZNS-Gewebes in ramifizierte Mikroglia differenzieren. Ursprünglich wurde angenommen, dass nur ein geringer Prozentsatz (ca. 1%) an diesem Austausch teilnimmt (Hickey et al. 1992, Unger et al. 1993). Neuere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass der Austausch in einem größeren Maße stattfindet als zunächst angenommen (Simard und Rivest 2004).

### **1.1.3.3 Reaktive / phagozytierende Mikroglia**

Die unter pathologischen Stimuli erfolgte Aktivierung führt zu einer Rückbildung der Fortsätze und Hypertrophie des Zellkörpers, so dass die Zellen nun eine ovale Morphologie annehmen. Parallel dazu proliferieren die Zellen und bewegen sich auf den Ort der Schädigung zu. Kommt es zu einem Zelluntergang verschiedenster Ursache, besitzen Mikroglia die Fähigkeit zur Umwandlung in intrinsische Gehirnmakrophagen, welche nun zur Phagozytose befähigt sind. In diesem Stadium sind die Zellen nun deutlich abgerundet und fallen durch ihren hohen Gehalt an Lysosomen und Phagosomen auf.

Zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen kommt es zu einem Wechsel des Immunphänotyps durch verstärkte oder de novo Expression einer Reihe von Markerproteinen. Dazu gehören die Histokompatibilitätsantigene MCH I und II, Komplementrezeptoren (CR3), Integrine, interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM 1), kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7-1) und CD 86 (B7-2) und in einigen Spezies auch CD 4 (Raivich et al. 1999).

Die funktionellen Veränderungen beinhalten die Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren. Durch die Sekretion einer Bandbreite an Mediatoren, die zur Superfamilie der Zytokine und Wachstumsfaktoren gehören, spielt die Mikroglia eine wichtige Effektorfunktion im Rahmen von Entzündungsvorgängen und offenbart ihre immunmodulatorische Kapazität. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-16), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), nerve growth factor (NGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) und Prostaglandine (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>).

Zudem besitzt die Mikroglia auch neuroprotektive bzw. gewebserhaltende Eigenschaften durch die Produktion von Faktoren wie bFGF, NGF, Transforming growth factor-1 (TGF-1), Plasminogen, IL-3 und IL-1 $\beta$  (Cheng und Mattson 1991, Giulian et al. 1994, Kreutzberg 1996, Rezaie und Male 1999). Deshalb wird der Mikroglia bei sublethalen Zellschäden auch eine gewebserhaltende Funktion zugeschrieben (Banati und Graeber 1994).

Andererseits produziert sie aber auch eine Vielzahl potentiell schädlicher Faktoren. Dies sind unter anderem freie Sauerstoffradikale, Stickstoffverbindungen, proteolytische Enzyme, Arachidonsäuremetaboliten, Exzitotoxine, Komplementfaktoren und diverse Zytokine (Banati et al. 1993, Chabot et al. 1997, Frei et al. 1987, Giulian et al. 1990, Kreutzberg 1996, Wesselingh et al. 1997). So steht die Mikroglia im Verdacht die Neuroinflammation und damit die neuronale Schädigung bei der Amyotrophen Lateralsklerose zu verstärken (Baron et al. 2005). Beim Guillain-Barré-Syndrom wurde ebenfalls eine diffuse Aktivierung mikroglialer Zellen im ZNS beschrieben (Rauschka et al. 2003). Bei der bakteriellen Meningitis scheint eine Aktivierung der Mikroglia zur Langzeitschädigung beizutragen (Nau und Bruck 2002). Des Weiteren findet sich eine vermehrte Aktivität mikroglialer Zellen bei neoplastischen, neurodegenerativen, epileptischen und bei vaskulären Erkrankungen (Jellinger et al. 1975, Shibata et al. 2004, Turrin und Rivest 2004, Zhou et al. 2005). Auch bei der Multiplen Sklerose trägt die Mikroglia möglicherweise durch ihre Vielzahl an Effektormolekülen zu einer vermehrten Zellschädigung bei (Jack et al. 2005). Die Mikroglia ist somit neben ihrer physiologischen Funktion auch an der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen beteiligt (Bruce-Keller 1999, Gonzalez-Scarano und Baltuch 1999).

#### **1.1.3.4 Perivaskuläre Zellen**

Die perivaskulären Zellen liegen in den Virchow-Robinschen Räumen, zwischen dem Endothel und der Membrana glia limitans perivascularis und damit außerhalb des Hirnparenchyms. Es handelt sich um langgestreckte Zellen, welche allseitig von einer Basalmembran umgeben sind. Sie lassen sich durch ihre Lokalisation, Morphologie und den Immunphänotyp von Perizyten, glatten Muskelzellen und perivaskulären Mikroglia

(parenchymale Mikroglia in der Umgebung von Gefäßen) unterscheiden (Graeber und Streit 1990b). Perivaskuläre Zellen teilen sich Antigene mit Makrophagen (MHC-II, CD4) und können phagozytieren. Wegen der Expression von MHC-II werden ihnen auch antigenpräsentierende Eigenschaften zugeschrieben. Sie durchlaufen ebenfalls einen Austausch mit Vorläuferzellen des Knochenmarks, jedoch in einem größerem Ausmaß wie die parenchymalen Mikroglia.

### 1.1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften

Seit der ersten Beschreibung von Ionenkanälen auf Mikroglia wurde ein breites Spektrum an Ionenkanälen identifiziert und charakterisiert. Mikroglia sind in der Lage Ionenkanäle zu exprimieren, welche selektiv für  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Cl^-$  durchlässig sind. Deren Expressionsgrad ist vom funktionellen Zustand abhängig in welchem sich die Mikroglia gerade befindet (Eder 1998).

Dehnungsaktivierte  $Cl^-$ -Kanäle scheinen bei der Umwandlung von der amöboiden in die ramifizierte Form der Mikroglia eine wichtige Rolle zu spielen, da eine Blockade der  $Cl^-$ -Kanäle die morphologische Transformation unterbindet (Eder et al. 1998). Ruhende Mikroglia besitzen einen spannungsabhängigen einwärtsgerichteten  $K^+$ -Kanal, welcher sich nicht auf aktivierten Mikroglia und Makrophagen findet. Eine Aktivierung der Mikroglia resultiert in der Reduktion der einwärtsgerichteten Ströme und der Expression eines verzögerten auswärtsgerichteten  $K^+$ -Kanals (Draheim et al. 1999, Fischer et al. 1995, Kettenmann et al. 1990, Visentin et al. 1995). Des weiteren lassen sich die mikroglialen Membrankanäle durch ATP depolarisieren. ATP wird beispielweise von Neuronen und Endothelzellen nach Gewebsschäden freigesetzt. Damit besitzt es das Potential die transmembranösen Signale für die Änderung der Aktivierungszustände von Mikroglia zu liefern (Kettenmann et al. 1993).

Die Arbeiten von Schmidtmayer et al. (1994) zeigten jedoch, dass sich dieses für Mikroglia spezifische Membrankanalmuster auch auf Monozyten und Makrophagen durch Ko-Kultivierung mit Astrozyten erzielen läßt. Dabei nehmen die Makrophagen und Mononzyten auch ein ramifiziertes Aussehen an, und sind damit morphologisch und elektrophysiologisch nicht mehr von Mikroglia zu unterscheiden (Bauer et al. 1994, Rinner et al. 1995, Sievers et al. 1994).

Es sollte jedoch bedacht werden, dass der überwiegende Teil dieser Studien an Zellkulturen durchgeführt wurde, und erst zukünftige Untersuchungen zeigen werden inwiefern sich die gewonnenen Erkenntnisse auch auf die komplexe Situation in situ übertragen lassen. So finden sich bei den wenigen Studien, welche in situ durchgeführt wurden, bedeutende Unterschiede im Expressionsmuster der Ionenkanäle ruhender Mikroglia (Walz und Bekar 2001).

### 1.1.5 Marker zur Detektion der Mikroglia

Die Silbercarbonat-Imprägnierung mit der es Rio-Hortega 1932 erstmals gelang Mikroglia zu identifizieren, war für mindestens 50 Jahre die am meisten benutzte Methode zur Darstellung von Mikroglia. Mit der Einführung der Lektin- und Immunhistochemie war es möglich, Mikroglia zuverlässig und reproduzierbar darzustellen. Trotz dieser Fortschritte und intensiver Bemühungen ist es bis heute nicht gelungen, einen spezifischen Marker für ruhende Mikroglia zu finden (Guillemin und Brew 2004, Moore und Thanos 1996). Auch der zunächst vielversprechende, für ramifizierte Mikroglia spezifisch erscheinende Antikörper 5-D-4 markiert lediglich eine mikrogliale Subpopulation (Bertolotto et al. 1998, Wilms et al. 1999).

Um die Normalpopulation von pathologischen Alterationen abzugrenzen, wurden für diese Arbeit Antigene ausgewählt, welche konstitutiv von mikroglialen Zellen exprimiert werden, und andere, welche sich lediglich fakultativ auf aktivierten Mikroglia finden. Aufgrund der großen Anzahl der in der Literatur beschriebenen Detektionsmöglichkeiten, soll nachfolgend nur auf die in der Arbeit verwendeten Marker eingegangen werden. Auf die Funktionen der einzelnen Marker wird im Kapitel Material und Methoden noch näher eingegangen.

Das Ricinus-communis-Agglutinin-1 (RCA-1) ist ein Lektin, welches spezifisch membranständige Glykoproteine bindet, die sich auf Mikroglia, Makrophagen und Endothelzellen befinden und wurde bereits von verschiedenen Autoren als Mikrogliamarker verwendet (Barcikowska et al. 1993, Engel et al. 1996, Esiri und Morris 1991, Mannoji et al. 1986).

Die Expression von CD68 wurde bereits durch eine Reihe von Arbeitsgruppen sowohl auf ruhender als auch auf aktivierter Mikroglia beschrieben, und wird daher für diese Arbeit als Referenzprotein betrachtet (Arends et al. 2000, Hulette et al. 1992, Ulvestad et al. 1994, Wagner et al. 1999). Der Antikörper PG-M1 ist ebenfalls gegen ein Epitop des CD68-Antigens gerichtet und zeigt gegenüber anderen Antikörpern ein spezifischeres Reaktionsmuster mit Zellen aus der Familie der Makrophagen und Monozyten (Falini et al. 1993). CD68 ist zum größten Teil in Lysosomen lokalisiert, zu einem geringeren Teil findet es sich jedoch auch auf der Zelloberfläche. Es scheint



dabei eine Rolle beim Vesikeltransport zwischen Plasmamembran und Lysosomen zu spielen (Holness und Simmons 1993, Ramprasad et al. 1996).

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper zur Darstellung von MHC-II-Antigenen ist gegen die Subtypen HLA-DR, -DP und -DQ gerichtet. Die Expression von MHC-II ist auf perivaskulären Zellen, ruhenden Mikroglia, und in verstärktem Ausmaß auch auf aktivierten Mikroglia beschrieben (Gehrmann et al. 1993, Hulette et al. 1992). Die Hauptfunktion von MHC-II auf Mikroglia besteht in der Antigenpräsentation im ZNS an T-Zellen und der Initiation der T-Zell-Antwort (Frei et al. 1994, Ulvestad et al. 1994).

Bei dem „allograft inflammatory factor-1“ (AIF-1), auch als mrf-1 (microglial response factor-1), iba-1 (ionized calcium binding adapter molecule-1) und Daintain bezeichnet, handelt es sich um ein kalziumbindendes Peptid. AIF-1 wird von manchen Autoren als Indikator für mikrogiale Aktivierungsvorgänge angesehen (Schluesener et al. 1998b). Andere wiederum beschreiben eine vom Aktivierungszustand unabhängige konstitutive Expression auf Mikroglia (Beschorner et al. 2000, Mittelbronn et al. 2001). In dieser Arbeit soll eine Referenz für AIF-1 im normalen Rückenmark etabliert und mit dem Expressionsmuster pathologischer Fälle verglichen werden.

CD45 auch als leukocyte common antigen (LCA) bezeichnet, steht für eine Gruppe von Oberflächenproteinen welche sich auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs finden. Auf Mikroglia wird CD45 nur in geringem Umfang exprimiert, findet sich jedoch in größerem Umfang auf Makrophagen und perivaskulären Zellen (Becher und Antel 1996, Guillemin und Brew 2004).

Prostaglandine sind wichtige Regulatoren physiologischer und entzündlicher Prozesse und werden von zwei Isoformen der Cyclooxygenase (COX-1 und -2) produziert. Die Rolle der konstitutiv exprimierten COX-1 bei pathologischen Prozessen ist bisher umstritten. Während manche Arbeitsgruppen lediglich der COX-2 eine Rolle bei pathologischen Vorgängen zuschreiben, sehen andere auch in der COX-1 eine wichtige Quelle für entzündliche Mediatoren (Deininger et al. 2003, Hoozemans et al. 2001, Maihofner et al. 2003, Schwab et al. 2000a, 2000b, 2001d). Als Hauptquelle für COX-1 im ZNS sind bei diesen Arbeiten ruhende und aktivierte Mikroglia beschrieben. Daten über die Expression von COX-1 im ZNS unter nicht pathologischen Bedingungen liegen

bisher nur im Rahmen von Kontrollgruppen vor (Schwab et al. 2002, Yermakowa et al. 1999).

Das endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP-II) wurde ursprünglich aus dem Überstand von Tumorzellen gewonnen. Neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften spielt es noch eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Apoptose (Berger et al. 2000). Die Expression von EMAP-II auf Mikroglia ist bei einer Reihe von ZNS-Erkrankungen beschrieben worden und soll nun quantitativ in nicht-reaktiv veränderten ZNS-Gewebe untersucht werden (Brabeck et al. 2002, Mueller et al. 2003a, Mueller et al. 2003b, Schluesener et al. 1997).

Das Interleukin 16 (IL-16) oder auch „leukocyte chemoattractant factor“ (LCF) hat proinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften und ist außerdem ein Ligand des CD4-Rezeptors. IL-16 kann seine Funktionen jedoch auch CD4-unabhängig ausüben. CD4 fungiert neben seiner Rolle als Rezeptor für IL-16 auch noch als Korezeptor in der MHC-II vermittelten Signaltransduktion und dient außerdem dem Hi-Virus zur Aufnahme in monozytäre Zellen und der damit verbundenen Invasion des ZNS (Kedzierska und Crowe 2002, Verani et al. 2005). CD4 findet sich im ZNS überwiegend auf perivaskulären Zellen (Perry und Gordon 1988).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Markern findet sich unter physiologischen Bedingungen keine Expression der beiden S-100 Proteine MRP-8 und MRP-14 auf ramifizierten Mikroglia (Mittelbronn et al. 2001). Unter pathologischen Bedingungen ist die Expression von MRP-8 und MRP-14 auf Mikroglia bei einer Reihe von Erkrankungen beschrieben worden. (Akiyama et al. 1994, Abe et al. 1999, Engel et al. 2000, Postler et al. 1997, Schluesener et al. 1998a). Je nach Erkrankung sind jedoch sehr unterschiedliche Verläufe der Proteinkinetik beschrieben. So kommt es bei ischämischen Erkrankungen lediglich während der ersten drei Tage zu einer Expression der MRP-Proteine auf Mikroglia (Postler et al. 1997). Bei traumatischen Erkrankungen sind die beiden MRP-Proteine erst nach drei Tagen, dann jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum auf Mikroglia nachweisbar (Engel et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit soll das Expressionsmuster der beiden Proteine im normalen und pathologisch veränderten Rückenmark untersucht werden.

Mit den oben beschriebenen Markern soll in dieser Arbeit das grundlegende mikrogliale Expressionsmuster im normalen Rückenmark definiert werden, um dadurch weitere Erkenntnisse über den Funktionszustand der Mikroglia unter nicht pathologischen Bedingungen zu gewinnen. Durch den Vergleich dieser Ergebnisse mit diversen Pathologien soll überprüft werden, inwiefern sich die gewonnenen Daten als Referenz zur Abgrenzung gegenüber pathologischen Prozessen verwenden lassen.

### 1.1.6 Verteilung im Großhirn und Rückenmark

Eines der wichtigsten Merkmale pathologischer Prozesse im ZNS ist eine Proliferation und damit Vermehrung der Mikroglia. Daher ist es von großer Bedeutung die Verteilung der Mikroglia im ZNS zu kennen. Ansonsten könnte unter Umständen eine physiologisch erhöhte Dichte mikroglialer Zellen in einem bestimmten Areal fälschlicherweise als pathologisch interpretiert werden.

Es wurde bereits in einigen Arbeiten über eine mikrogliale Heterogenität im ZNS berichtet. Die wohl bekannteste Arbeit stammt von Lawson et al. (1990), welcher die Verteilung der Mikroglia im reifen Gehirn der Maus untersuchte. Die niedrigste Mikroglia-dichte ergab sich mit circa 5 % im cerebralen Kortex und Corpus callosum, die höchste mit etwa 12 % in der Substantia nigra. Des Weiteren fanden sich in der grauen Substanz mehr Mikroglia als in der weißen Substanz. Insgesamt ergab sich eine Abnahme der Dichte von Mikroglia in Richtung des Rhombenzephalons, so dass sich die niedrigsten Werte im Kleinhirn und im Hirnstamm fanden. Die meisten dieser Arbeiten, wie auch die Arbeit von Lawson, basieren jedoch auf tierexperimentellen Daten. Mittelbronn et al. (2001) fanden in ihren Untersuchungen des humanen ZNS fundamentelle Unterschiede gegenüber den tierexperimentellen Arbeiten. So konnten sie zeigen, dass im humanen ZNS die weiße Substanz die höhere mikrogliale Dichte aufweist. Des Weiteren fanden sie eine Zunahme der Mikroglia in Richtung des Rhombenzephalon mit den höchsten Werten im Pons (circa 13,4% der Gesamtzellpopulation) und Medulla oblongata (16,6% der Gesamtzellpopulation). Die Verhältnisse beim Menschen sind damit denen der Maus diametral entgegengesetzt.

Die oben genannten Arbeiten beschäftigten sich jedoch lediglich mit der Verteilung der Mikroglia im Großhirn. Über die Verteilung im Rückenmark ist weitaus weniger bekannt. Die meisten Angaben, welche die mikrogliale Verteilung im Rückenmark ansprechen, stammen ebenfalls aus tierexperimentellen Arbeiten.

Griffin et al. beschrieben bereits 1972, dass im Rückenmark von Katzen Mikroglia 10 % aller glialen Elemente ausmachen. Im Rückenmark der Ratte machen die Mikroglia in der weißen Substanz 7 % und in der grauen Substanz 11 % der Gesamtzellpopulation aus (Ling 1976b). Amöboide Mikroglia kommen im Rückenmark von Ratten nur vereinzelt in der grauen Substanz vor (Ling 1976a). Des Weiteren findet sich im

Rückenmark von Ratten ein Anstieg von Mikroglia während der ersten beiden postnatalen Wochen, um danach wieder abzunehmen (Kaur et al. 1993). Allerdings wurde diese Abnahme der Größenzunahme zugeschrieben, die mit dem Wachstum des Rückenmarks einhergeht, und nicht einer Abnahme der absoluten Zahl an Mikroglia. In adulten Ratten fand sich die höchste mikrogliale Dichte in der weißen Substanz des Kleinhirns und im lumbalen Rückenmark (Vass und Lassmann 1990).

Im Gegensatz dazu fanden Untersuchungen des sich entwickelnden humanen Rückenmarks keine Unterschiede in der regionalen Verteilung von Mikroglia (Rezaie und Male 1999, Rezaie et al. 1999, Wierzba-Bobrowicz et al. 2001). Untersuchungen des normalen humanen, adulten Rückenmarks wurden bisher im Rahmen von kleinen Kontrollgruppen im Vergleich zu diversen pathologischen Bedingungen durchgeführt. Schmitt et al. (2000) fanden in der Kontrollgruppe ihrer Arbeit eine höhere Dichte an MCH-II<sup>+</sup> Mikroglia in der weißen Substanz, ohne diese Angaben jedoch genauer zu quantifizieren. Für die ebenfalls mit einem Antikörper gegen CD68 durchgeführten Färbungen ergaben sich keine regionalen Unterschiede.

## **1.2 Ziele der Arbeit und Fragestellung**

Die Mikroglia ist die immunologische Haupteffektorzelle im ZNS. Aktivierung und Proliferation mikroglialer Zellen gelten heutzutage als wichtigste Erkennungsmerkmale für nahezu jeden pathologischen Prozess des menschlichen ZNS. Da bis heute kein spezifischer Marker für ruhende Mikroglia etabliert ist, gelingt die Abgrenzung gegenüber pathologischen Prozessen nur über erhöhte mikrogliale Proliferationsraten, morphologische Veränderungen oder die Expression diverser Proteine. Um diese Abgrenzung mit hinreichender Sicherheit zu bewerkstelligen, ist es notwendig, die Dichte, Morphologie und die Proteinexpressionsmuster von Mikroglia im normalen ZNS zu kennen. Bis jetzt gibt es keine Arbeit, welche diese Parameter im adulten, nicht-pathologisch alterierten menschlichen Rückenmark untersucht hat.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Verteilung von Mikroglia in verschiedenen Rückenmarksregionen einer Normalpopulation zu evaluieren, sowie ein erstes grundlegendes Proteinexpressionsmuster zu etablieren. Der Vergleich mit diversen Pathologien soll darüber hinaus überprüfen, inwiefern sich diese Daten zur Abgrenzung von pathologischen Prozessen eignen.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patientendaten**

#### **2.1.1 Normalrückenmark**

Bei den für diese Arbeit verwendeten Rückenmarksgeweben der Normalgruppe ergaben sowohl die makroskopischen, als auch die histologischen neuropathologischen Untersuchungen (inklusive immunhistochemischer Untersuchungen) keinen Anhalt für eine pathologische Veränderung oder eine Beteiligung des Rückenmarks. Bei Patienten mit einem anamnestisch bekannten Trauma wurden exemplarisch Färbungen mit  $\beta$ -APP und Neurofilament durchgeführt, um mögliche frühe pathologische, mit konventionellen histologischen Methoden nicht nachweisbare Veränderungen des Rückenmarks auszuschliessen. Um eine Beteiligung des ZNS im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen und Neoplasien auszuschliessen, wurden Färbungen mit dem Proliferationsmarker MIB-1 durchgeführt, der gegen das proliferationsassoziierte Antigen Ki-67 gerichtet ist. Des weiteren wurden alle Patienten mit neurologischer Symptomatik ausgeschlossen, mit Ausnahme eines Patienten, der eine Rekurrensparese durch eine Tumordinfiltration aufwies (Fall 7, Tabelle1). Da diese jedoch keine neurodegenerativen Veränderungen in den untersuchten Rückenmarksabschnitten induziert, wurde der Patient nicht von der Normalpopulation ausgeschlossen. Leichte terminale hypoxische Schädigungen wurden im Rahmen der im Verlauf des Todes eintretenden Ereignisse als physiologisch auftretende Prozesse gewertet, und führten nicht zum Ausschluß der Patienten aus der Gruppe der Normalfälle. Einen Überblick über die klinischen Daten gibt Tabelle 1.

### **2.1.2 Pathologisches Rückenmark**

Die pathologischen Fälle enthalten ein breites Spektrum an Erkrankungen, unter anderem entzündliche, neoplastische, metabolische, vaskuläre, traumatische und degenerative Erkrankungen (siehe Tabelle 2). Dadurch konnten mehrere unterschiedliche Krankheitsbilder untersucht und mit der Normalpopulation verglichen werden. Die Diagnosen wurden im Rahmen der umfassenden neuropathologischen Diagnostik gestellt, unter Einbezug aller Aspekte der Makroskopie, Histologie und der klinischen Daten.



### 2.1.3 Klinische Daten

Tabelle 1: Patienten mit neuropathologisch nicht verändertem Rückenmark

Fall	Alter	Geschlecht	Erkrankungen	Todesursache
1	42	W	Keine	Hämorrhagischer Schock nach Verkehrsunfall
2	25	M	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie; Kardiomyopathie	Rechtsherzinsuffizienz
3	38	M	„Cancer of unknown primary“ mit multiplen Metastasen	Leberversagen
4	67	M	Depressives Syndrom; Substanzenabusus	Suizid durch Kopfschuss
5	19	M	Keine	Schweres Schädel-Hirn-Trauma nach Verkehrsunfall
6	59	M	Metastasierendes Bronchialkarzinom; Hypopharynxkarzinom; Pankreatitis	Multiorganversagen bei dekompensiertem Cor pulmonale durch Bronchopneumonie und Lungenfiliae
7	67	M	Metastasierendes Bronchialkarzinom; Rekurrenzparese; Lugenembolie bei tiefer Beinvenenthrombose	Herz-Kreislaufversagen
8	69	W	Diabetes; Pneumonie	Septischer Schock; Coma diabeticum
9	77	W	Oesophagusperforation; Peritonitis; Pleuritis	Septischer Schock mit Multiorganversagen
10	71	M	Arterielle Hypertonie; Nikotinabusus	kardiogener Schock durch Hinterwandinfarkt mit Mitralklappenabriß

Tabelle 2: Pathologische Fälle

Fall	Alter	Geschlecht	ZNS-Pathologien	Sonstige Erkrankungen
11	34	M	Multiple Sklerose (Schilder-Typ)	Diabetes mellitus Typ 1; rezidivierende urogenitale und pulmonale Infekte
12	56	F	Multiple ältere Infarkte in Großhirn, Kleinhirn und Basalganglien	Hochgradige Arteriosklerose; chronische Endokarditis; Aspirationspneumonie
13	59	M	Vaskuläre Myelopathie; Einblutung Pyramidenbahn und Vorderhörner	Metastasierendes Oesophaguskarzinom; Ulkus ventrikuli; Arteriosklerose; Koronare Herzerkrankung; Alkohol- und Nikotinabusus; Pneumonie
14	67	F	Amyotrophe Lateralsklerose	Bronchopneumonie; Lungenödem
15	56	M	Guillain-Barré-Syndrom	allergischer Schock nach Immunabstraktion mit: Nierenversagen, Rhabdomyolyse, Hämolyse; Thrombose Vena jugularis rechts
16	71	F	Sepsis nach bakterieller Meningitis; Kleinhirnininfarkt durch septische Embolie; Sinusvenenthrombose	Sepsis; Mastoiditis; Vorhofflimmern; Mitralklappeninsuffizienz
17	43	F	Plasmozytom mit intrakranieller, ossärer und dermaler Ansiedelung; Meralgia paraesthetica	Metabolisches Syndrom
18	66	M	Subarachnoidalblutung; rezidivierende Krampfanfälle; progrediente Hemiparese links	Koronare Herzerkrankung; periphere arterielle Verschlusskrankheit Grad II
19	58	M	Adulter Morbus Alexander; Chronische neurogene Muskelatrophie	Chronische Pankreatitis; Herzinsuffizienz; arterielle Hypertonie; Cholezystolithiasis
20	76	F	Cerebrale Mikroangiopathie; höhergradige Arteriosklerose der Arteria basilaris	Koronare Herzerkrankung; chronisch ulzerierende Cholezystitis; Fieber unklarer Genese; Kardiomegalie
21	77	F	Meningitis durch septische Streuung einer Unterschenkelphlegmone	Unterschenkelphlegmone; septischer Schock; Diabetes mellitus Typ II; Leberzirrhose; Abszess linker Lungenunterlappen
22	78	F	Symptomatische Epilepsie seit Operation einer frontalen Zyste (1967); Liquorshunt hypoxische Enzephalopathie	Aspirationspneumonie; Zustand nach Reanimation
23	61	M	Amyotrophe Lateralsklerose	Koronare Herzerkrankung; Refluxoesophagitis; benigne Prostatahyperplasie; Misere und Teerstuhl
24	87	F	Infarkt im linken Putamen (Stadium II)	„cancer of unknown primary“ mit pulmonalen Filiae; Chronisch obstruktive Atemwegserkrankung; arterielle Hypertonie; multiple Nierenzysten
25	55	M	Cephalgien mit unklaren Synkopen; Alzheimer Typ II Glia; entz. Durainfiltrate	Oropharynxkarzinom; Darmulzeration; Destruierender Prozess Halswirbelkörper 1

## **2.2 Standardisierung der untersuchten Regionen**

Um die Verteilung der Mikroglia hinsichtlich der Höhenlokalisation zu untersuchen, erfolgte die Entnahme von Gewebeproben aus dem oberen und unteren Cervikal- und Lumbalmark, dem oberen, mittleren und unteren Thorakalmark, sowie dem Sakralmark. Die Höhenzuordnung erfolgte anhand der Austrittsstellen der Spinalnerven aus dem Rückenmark (siehe Abbildung 1). Des Weiteren erfolgte eine Untergliederung der einzelnen Höhen in die Graue und Weiße Substanz. Zur Auswertung wurden in der Weißen Substanz zusätzlich die Vorder-, Seiten- und Hintersäule getrennt ausgewertet. In der Grauen Substanz wurde das Gebiet um den Zentralkanal als gesonderte Region untersucht (siehe Abbildung 2). An den jeweiligen Höhen wurden somit jeweils die Vordersäule, Seitensäule, Hintersäule, Graue Substanz und das Gebiet um den Zentralkanal untersucht. Diese Unterteilung erfolgte, um das Rückenmark hinsichtlich bestimmter Kerngebiete und funktioneller Bahnsysteme untersuchen zu können.

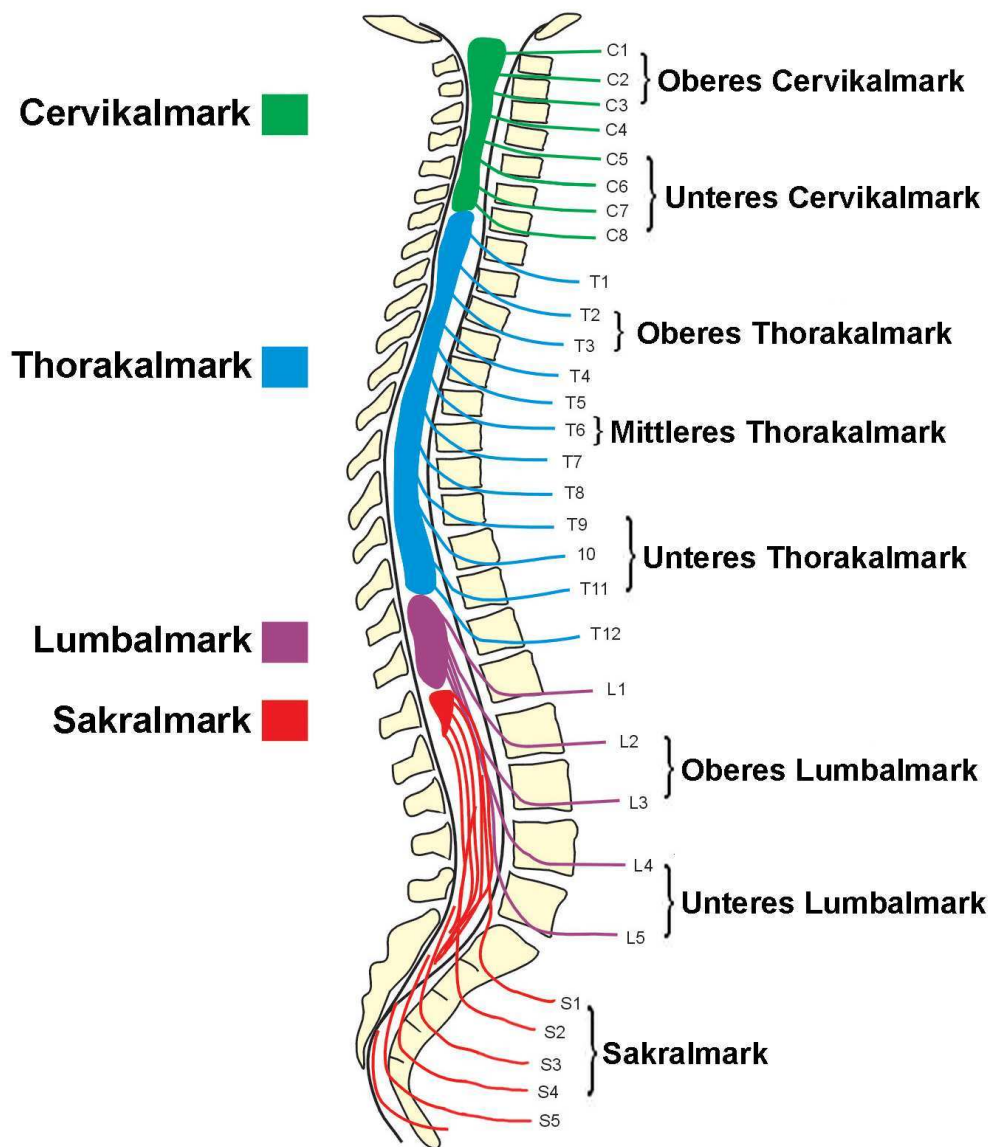


Abbildung 1: Untersuchte Höhen (die geschweifte Klammern kennzeichnen den Bereich, aus welchem jeweils eine Gewebeprobe entnommen wurde)

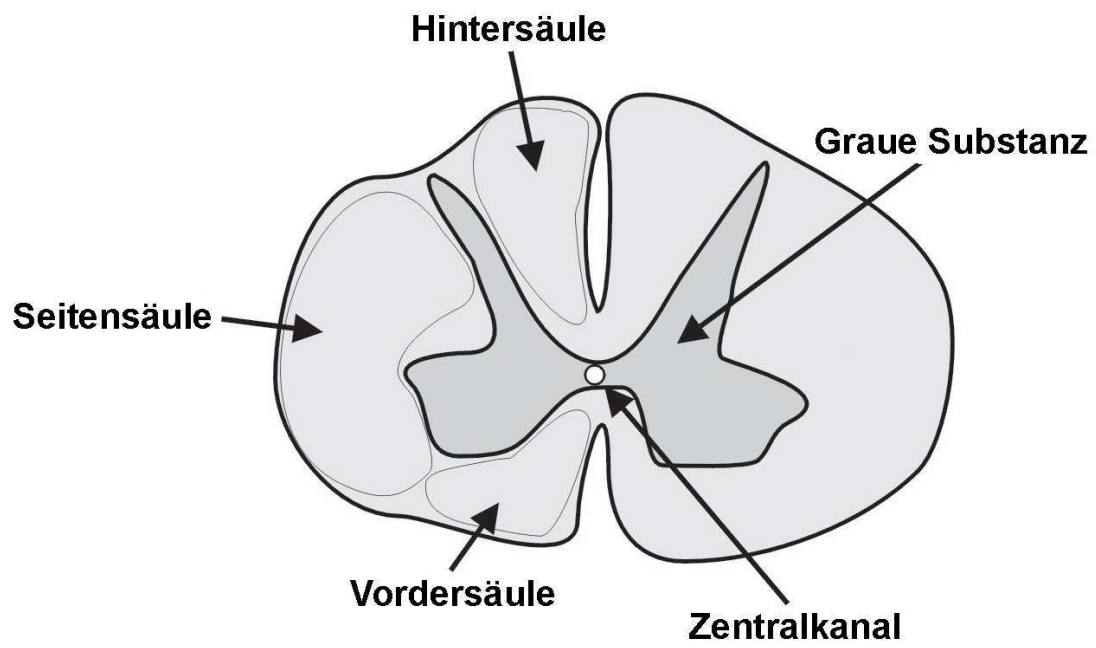


Abbildung 2 : Untersuchte Regionen

## **2.3 Herstellung der histologischen Präparate**

Das entnommene Rückenmarksgewebe wurde in 4%-igem Formalin in phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,4) fixiert. Danach erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Chloroform, sowie die Einbettung in Paraffin. Anschließend wurden von den Paraffinblöcken ca. 3µm dicke Schnitte an einem Mikrotom (Leica 2040, Bensheim, Germany) angefertigt, welche dann auf Silanbeschichtete Objektträger aufgezogen wurden.

Um die Schnitte für immunhistochemische Untersuchungen vorzubereiten, erfolgte zunächst die Entparaffinierung in Chloroform (3 x 10 min.). Danach wurde die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70%, destilliertes Wasser, jeweils 2 min.) durchgeführt.

## **2.4 Immunhistochemie**

### **2.4.1 Auswahl der Antikörper**

#### **2.4.1.1 AIF-1**

Der AIF-1 (allograft inflammatory factor-1) wurde ursprünglich aus transplantierten Rattenherzen mit chronischen Abstossungsreaktionen gewonnen. Es handelt sich um ein durch Interferon-gamma induzierbares, 17-kDa schweres, Ca<sup>2+</sup>-bindendes EF (edema-factor)-Hand Protein, dessen Gen auf Chromosom 6 liegt (Utans et al. 1995). AIF-1 teilt weitgehend identische Aminosäuresequenzen mit 3 weiteren Proteinen: IBA-1 (ionized calcium binding adapter molecule), MRF-1 (microglial response factor-1) und Daintain (Deininger et al. 2002). Im normalen ZNS wird AIF-1 konstitutiv von Mikroglia exprimiert (Mittelbronn et al. 2001). Eine Hochregulation findet sich bei verschiedenen inflammatorischen, traumatischen und ischämischen Schädigungen des ZNS (Postler et al. 2000, Schluesener et al. 1998b, Schwab et al. 2001a). Der in der Arbeit verwandte Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Schluesener, Institut für Hirnforschung, Tübingen, zur Verfügung gestellt und stammt von der Firma BMA, Augst, Schweiz (Klon 1022-5).

#### **2.4.1.2 CD4**

CD4 ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 59 kDa, welches sich vor allem auf T-Helfer-Zellen findet. Es findet sich jedoch auch auf Mikroglia, Makrophagen, Monozyten und perivaskulären Zellen des ZNS (Perry und Gordon 1987). CD4 agiert als Ko-Rezeptor in der MHC-II gebundenen Aktivierung von T-Zellen (Sakihama et al. 1995). Des weiteren ist es ein Rezeptor für IL-16 und spielt eine Rolle bei der Infektion mit HI-Retroviren (Center et al. 1996, Kwong et al. 1998). Der Antikörper stammt aus dem Klon 1F6 der Firma Novocastra, Newcastle, England.

#### **2.4.1.3 COX-1**

Eikosanoide (Prostaglandine, Thromboxane und Prostacycline) entstehen durch die Prostaglandin-H-Synthase unter Mitwirkung der Cyclooxygenasen (COX) und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler Körperfunktionen (Dubois et al. 1998, Smith et al. 1996, Williams et al. 1999). Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Eikosanoid-Synthese. Von den Cyclooxygenasen gibt es mehrere Isoformen, wobei COX-1 konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert wird. COX-1 ist verantwortlich für die Produktion von Prostaglandinen mit homeostatischen Funktionen wie z.B. der Erhaltung der Integrität der Magenschleimhaut, der Differenzierung von neuronalen, monozytären und Stammzellen, der Regulation der Thrombozytenfunktion und des renalen Blutflusses (Crofford 1997, Hoff et al. 1993, Kaplan et al. 1997, Shillabeer et al. 1998). Neben diesen physiologischen Funktionen spielt COX-1 aber auch eine Rolle in ischämischen, traumatischen, entzündlichen, neoplastischen und degenerativen ZNS-Erkrankungen (Deininger und Schluesener 1999, Deininger et al. 2000a, Schwab et al. 2000a, Schwab et al. 2000b, Yermakova et al. 1999). Der polyklonale Antikörper (sc-1752) wurde von der Firma Santa Cruz, Heidelberg bezogen.

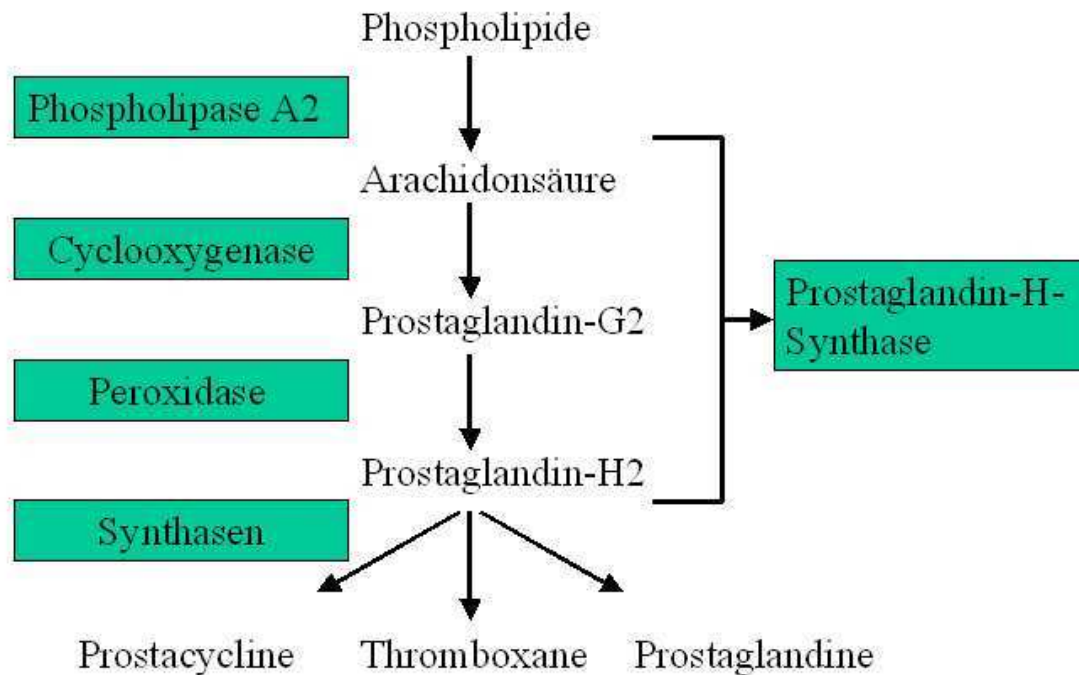


Abbildung 3: Eikosanoid-Synthese

#### 2.4.1.4 CD68 / PG-M1

CD68 ist ein 110 kDa schweres transmembranöses Glykoprotein, welches vor allem als Marker von Monozyten, Makrophagen und Mikroglia verwendet wird. Es findet sich jedoch auch auf dendritischen Zellen, Granulozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten (Hameed et al. 1994, Hulette et al. 1992, Strobl et al. 1995, Ulvestad et al. 1994). CD68 ist zum größten Teil in Lysosomen lokalisiert, zu einem geringeren Teil findet es sich jedoch auch auf der Zelloberfläche und gehört zur Familie der lamp (lysosomal-associated membrane glycoproteins) -Proteine, welche eine Rolle beim Vesikeltransport zwischen Plasmamembran und Lysosomen spielen (Holness und Simmons 1993, Ramprasad et al. 1996). Des Weiteren gibt es Hinweise, daß CD68 einen Rezeptor für oxidierte LDLs darstellt, und damit eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen könnte (van der Kooij et al. 1997). Der Antikörper stammt aus dem Klon KP-1 (Dako, Hamburg).

Bei PG-M1 handelt es sich ebenfalls um einen Antikörper gegen CD68, welcher durch Immunisierung von Mäusen mit Milz-Zellen aus einem Patienten mit Morbus Gaucher gewonnen wurde. Dieser Antikörper detektiert ein fixativresistentes Epitop der



Makrophagen-restringierten Form des CD68-Antigens. Im Gegensatz zu anderen CD68-Antikörpern welche sowohl mit Makrophagen als auch mit unreiferen, myeloischen Zellen reagieren, detektiert dieser Antikörper überwiegend Zellen der monozytären Zellfamilie (Falini et al. 1993, Groisman et al. 2002). Der Antikörper stammt aus dem Klon PG-M1 der Firma Dako (Hamburg).

#### **2.4.1.5 EMAP-II**

EMAP-II (endothelial monocyte-activating polypeptide II) wurde ursprünglich aus dem Überstand von Tumorzellen gewonnen und entsteht bei Apoptose durch Caspase-vermittelte Abspaltung aus der p43-Komponente des Multisynthetase-Komplexes, bei welchem es sich um einen Komplex bestehend aus 9 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und den Kofaktoren p43, p38 und p14 handelt (Shalak et al. 2001, Quevillon et al. 1997). EMAP-II bewirkt in Neutrophilen eine Produktion von Peroxidase, in Monozyten eine Induktion von TNF- $\alpha$  und in Endothelzellen eine Induktion von von Willebrand-Faktor und eine Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin. Des weiteren wirkt es chemotaktisch auf Monozyten und Neutrophile. In Tumorzellen induziert es eine erhöhte Sensitivität für TNF- $\alpha$  und hat außerdem eine proapoptische Wirkung auf Lymphozyten (Kao et al. 1994, Murray et al. 2004, Yamamoto et al. 2000). Die Expression von EMAP-II durch Mikroglia wurde bei entzündlichen, toxischen und traumatischen Schädigungen des ZNS beschrieben (Brabeck et al. 2002, Mueller et al. 2003a, Mueller et al. 2003b, Schluesener et al. 1997). Es wurde der Antikörper des Klons 546-2 (BMA, Augst, Schweiz) verwendet.

#### **2.4.1.6 CD45 (LCA)**

CD45 (Synonym: LCA – leukocyte common antigen) ist ein membranständiges Glykoprotein mit Tyrosin-Phosphatase-Aktivität, welches sich auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs findet (Shah et al. 1998). Es sind 5 Isoformen zwischen 180 und 240 kDa bekannt, welche durch alternatives Splicing des auf Chromosom 1 liegenden Gens entstehen. Durch seine Tyrosin-Phosphatase-Aktivität spielt es eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Aktivierung von immunologischen Zellen (Alexander 2000, Kishihara et al. 1993, Trowbridge und Thomas 1994). Des weiteren besitzt CD45 noch die Eigenschaften der Inhibition von JAK (Janus kinase) Kinasen,

welche an der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren beteiligt sind (Irie-Sasaki et al. 2001). Punktmutationen des CD45-Gens sind möglicherweise an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose und des systemischen Lupus erythematoses beteiligt (Jacobsen et al. 2000, Schwinzer et al. 2003). Das verwendete Antikörpergemisch der Firma Dako, Hamburg enthält zwei Antikörper (Klon PD7/26 und Klon 2B11) gegen das LCA und erkennt alle fünf Isoformen.

#### **2.4.1.7 IL-16 (LCF)**

Interleukin 16 (IL-16; Synonym: LCF – leukocyte chemoattractant factor) ist ein proinflammatorisches Zytokin welches von Epithelzellen, Mastzellen, Fibroblasten, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia sezerniert wird (Center et al. 1997, Schluesener et al. 1996). IL-16 ist ein Ligand für den CD4-Rezeptor und hat neben seinen chemotaktischen Eigenschaften proinflammatorische Effekte durch Produktion von Zytokinen und Induktion der Expression von HLA-DR und des IL2-Rezeptors (Cruikshank et al. 1987, Mathy et al. 2000). Außerdem bewirkt IL-16 eine Inhibition der T-Zell-Rezeptor/CD3 abhängigen Aktivierung und eine Suppression der HIV-1-Transkription (Baier et al. 1995, Cruikshank et al. 1996, Theodore et al. 1996). Die Beteiligung von IL-16 konnte bei einer großen Zahl von entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden (Cruikshank et al. 2000). Die Expression von IL-16 durch Mikroglia spielt ebenfalls eine Rolle bei entzündlichen und degenerativen Erkrankungen des ZNS (Guo et al. 2004, Schluesener et al. 1996). Der Antikörper stammt aus dem Klon G11/II der Firma BMA, Augst, Schweiz.

#### **2.4.1.8 MHC-II (HLA-DR;-DP;-DQ)**

Das HLA-System ist komplexes, autosomal-kodominant erbliches System von Histokompatibilitätsantigenen des Menschen, welche auf der Oberfläche fast aller Zellen vorkommen und damit eine zentrale Rolle in der Immunabwehr spielen. Die Gewebsantigene werden vom major histocompatibility complex (MHC) kodiert, welcher auf dem kleinen Arm von Chromosom 6 lokalisiert ist. MHC-Klasse-II-Moleküle werden von den Genlokalisationen HLA-DR, -DP und -DQ kodiert, gegen welche auch der benutzte Antikörper aus dem Klon CR3/43 (Dako, Hamburg) gerichtet ist (Forsum et al. 1985). Die Hauptfunktion von MHC-II besteht in der

Antigenpräsentation an T-Zellen. MHC-II findet sich vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und Mikroglia. Des Weiteren sind bestimmte MHC-Klasse-II-Antigene mit zahlreichen Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Bechterew (HLA-B27) und der Rheumatoiden Arthritis (HLA-DR4) assoziiert (Powis und Trowsdale 1991). Die MHC-II-Expression ist auf ruhenden und aktivierten Mikroglia beschrieben worden (Gehrmann et al. 1993, Mittelbronn et al. 2001).

#### **2.4.1.9 MRP-8 / MRP-14**

MRP-8 (S100A8) und MRP-14 (S100A9) gehören beide zur Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden S100-Proteine. Sie werden vor allem von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in akuten entzündlichen Läsionen exprimiert. Die beiden Proteine kommen sowohl als Monomere wie auch als Homo- und Heterodimere vor (Hunter und Chazin 1998, Nacken et al. 2003). Der MRP-8/-14 Heterokomplex ist auch bekannt als Calprotectin oder L1-Protein. Calprotectin spielt eine Rolle im Arachidonsäurestoffwechsel und ist ein potentes Chemotaxin für Neutrophile und Monozyten (Klempt et al. 1997, Ryckman et al. 2003). Eine Expression von MRP-8 und MRP-14 auf Mikroglia wurde bei entzündlichen Veränderungen, Ischämien und Traumata des ZNS beschrieben. Unter physiologischen Bedingungen findet sich keine Expression in parenchymalen Zellen des ZNS (Abe et al. 1999, Beschorner et al. 2000, Mittelbronn et al. 2001, Postler et al. 1997, Schluesener et al. 1998a). Es wurden Antikörper der Firma BMA, Augst, Schweiz (MRP-8: Klon 8-5C2, MRP-14: Klon S36.48) verwendet.

#### **2.4.2 Antikörper zum Ausschluss pathologischer Alterationen**

Die Antikörper gegen die nachfolgenden Antigene wurden zusätzlich zum Ausschluss diskreter, histologisch nicht nachweisbarer traumatischer, inflammatorischer und proliferativer Veränderungen eingesetzt.

##### **2.4.2.1 $\beta$ -APP**

$\beta$ -APP ( $\beta$ -Amyloid Precursor Protein) ist ein in Neuronen vorkommendes Protein, welches einem schnellen anterograden axonalen Transport unterliegt. Eine Unterbrechung der axonalen Transportfähigkeit führt zu einer Akkumulation des

Protein, welches dann immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Dadurch hat sich  $\beta$ -APP als hervorragender Marker für axonale Schädigungen erwiesen. Dabei spielt es keine Rolle, auf welche Art diese Schädigung erfolgt, und es kann bei ischämischen, entzündlichen, traumatischen, metabolischen und degenerativen Schädigungen eines Axons nachgewiesen werden (Dolinak et al. 2000, Ferguson et al. 1997, Gentleman et al. 1993, Mankowski et al. 2002, Oehmichen et al. 1999, Reichard et al. 2003).  $\beta$ -APP kann bereits drei Stunden nach dem schädigenden Ereignis detektiert werden (Geddes et al. 2000, Sherriff et al. 1994). Außerdem findet sich eine Akkumulation in senilen Plaques von Patienten mit demenzieller Entwicklung (Arai et al. 1991). Es wurde der Antikörper (Klon 22C11) der Firma Chemicon, Temecula, USA benutzt.

#### **2.4.2.2 Neurofilament**

Neurofilamente sind Bestandteile des neuronalen Zytoskeletts. Sie bestehen aus drei Untereinheiten (NF-L, NF-M und NF-H) welche vom Nervenzellkörper in das Axon transportiert werden. Dort bildet NF-L dann Heterodimere mit NF-M oder NF-H und formt dadurch die endgültigen Filamente. Akkumulationen von Neurofilamenten finden sich bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, welche möglicherweise durch eine Störung des axonalen Transports verursacht werden (Julien und Mushynski 1998, Miller et al. 2002). Des weiteren detektieren Antikörper gegen Neurofilament auch geschädigte Axone bei traumatischen Schädigungen des ZNS (Chen et al. 1999, Grady et al. 1993, Meller et al. 1993). Der Antikörper stammt von der Firma Dako, Hamburg (Klon 2F11).

#### **2.4.2.3 Ki-67**

Ki-67 ist ein Kernprotein, welches sich nur in proliferierenden Zellen findet (Gerdes et al. 1983). Dadurch eignet es sich hervorragend zur Identifizierung von sich teilenden Zellen bei neoplastischen und entzündlichen Alterationen, und ist ein wichtiger Marker hinsichtlich der Prognose bei einer Reihe von Tumorerkrankungen (Brown und Gatter 2002, Kim et al. 2001, McKeever 1998). Der verwendete Antikörper des Klons MIB-1 ermöglichte erstmals die Detektion von Ki-67 in Paraffin-fixiertem Gewebe, und wurde von der Firma Dako, Hamburg bezogen (Cattoretti et al. 1992).

### **2.4.3 Antikörper zur Darstellung von Astrozyten**

In einigen Arbeiten wurde eine MHC-II-Expression auf reaktiven Astrozyten beschrieben, welche sich im ZNS ansonsten überwiegend auf Mikroglia bzw. Makrophagen findet (Zeinstra et al. 2000). Da sich zwischen Astrozyten und Mikroglia teilweise morphologische Ähnlichkeiten finden, wurden exemplarisch Doppelfärbungen mit mikroglialen Markern (MHC-II, CD68) und einem Antikörper gegen das saure gliale Faserprotein (GFAP – glial fibrillary acidic protein) welcher von der Firma Chemicon International, Temecula, USA stammt, durchgeführt.

### **2.4.4 Lektin histochemie mit RCA-1**

RCA-1 (Ricinus Communis Agglutinin-1) gehört zur Familie der Lektine. Lektine sind Glykoproteine welche spezifisch an membranständige Zuckerreste binden. RCA-1 bindet spezifisch an den Zuckerrest  $\beta$ -D-Galaktosyl, welcher sich auf Mikroglia, Makrophagen und Endothel befindet. Des weiteren sind Reaktionen mit reaktiven Astrozyten beschrieben worden (Hulette et al. 1992, Mannoji et al. 1986). Das in dieser Arbeit verwendete Lektin stammt von der Firma Vector, Burlingame, USA.

### **2.4.5 Vorbehandlung, Immunhistochemie und Lektin histochemie**

Zur Freilegung der Antigene erfolgte falls nötig eine Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle in Zitratpuffer (pH 6,0; 5 x 5 min bei 750 Watt). Die endogene Peroxidase wurde mit 1% Wasserstoffperoxid in Methanol blockiert (15 min.). Zur Verhinderung von unspezifischen Antikörperbindungen wurde das Gewebe für fünfzehn Minuten in mit 1:10 mit TBS (tris-buffered saline) verdünntem Schweineserum inkubiert. Die Schnitte wurden dann jeweils mit dem in TBS-Lösung verdünnten Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 3) für eine Stunde inkubiert. Nach dem Spülen mit TBS-Puffer erfolgte dann für 30 Minuten die Inkubation mit biotinylierten anti-Maus F(ab')<sub>2</sub> bzw. anti-Hase F(ab')<sub>2</sub>-Brückenantikörper, entsprechend der Klonalität des Primärantikörpers. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (ABC, DAKO, Deisenhofen) für 30 Minuten. Dem anschließenden Waschvorgang folgte die Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma) als Chromogen, um spezifische Antigenbindung sichtbar zu machen. Zur Sichtbarmachung der Zellkerne erfolgte bei allen Schnitten die

Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie Xylol dehydriert und anschliessend mit einem Deckglas versehen. Zur Überprüfung der Spezifität der Methode wurden bei den Färbungen Positivkontrollen (Milz, Tonsille, Lymphknoten) mitgeführt. Die Negativkontrolle erfolgte durch Ersatz des primären Antikörpers mit TBS-Pufferlösung. Bei der Lectinhistochemie wurde analog zur Immunhistochemie vorgegangen. Bei dieser Methode erübrigt sich jedoch die Vorbehandlung mit Schweineserum und der Mikrowelle. Des weiteren wird kein Brückenantikörper benötigt, so daß gleich nach der Lektininkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex fortgefahren werden kann. RCA-1 wurde in einer Verdünnung von 1:5000 angewendet.

Antikörper gegen	Verdünnung	Spezifität	Vorbehandlung	Positivkontrollen
<b>AIF-1</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille
<b>CD4</b>	1:20	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille
<b>COX-1</b>	1:200	Polyklonal	Mikrowelle	Tonsille
<b>CD68</b>	1:150	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille, Milz, Lymphknoten
<b>EMAP-II</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille, Milz (Ratte)
<b>CD45 (LCA)</b>	1:100	Monoklonal	Keine	Milz
<b>IL-16 (LCF)</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille, Lymphknoten
<b>MHC-II</b>	1:50	Monoklonal	Mikrowelle	Lymphknoten
<b>MRP-8</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille
<b>MRP-14</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille
<b>PG-M1</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Tonsille, Milz, Lymphknoten
<b>β-APP</b>	1:50	Monoklonal	Mikrowelle	Morbus Alzheimer
<b>Neurofilament</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Multiinfarkt-Demenz
<b>Ki-67</b>	1:100	Monoklonal	Mikrowelle	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
<b>GFAP</b>	1:500	Polyklonal	Keine	Gliom

Tabelle 3: Verdünnung, Spezifität, Vorbehandlung und Positivkontrollen der Antikörper

#### **2.4.6 Doppelfärbungen zur Überprüfung der Selektivität**

Um nicht selektive Anfärbung von Mikroglia zu überprüfen, wurden stichprobenartig Doppelfärbungen durchgeführt. Hierzu wurden, wie bei der ABC-Methode bereits beschrieben, die Vorbehandlungen durchgeführt, und der erste monoklonale Primär- sowie der Brückenantikörper appliziert. Anstelle des Peroxidase-gekoppelten AB-Komplexes wurde jedoch ein AP-Komplex (Alkalische Phosphatase, Dako) und Fast Blue BB Salz (Sigma, Deisenhofen) als Chromogen verwendet. Nun erfolgten erneut die Vorbehandlungen, ohne jedoch das Blockieren der endogenen Peroxidase zu wiederholen. Danach wurde mit dem zweiten monoklonalen Primärantikörper, wie bereits beschrieben, die ABC-Methode mit DAB als Chromogen durchgeführt. Bei den Doppelfärbungen wurde keine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt, und die Schnitte wurden anschließend mit Hilfe des wasserlöslichen Eindeckmittels Immumount (Shandon, Pittsburgh, USA) mit einem Deckglas versehen.

#### **2.4.7 Isotypenkontrolle**

Um eine unspezifische Bindung der verwendeten monoklonalen Antikörper auszuschließen, wurden mit den entsprechenden Antikörper-Subtypen Isotypenkontrollen durchgeführt. Hierzu wurde ein monoklonaler Antikörper gegen ein Antigen des *Aspergillus niger* (Dako, Hamburg) verwandt, welches in menschlichem Gewebe nicht vorkommt. Diese Kontrolle erfolgte für die Subtypen IgG1 (MHC-II, CD68, MRP-8, MRP-14, IL-16) und IgG2b (AIF-1). Zu diesem Zweck wurde die bereits beschriebene ABC-Methode durchgeführt, und der jeweilige Primär-Antikörper durch den Isotyp-Antikörper in entsprechender Immunglobulinkonzentration ersetzt.

#### **2.5 Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung**

Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop Modell BX50 der Firma Olympus (Hamburg, Deutschland). Mit Hilfe eines Zählokulars wurde in jeweils 10 Feldern von 0,25 mm Seitenlänge in allen Rückenmarksregionen der prozentuale Anteil der Mikroglia an der Gesamtzellpopulation bestimmt. Im Gebiet des Zentralkanal wurden, aufgrund der kleinen Fläche die dieses Gebiet einnimmt, jeweils nur 4 Felder von 0,25 mm Seitenlänge ausgewertet. Bei den Normalfällen wurden nur positiv gefärbte Zellen, die einen deutlich sichtbaren Zellkern und die ramifizierte Erscheinungsform der

Mikroglia aufwiesen, gewertet. Bei den pathologischen Fällen wurden sowohl ramifizierte als auch aktivierte Mikroglia, die sich positiv anfärbten und einen Zellkern aufwiesen, in die Bewertung aufgenommen. Zellen in Blutgefäßen und positiv gefärbte Strukturen, die nicht eindeutig einem Zellkern zuzuordnen waren, wurden nicht gewertet. Der prozentuale Wert wurde gewählt, um fixationsbedingte Schrumpfungsartefakte und Artefakte, die durch unterschiedliche Schnittdicke, aufgrund unterschiedlicher Erwärmung der Blöcke entstehen, zu vermeiden. Des Weiteren ist durch die prozentuale Auswertung eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien gegeben, welche ähnliche Auswertungsverfahren verwenden.

## **2.6 Statistische Methoden**

Die Werte der Anteile von positiven Zellen am Gesamtzellanteil wurden vor Durchführung einer Varianzanalyse (ANOVA) mittels der Arcussinuswurzelfunktion transformiert. Als feste Faktoren wurden wechselweise Antikörper oder Region, als zufälliger Faktor der individuelle Fall gewählt. Post-hoc Analysen wurden mit Hilfe des Tukey HSD Tests auf einem globalen alpha-Niveau von 5% durchgeführt. Anschliessend wurden durch Rücktransformation die Mittelwerte sowie die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle bestimmt. Referenzintervalle wurden durch Rücktransformation der arcussinuswurzeltransformierten Mittelwerte ( $\pm 1,96$ -facher Standardabweichung) auf der Basis einer aus 10 Individuen bestehenden Kontrollgruppe berechnet.



### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung**

##### **3.1.1 Ausschluss pathologischer Alterationen**

Die bei den Normalfällen mit den Antikörpern gegen  $\beta$ -APP und Neurofilament durchgeführten Färbungen zeigten in keinem der untersuchten Fälle ein pathologisches Expressionsmuster. Dadurch konnten axonale Schädigungen durch ischämische, entzündliche, traumatische, metabolische und degenerative Erkrankungen ausgeschlossen werden.

Des weiteren zeigte sich bei diesen Fälle keine Expression des Ki-67 Kernproteins, wodurch klinische sowie in der neuropathologischen Routinediagnostik nicht miterfasste inflammatorische und neoplastische Erkrankungen ebenfalls ausgeschlossen werden konnten.

##### **3.1.2 Statistisch nicht ausgewertete Antikörper**

Der Antikörper PG-M1 detektiert ein anderes Epitop des CD68-Antigens wie der in der Arbeit verwendete Antikörper des Klons KP-1. Da sich keine relevanten Unterschiede von PG-M1 gegenüber dem KP-1-Antikörper ergaben, wurde auf eine Auswertung verzichtet.

Die Antikörper gegen COX-1 und CD45, sowie das Lektin RCA-1 zeigten sich nicht ausreichend mikroglia-spezifisch, so dass für beide keine statistische Auswertung vorgenommen wurde.

Mit dem verwendeten Antikörper gegen EMAP-II gelang eine positive Farbreaktion nur in von der Ratte stammenden Gewebe, nicht jedoch in humanen Gewebe.

Trotz der Überprüfung des Erfolges der durchgeführten Färbungen durch Positivkontrollen gelang keine Darstellung CD4-positiver Zellen im humanen Rückenmark.

### 3.1.3 Von ruhender Mikroglia nicht exprimierte Proteine

Bei den Normalfällen zeigte sich keine parenchymale oder perivaskuläre Expression von MRP-8 und MRP-14. Lediglich in den Blutgefäßen zeigte sich eine kräftige Anfärbung von Zellen der myelomonozytären Zellreihe (Abbildung 1). Dies entspricht einem Normalbefund, da sich in oben genannter Zellreihe physiologischerweise eine Expression der beiden Proteine stattfindet.

Bei den pathologischen Fällen zeigte sich ein entsprechendes Bild, mit Ausnahme zweier Fälle (Fall 19 und 21), in denen sich vereinzelt eine schwache Expression von MRP-8 und MRR-14 auf parenchymatösen Mikroglia nachweisen ließ.

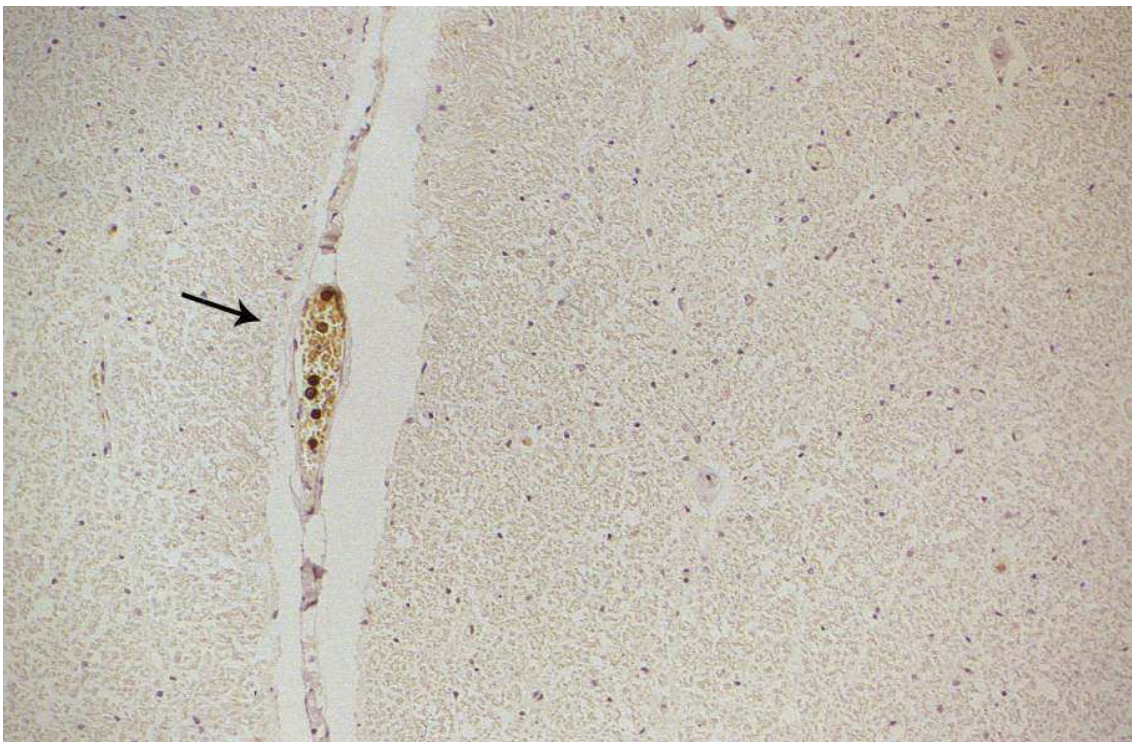


Abbildung 4: MRP-8 in der weißen Substanz des Rückenmarks (200-fache Vergrößerung im Original) Man erkennt eine kräftige Anfärbung von Zellen der myelomonozytären Zellreihe in den Blutgefäßen (schwarzer Pfeil), welche sich im Parenchym nicht nachweisen lassen.

### 3.1.4 Ergebnisse der Doppelfärbungen

Da in einigen Arbeiten eine Expression von MHC-II auf Astrozyten beschrieben ist, und um Verwechslungen aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten zwischen Mikroglia und Astrozyten zu vermeiden, wurden Doppelfärbungen gegen GFAP und MHC-II, sowie gegen GFAP und CD68 durchgeführt. Bei den durchgeführten Färbungen fand sich keine Expression von MHC-II oder CD68 auf Astrozyten (Abbildung 2 und 3). GFAP fand sich nur auf Astrozyten. CD68 und MHC-II hingegen wurden ausschliesslich von Mikroglia exprimiert.

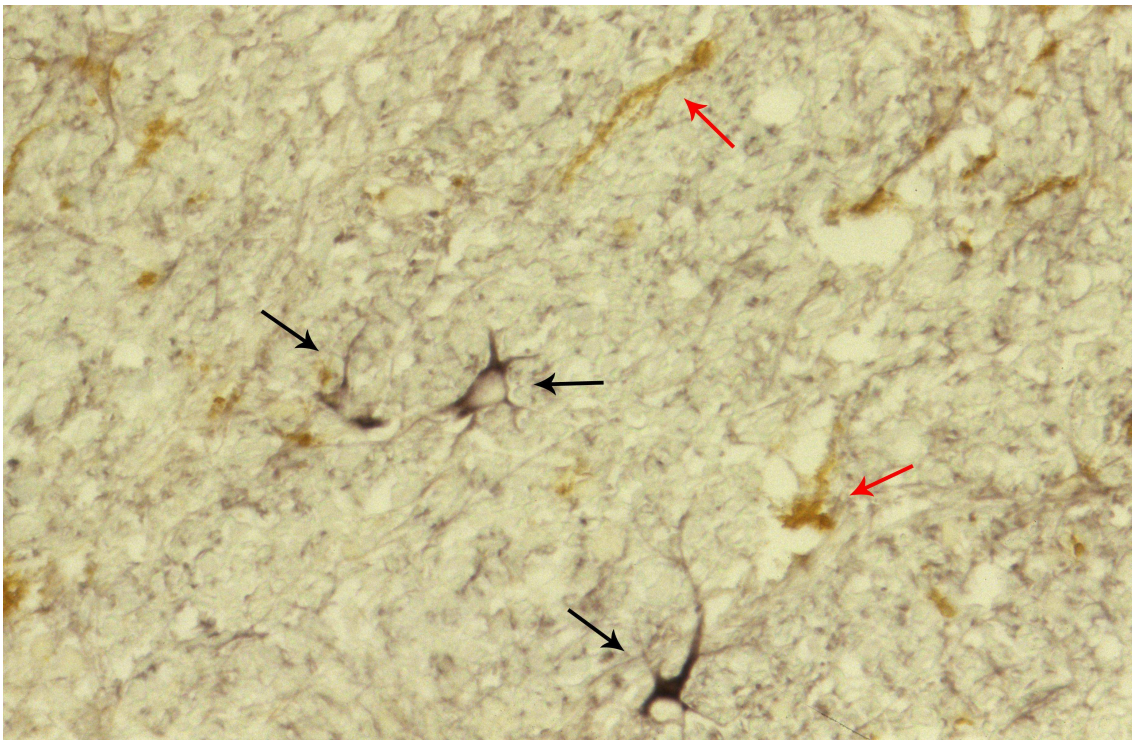


Abbildung 5: Doppelfärbung für GFAP und MHC-II (400-fache Vergrößerung im Original). Astrozytäre Zellfortsätze (schwarze Pfeile) stellen sich GFAP-positiv dar (blaues Reaktionsprodukt). MHC-II (braunes Reaktionsprodukt) findet sich ausschliesslich auf Mikroglia (rote Pfeile). Es findet sich keine Co-Expression von GFAP und MHC-II.

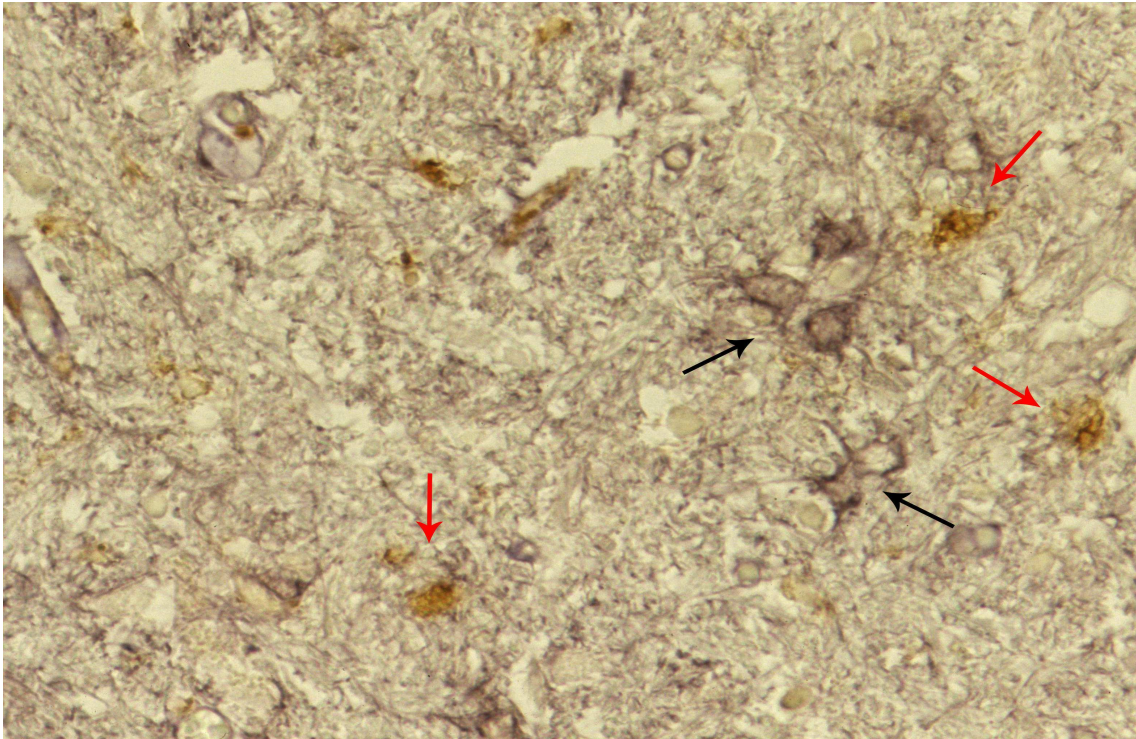


Abbildung 6: Doppelfärbung für GFAP und CD68 (400-fache Vergrößerung im Original). GFAP wird hier mit einem blauen Chromogen (schwarze Pfeile) dargestellt und findet sich nur auf Astrozyten. Das mit einem braunen Reaktionsprodukt dargestellte CD68 wird nur von Mikroglia exprimiert (rote Pfeile), nicht jedoch von Astrozyten.

### 3.1.5 Proteinexpression der Normalfälle

Bei allen Fällen wurden in den 5 Regionen auf allen 8 Höhen die jeweiligen prozentualen Anteile an Mikroglia, bezogen auf die Gesamtzellpopulation, berechnet, statistisch ausgewertet und in logarithmisch skalierten Diagrammen dargestellt.

Für keinen der ausgewerteten Antikörper ergaben sich durchgehend signifikanten Unterschiede bezüglich der Höhe oder der Regionen (Diagramme 2, 4, 6 und 8). Die Regionen der Vorder-, Seiten- und Hintersäule wurden zur Weißen Substanz zusammengefasst und mit der Grauen Substanz (Zusammenfassung der Grauen Substanz und des Zentralkanals) verglichen. Es konnte auch kein durchgehend signifikanter Unterschied zwischen der Grauen und der Weißen Substanz festgestellt werden (Diagramme 3, 5, 7 und 9).

Im Vergleich der einzelnen Antikörper ergab sich die höchste Dichte für MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia (9,8 % bis 17,6 %), welche sich in 38 der 40 Untersuchungen (bzgl. Region und Höhe) nicht signifikant von der auf dem selben Niveau liegenden Dichte an CD68<sup>+</sup> Mikroglia (9,3 % bis 15,2 %) unterschied.

Die Expressionsgrade der beiden Proteine AIF-1 (2,3 % bis 5,7 %) und IL-16 (3,3 % bis 6 %) zeigten ebenfalls in 39 von 40 Untersuchungen keine statistisch nachweisbaren Unterschiede. Die absolute Zahl an AIF-1<sup>+</sup> und IL-16<sup>+</sup> Mikroglia war jedoch im Vergleich mit den beiden oben genannten Antikörpern signifikant niedriger (Diagramm 1).

Dieser Vergleich wurde für jede Region auf den jeweiligen Rückenmarkshöhen durchgeführt und zeigt bis auf vier der vierzig untersuchten Regionen das oben genannte Verteilungsmuster (Diagramm 1). In diesen vier (Cervikal oben / Zentralkanal; Cervikal unten / graue Substanz; Thorakal oben / Seitensäule und Thorakal unten / Seitensäule) der insgesamt 40 getesteten Regionen zeigen sich leichte Erhöhungen bzw. Erniedrigungen der durchschnittlichen Expressionslevel einzelner Antikörper. Dadurch sind einzelne Antikörper nicht mehr signifikant unterschiedlich, das prinzipielle Verteilungsmuster bleibt jedoch erkennbar. In der Seitensäule des oberen und unteren Thorakalmarks fand sich im Vergleich zu den übrigen Regionen eine höhere Dichte MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia, so dass der MHC-II-Level hier gegenüber dem CD68-Level signifikant höher lag (Diagramme auf Seite 104). Im Zentralkanal des oberen Cervikalmarks zeigte sich eine erniedrigte CD68-Expression, welche sich hier

nicht mehr signifikant von der IL-16-Expression unterschied (Seite 103, oberes Diagramm). Im unteren Cervikalmark fanden sich erniedrigte Expressionsraten von MHC-II und AIF-1. Dadurch unterschied sich die MHC-II-Expression nicht mehr signifikant von der IL-16-Expression und die AIF-1-Expressionsrate erwies sich im Vergleich zu der von IL-16 als signifikant niedriger (Seite 103, unteres Diagramm).

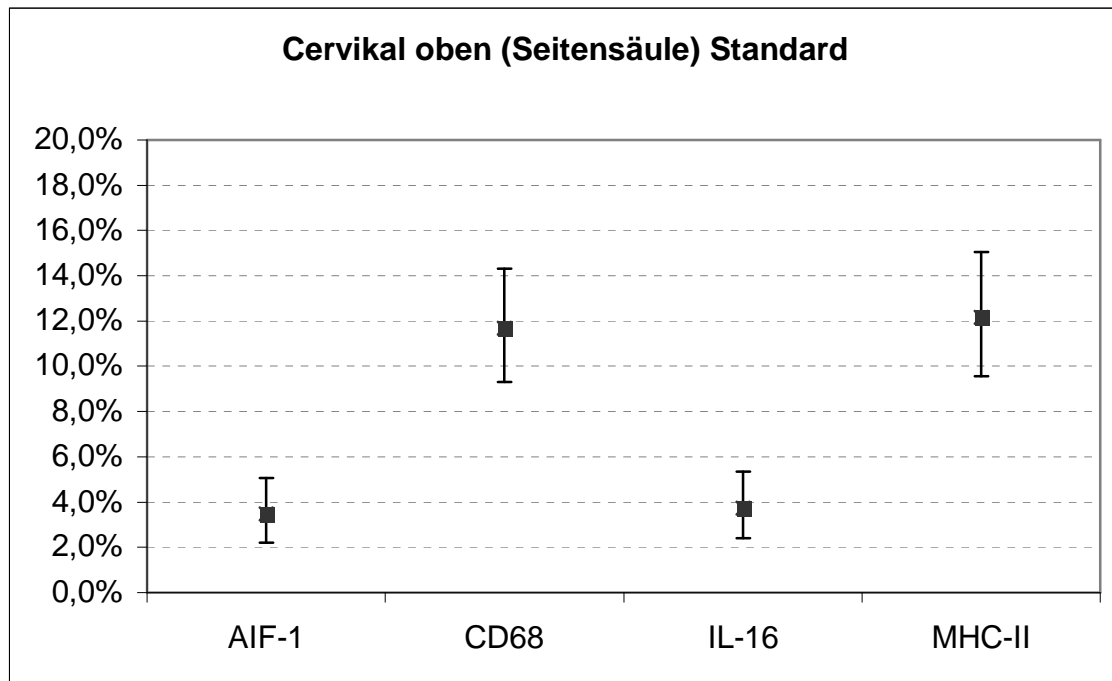


Diagramm 1: Durchschnittlicher Expressionsgrad der Antikörper (prozentualer Anteil der positiv gefärbten Mikroglia in Bezug zu allen parenchymalen Zellen des Rückenmark). Diagramm 1 zeigt exemplarisch die Expressionsniveaus der einzelnen Antikörper anhand der Seitensäule des oberen Cervikalmarks wie sie in 36 der 40 untersuchten Regionen zu finden sind. In 4 Regionen fanden sich Erhöhungen bzw. Erniedrigungen der Proteinexpressionlevel einzelner Antikörper. Die Diagramme hierzu finden sich im Anhang (Seite 103 - 104).

### 3.1.5.1 Expression von AIF-1

Es finden sich keine durchgehend signifikanten Unterschiede in der Verteilung AIF-1<sup>+</sup> Mikroglia. Die positiv mit AIF-1 gefärbten ramifizierten Mikroglia machen 2,3 % bis 5,7 % aller parenchymaler Zellen im Rückenmark aus. Im Vergleich der einzelnen Höhen fand sich im Gebiet des Zentralkanals im oberen Lumbalmark eine signifikant höhere Dichte als in der Zentralkanalregion des oberen Cervikal- und des Sakralmarks. Vergleicht man die einzelnen Regionen miteinander, findet man eine signifikant höhere Mikroglia-dichte des Zentralkanals gegenüber einzelner Regionen (Diagramm 2) im unteren Cervikalmark (Ze > Hi und Gr), oberen Thorakalmark (Ze > Hi) und im oberen Lumbalmark (Ze > Se, Hi und Gr).

Im oberen Cervikalmark fand sich in der Weißen Substanz eine signifikant höhere Dichte AIF-1<sup>+</sup> Mikroglia (Diagramm 3).

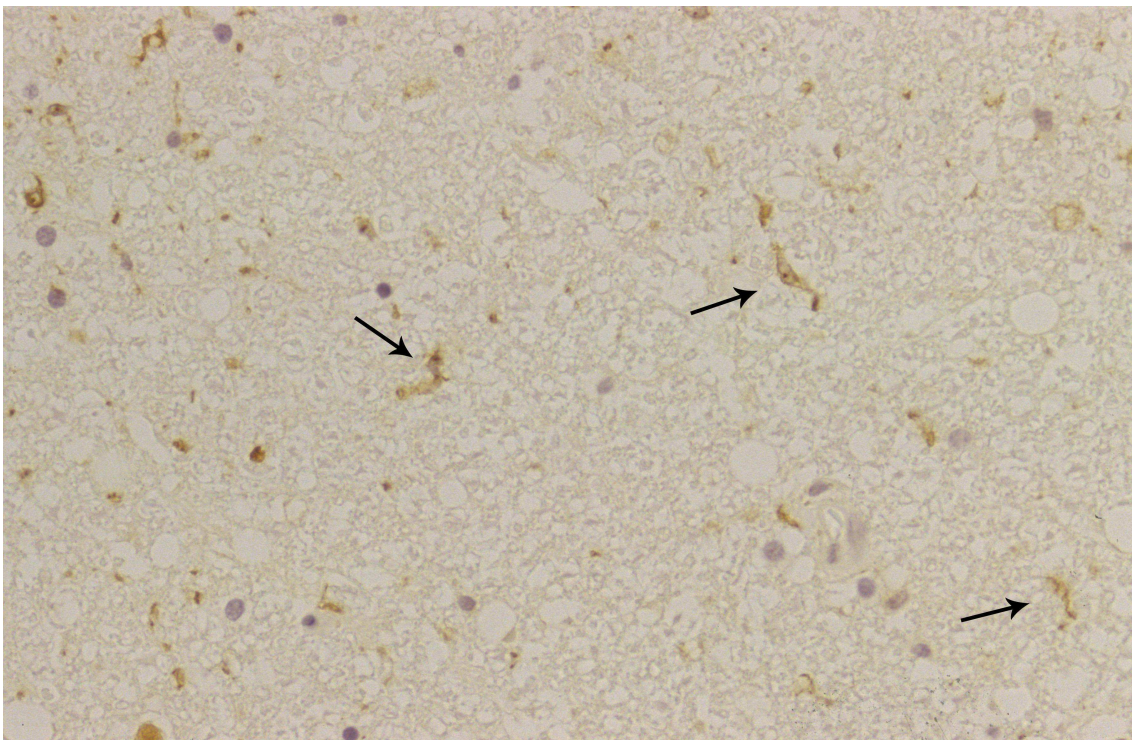


Abbildung 7: AIF-1 im normalen Rückenmark (400-fache Vergrößerung im Original).

In der Immunfärbung für AIF-1 stellen sich 2,3 % bis 5,7 % aller Zellen als ruhende ramifizierte Mikroglia dar (schwarze Pfeile).

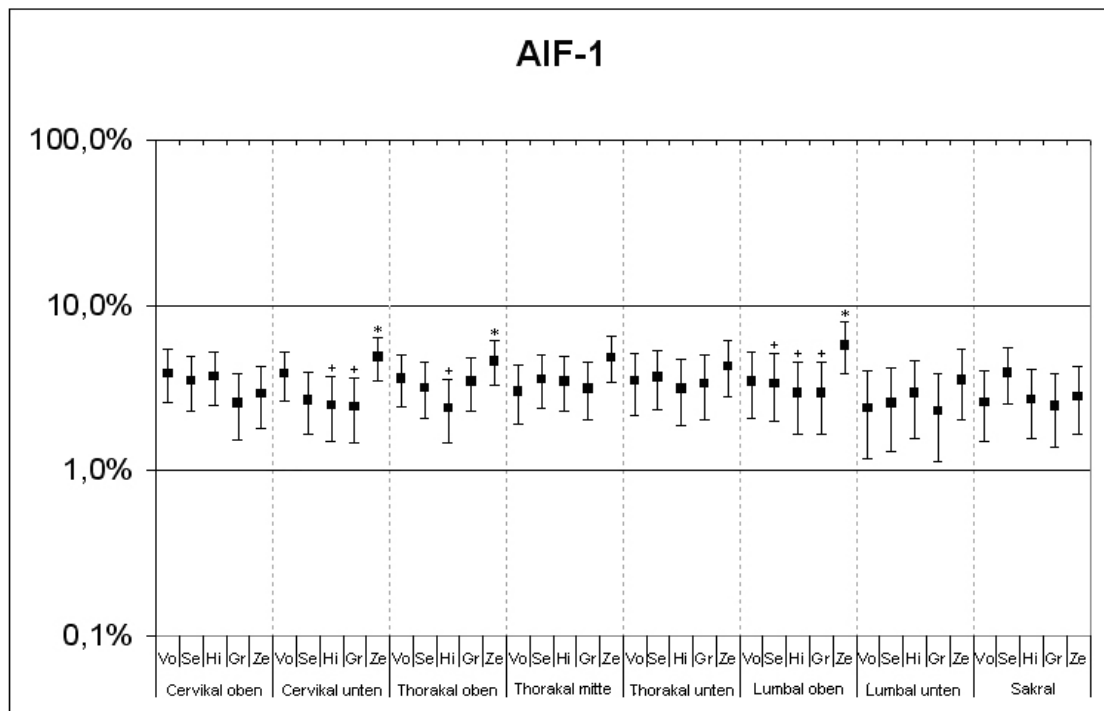


Diagramm 2: Verteilung AIF-1-positiver Mikroglia (Prozentanteil von AIF-1-positiver Mikroglia in Bezug zu allen parenchymalen Zellen des Rückenmarks). In den mit einem Stern (\*) markierten Regionen findet sich auf der jeweiligen Rückenmarkshöhe eine signifikant höhere Dichte AIF-1<sup>+</sup> Mikroglia im Vergleich zu den mit einem Kreuz (+) markierten Regionen.



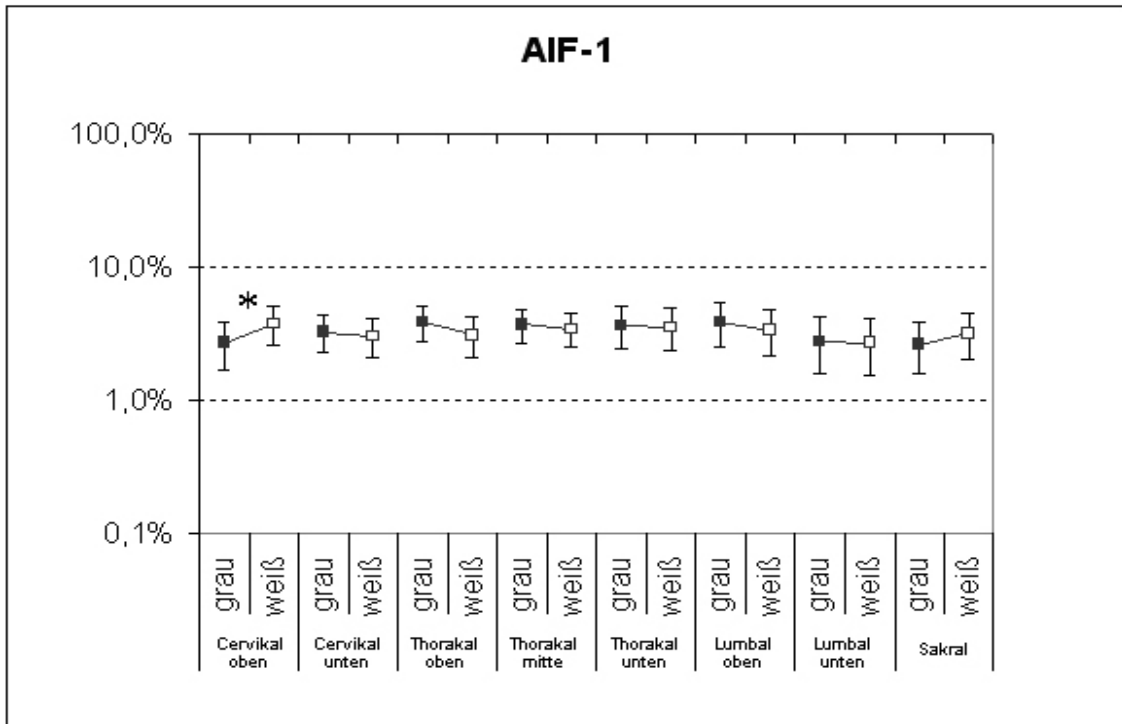


Diagramm 3: Vergleich der Grauen gegen die Weiße Substanz: Die Höhen des Rückenmarks in denen sich ein signifikanter Unterschied zwischen Grauer und Weißer Substanz findet sind mit einem Stern (\*) markiert. Für AIF-1 fand sich mit Ausnahme des oberen Cervikalmarks kein signifikanter Unterschied.

### 3.1.5.2 Expression von CD68

Für CD68<sup>+</sup> Mikroglia finden sich ebenfalls keine durchgehend signifikanten Unterschiede in der Verteilung im Rückenmark (9,3 % bis 15,2 %). Es stellen sich 9,3 % bis 15,2 % aller Zellen als ramifizierte Mikroglia dar. Im unteren Thorakalmark findet sich im Vergleich mit dem Sakralmark im Bereich der Hintersäule eine höhere Dichte an Mikroglia. Beim Regionenvergleich finden sich im oberen Cervikalmark (Vo > Ze) und im oberen Thorakalmark (Ze > Se) signifikante Unterschiede einzelner Regionen (Diagramm 4).

Im Vergleich der Grauen gegen die Weiße Substanz fand sich auf keiner der untersuchten Höhen ein signifikanter Unterschied (Diagramm 5).

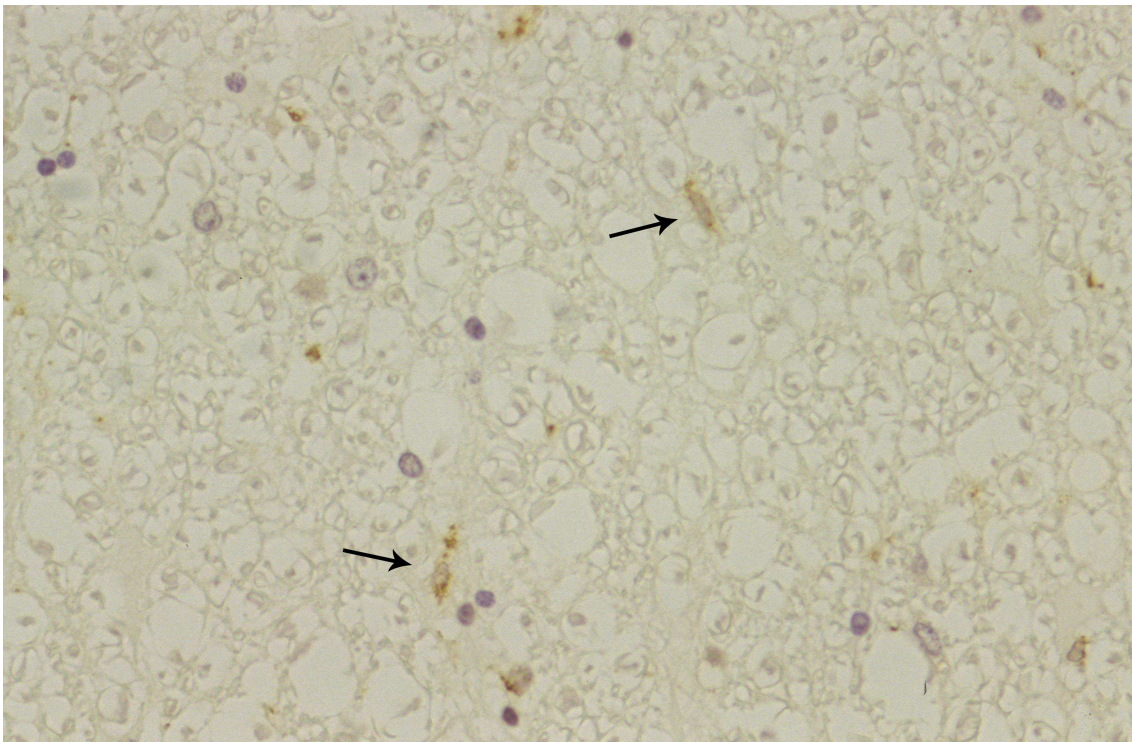
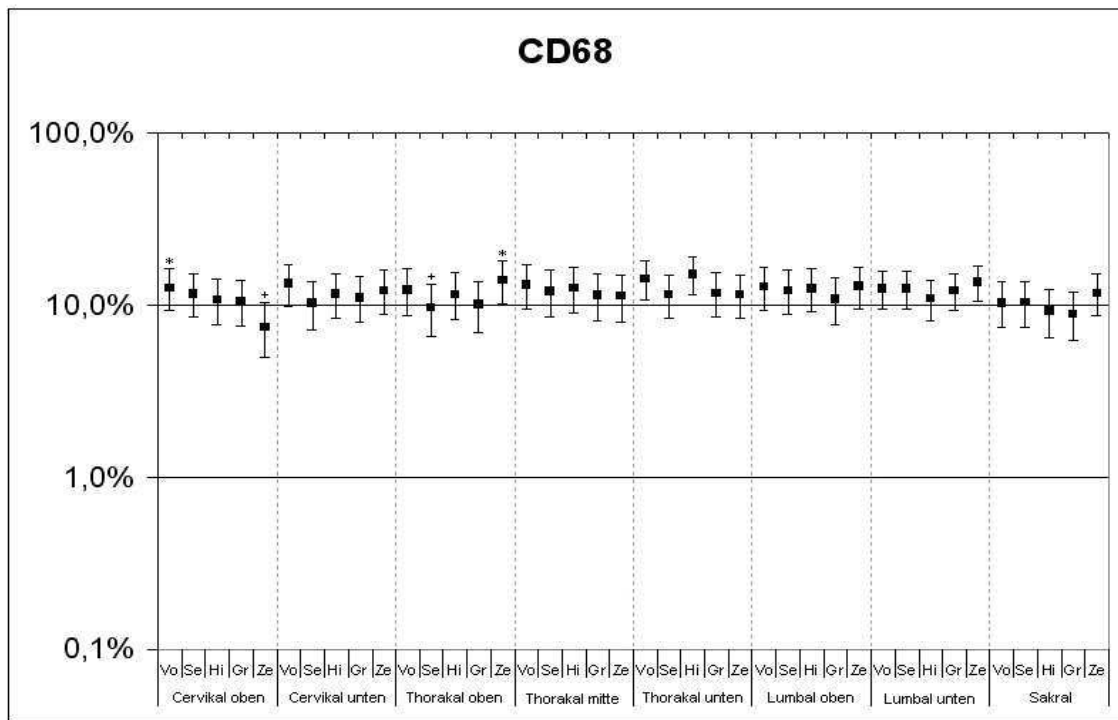


Abbildung 8: CD68 im normalen Rückenmark (400-fache Vergrößerung im Original). Die Dichte der CD68-positiven Mikroglia ist signifikant höher verglichen mit der Dichte AIF-1 und IL-16 positiver Mikroglia. In der Immunfärbung für CD68 stellen sich 9,3 % 15,2 % aller Zellen als ruhende ramifizierte Mikroglia dar (schwarze Pfeile).



**Diagramm 4:** Regionale Verteilung CD68-positiver Mikroglia (Prozentanteil von CD68-positiver Mikroglia in Bezug zu allen parenchymalen Zellen des Rückenmarks)

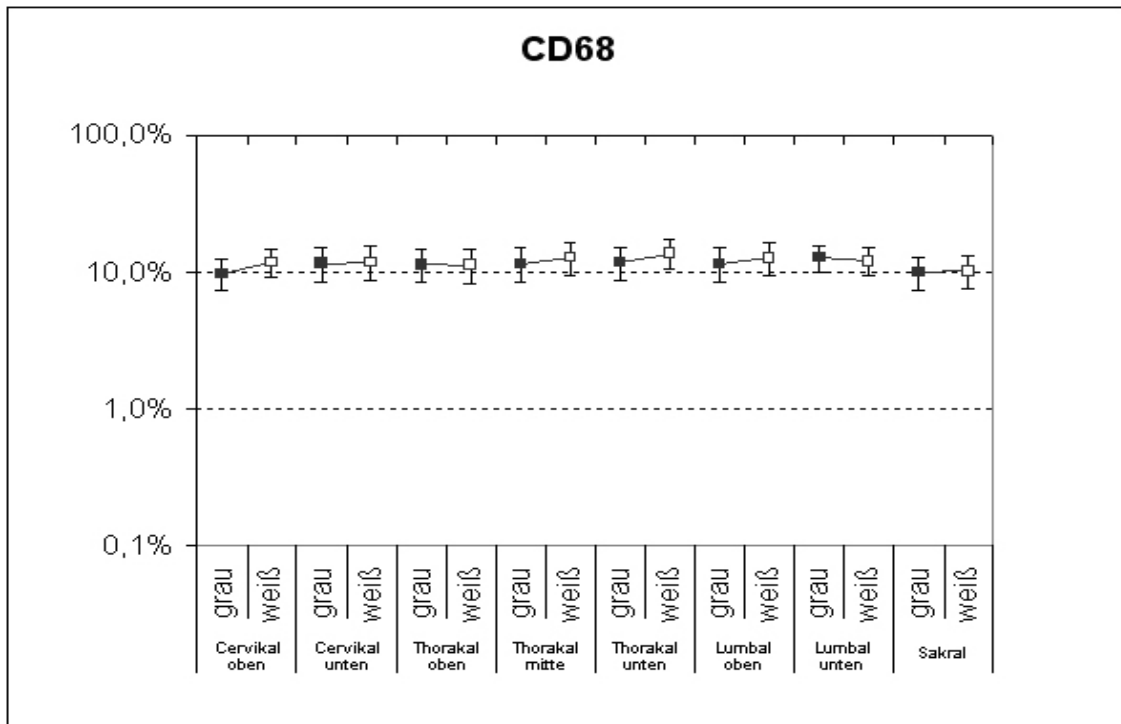


Diagramm 5: Vergleich der Grauen gegen die Weiße Substanz. In der Immunfärbung mit CD68 fand sich auf keiner der untersuchten Höhen ein signifikanter Unterschied.

### 3.1.5.3 Expression von IL-16 (LCF)

Die Dichte IL-16<sup>+</sup> Mikroglia liegt auf dem selben Niveau (3,3 % bis 6 % aller parenchymaler Zellen) wie die der AIF-1<sup>+</sup> Zellen und zeigt keine durchgehend signifikanten Unterschiede in der Verteilung im Rückenmark. Im Vergleich der einzelnen Höhen gegeneinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Vergleicht man die einzelnen Regionen gegeneinander findet sich in der Region des Zentralkanals im unteren Cervikal- (Ze > Se) und oberen Thorakalmark (Ze > Vo und Hi) gegenüber einzelnen Regionen eine statistisch nachweisbar höhere Mikroglia-dichte (Diagramm 6).

Lediglich in der Grauen Substanz des unteren Cervikalmarks fand sich eine gegenüber der Weißen Substanz signifikant höhere Dichte IL-16<sup>+</sup> ramifizierter Mikroglia (Diagramm 7).

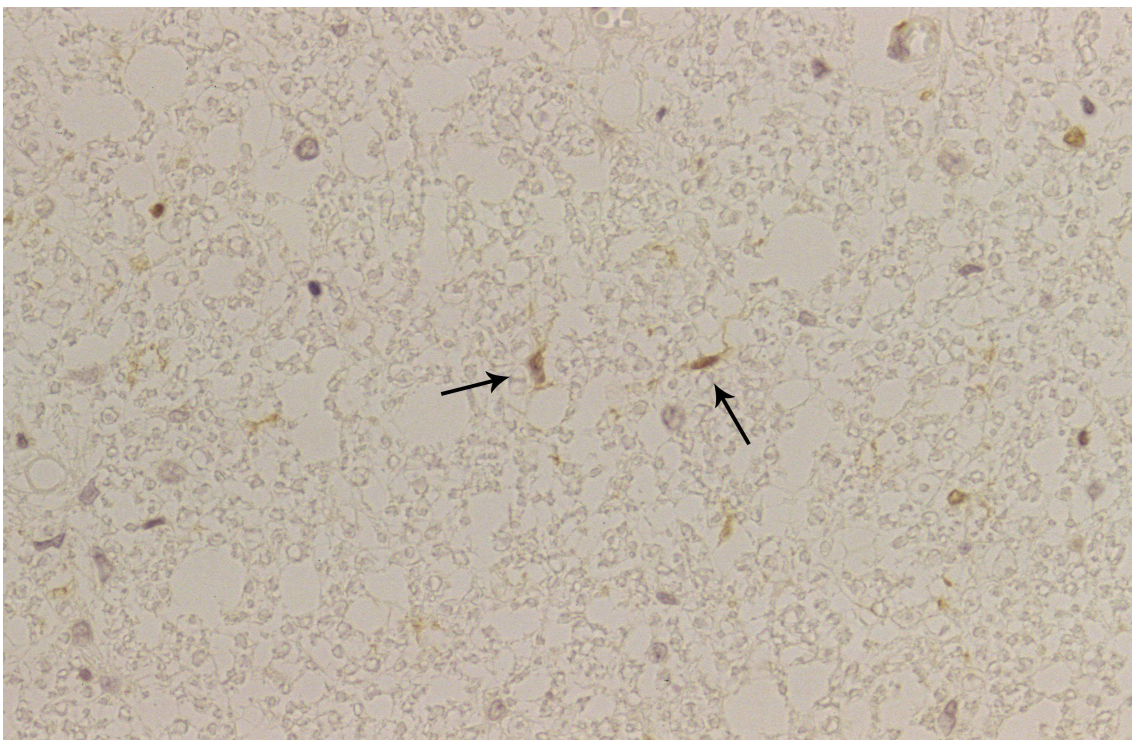


Abbildung 9: IL-16 im normalen Rückenmark (400-fache Vergrößerung im Original). Die Dichte der IL-16-positiven Mikroglia (schwarze Pfeile) liegt auf dem gleichen Niveau (3,3 % bis 6 %) wie die der AIF-1-positiven Zellen, ist jedoch im Vergleich mit CD68 und MHC-II signifikant niedriger.

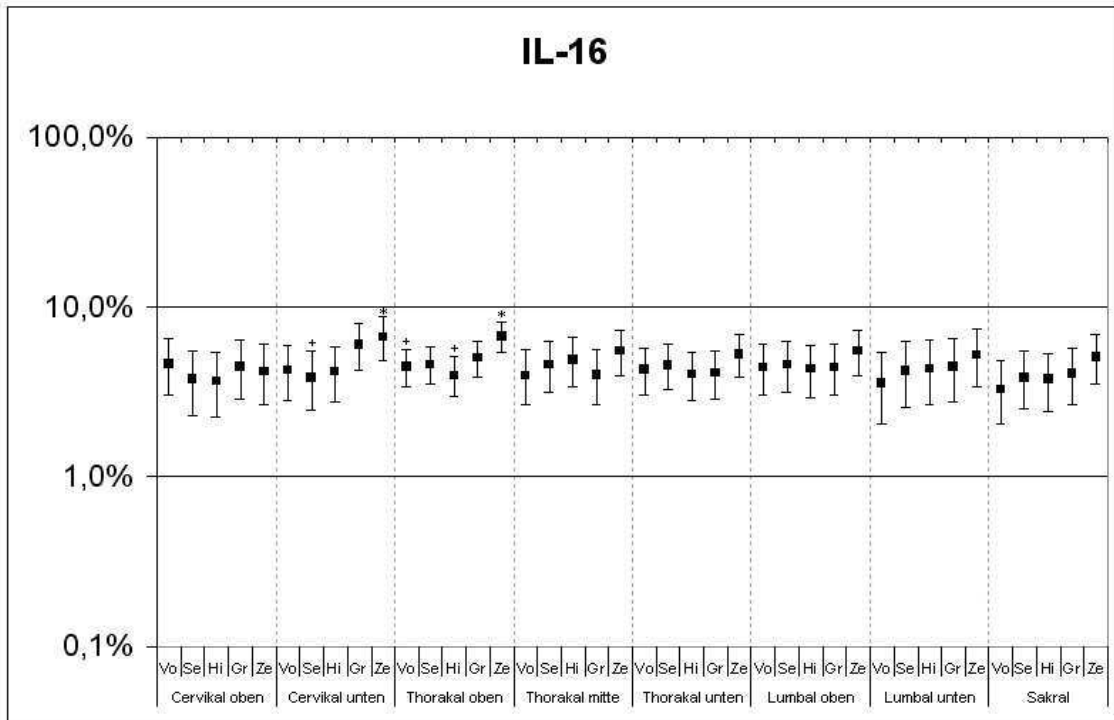


Diagramm 6: Verteilung IL-16-positiver Mikroglia (Prozentanteil von IL-16-positiver Mikroglia in Bezug zu allen parenchymalen Zellen des Rückenmarks)

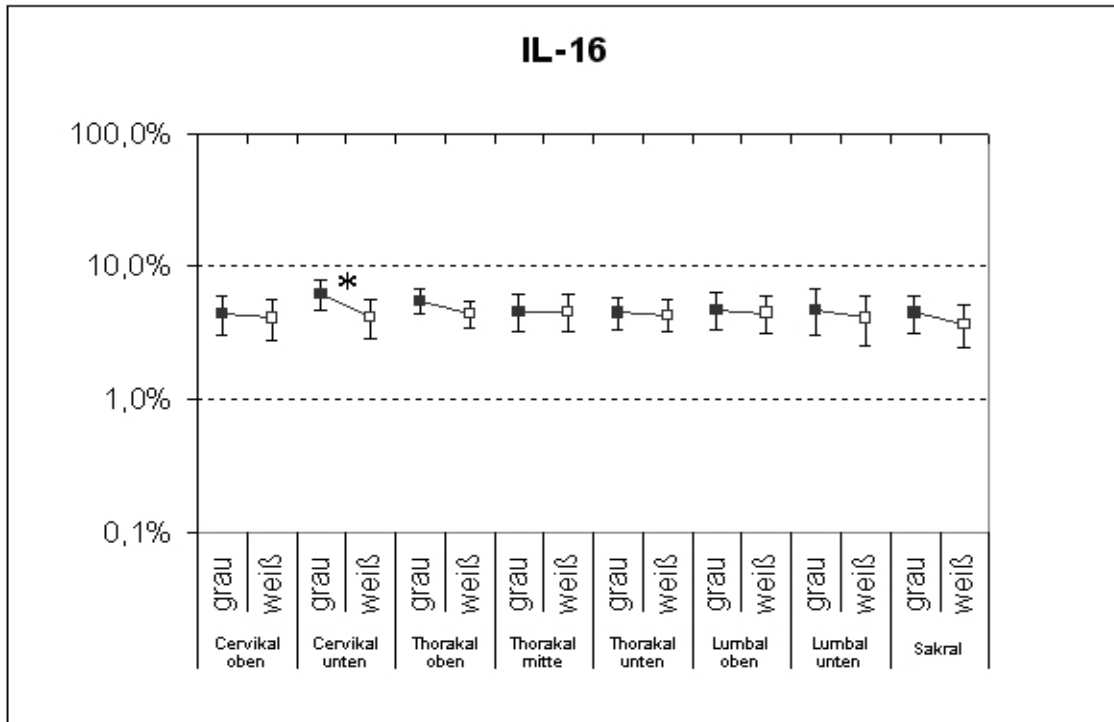


Diagramm 7: Vergleich der Grauen gegen die Weiße Substanz. Bei der Immunfärbung mit IL-16 fanden sich mit Ausnahme des unteren Cervikalmarks (Graue Substanz > Weiße Substanz) keine signifikanten Unterschiede in der Dichte ramifizierter Mikroglia zwischen der Grauen und der Weißen Substanz

#### **3.1.5.4 Expression von MHC-II (HLA-DR;-DP;-DQ)**

MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia machten 9,8 % bis 17,5 % aller parenchymaler Zellen im Rückenmark aus und lagen damit auf dem selben Niveau wie die Dichte an CD68<sup>+</sup> Mikroglia. In der Immunfärbung für MHC-II fanden sich ebenfalls keine durchgehend signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Mikroglia im Rückenmark. Im Höhenvergleich fanden sich im Bereich der Vordersäule im unteren Thorakalmark höhere Werte als im unteren Lumbalmark und im Bereich der Hintersäule im unteren Thorakal- und oberen Lumbalmark höhere Werte als Sakral. Beim Vergleich der Regionen ergaben sich im unteren Cervikalmark (Vo, Hi und Ze > Gr) und im Sakralmark (Ze > Vo, Se, Hi und Gr) signifikante Unterschiede (Diagramm 8).

Im oberen Cervikalmark und unteren Thorakalmark zeigte sich eine signifikant höhere Dichte MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia in der Weißen Substanz. Dahingegen fand sich im Sakralmark in der Grauen Substanz eine höhere Dichte MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia (Diagramm 9).



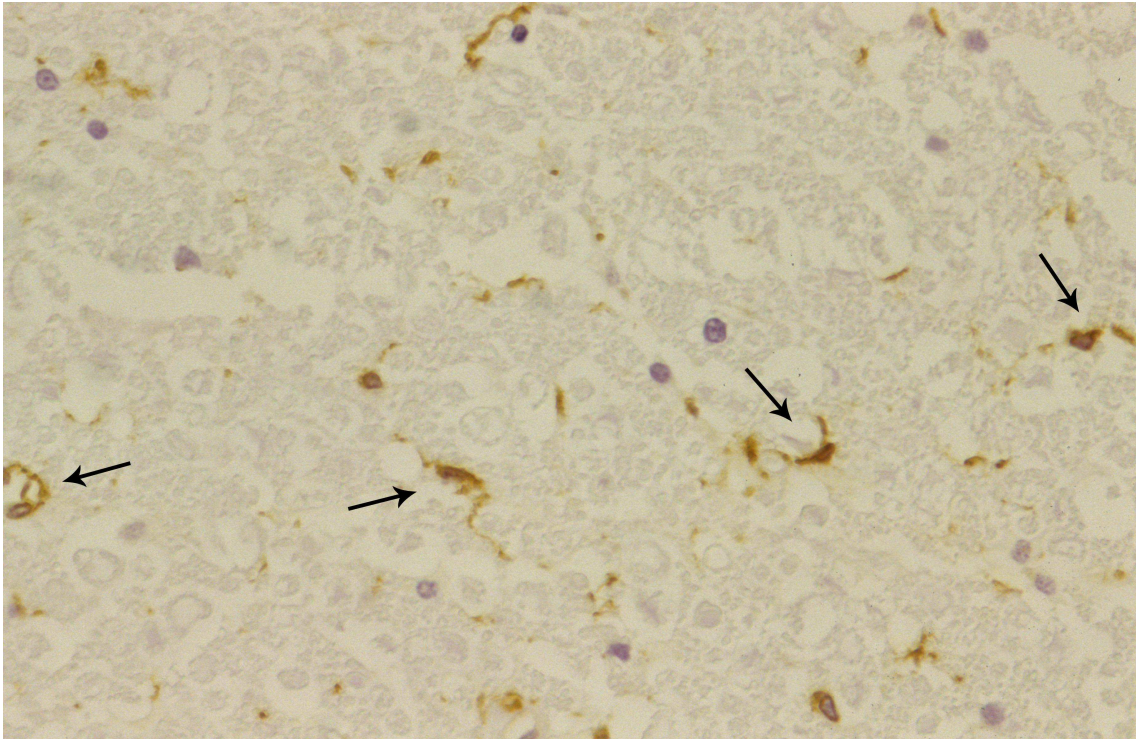


Abbildung 10: MHC-II im normalen Rückenmark (400-fache Vergrößerung im Original). Die höchste Dichte an Mikroglia (schwarze Pfeile) findet sich in der Immunfärbung mit MHC-II (9,8 % bis 17,5 %). Sie unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Dichte CD68-positiver Zellen.

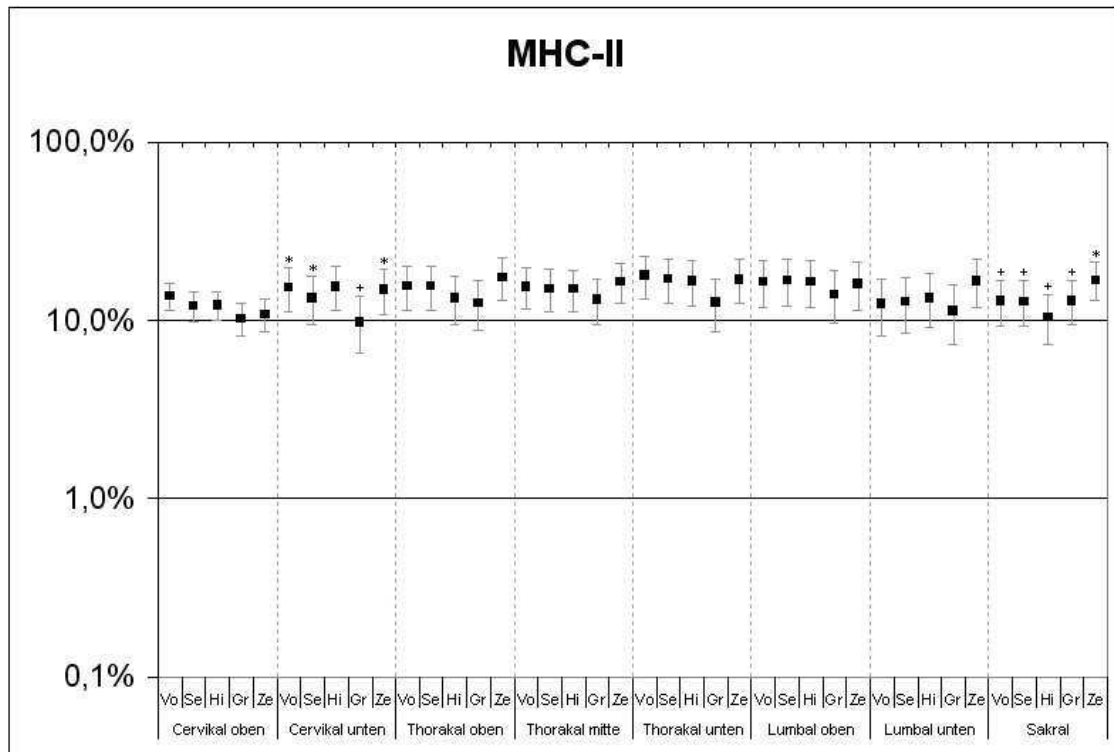


Diagramm 8: Verteilung MHC-II-positiver Mikroglia (Prozentanteil von MHC-II-positiver Mikroglia in Bezug zu allen parenchymalen Zellen des Rückenmarks)

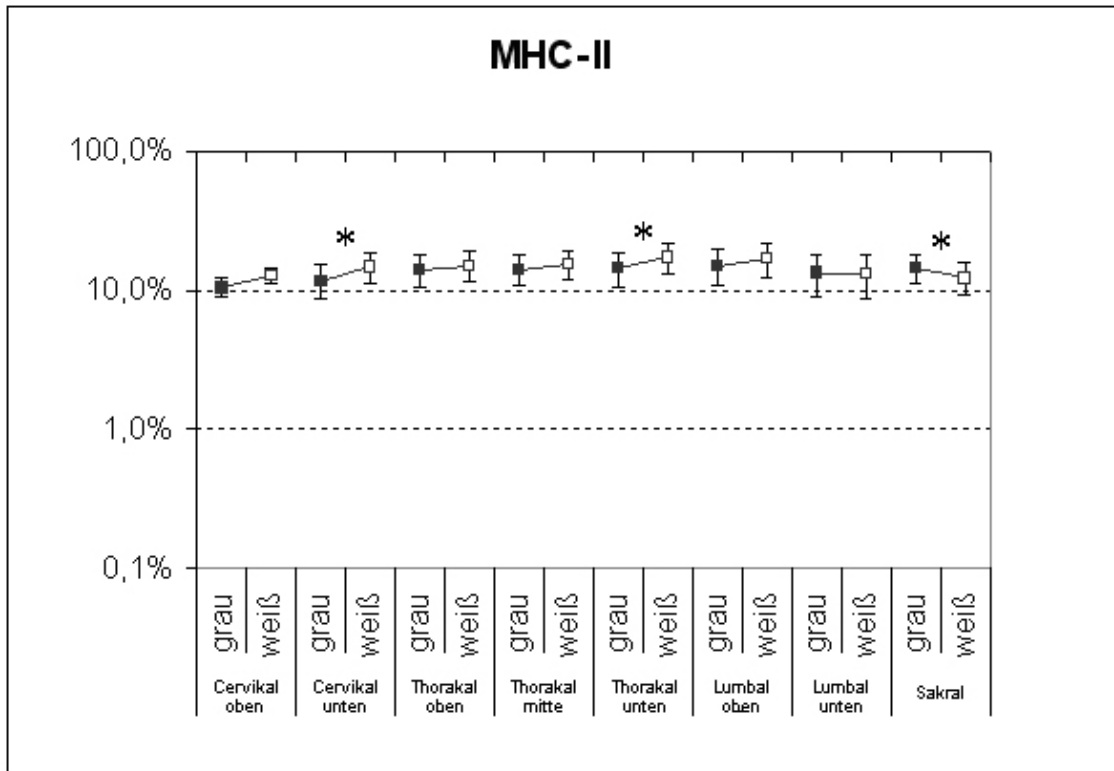


Diagramm 9: Vergleich der Grauen gegen die Weiße Substanz. Auf insgesamt drei (\*) der acht untersuchten Rückenmarkshöhen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Grauen und der Weißen Substanz. Im unteren Cervikalmark und im Thorakalmark findet sich die höhere Dichte an MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia in der Weißen Substanz. Im Sakralmark lässt sich dahingegen in der Grauen Substanz eine höhere Dichte MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia nachweisen.

### 3.1.6 Erstellung eines Referenzbereiches

Die Referenzintervalle wurden auf der Basis der 10 Normalfälle, durch Rücktransformierung der arcussinuswurzeltransformierten Mittelwerte plus/minus das 1,96-fache der Standardabweichungen errechnet (Diagramm 10 bis 13). Werte die außerhalb des Referenzbereichs lagen, wurden als pathologisch angesehen. Eine Tabelle mit den genauen prozentualen Angaben der einzelnen Referenzbereiche findet sich im Anhang (Tabelle 5 - 8, Seite 99 - 102).

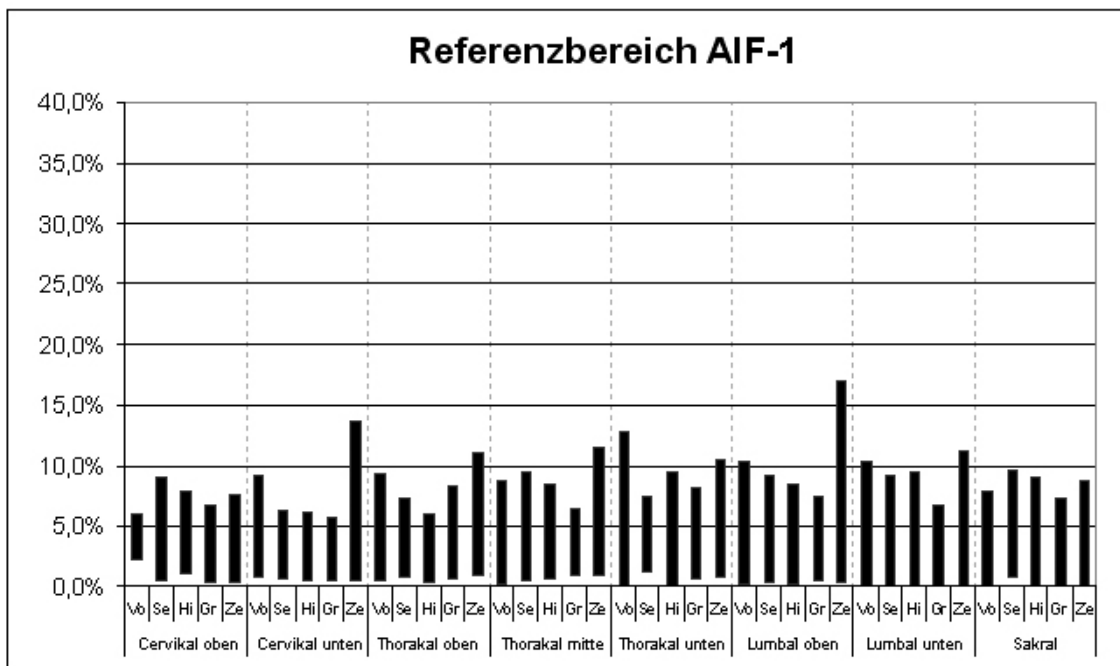
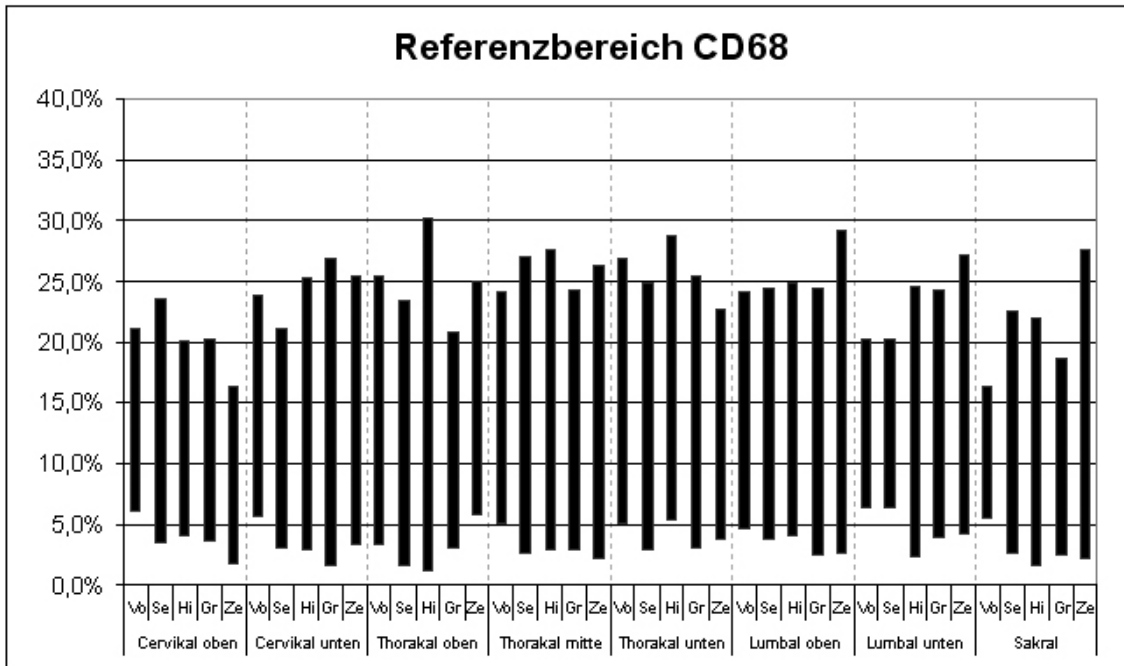
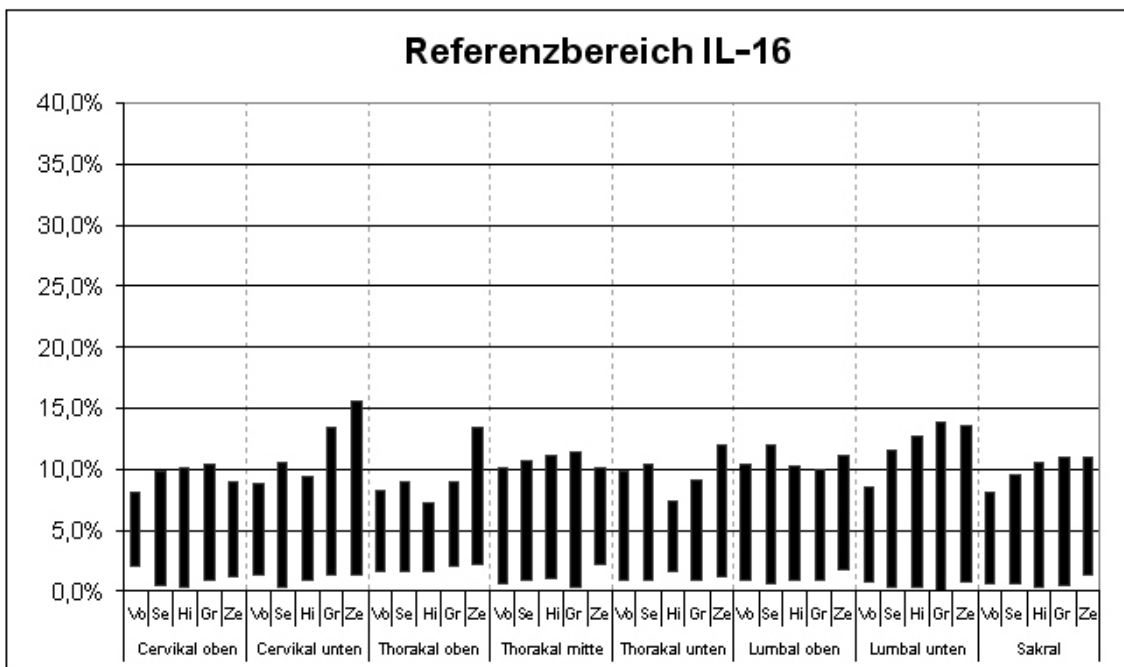


Diagramm 10: Referenzbereich für AIF-1. Der Referenzbereich von AIF-1 liegt in etwa auf dem selben Niveau wie der von IL-16, ist jedoch deutlich niedriger wie die Referenzbereiche von CD68 und MHC-II.



**Diagramm 11:** Referenzbereich für CD68. Der Referenzbereich von CD 68 liegt auf dem Niveau von MHC-II und liegt deutlich über den Referenzbereichen von AIF-1 und IL-16.



**Diagramm 12:** Referenzbereich für IL-16. Der Referenzbereich von IL-16 liegt auf dem Niveau von AIF-1.

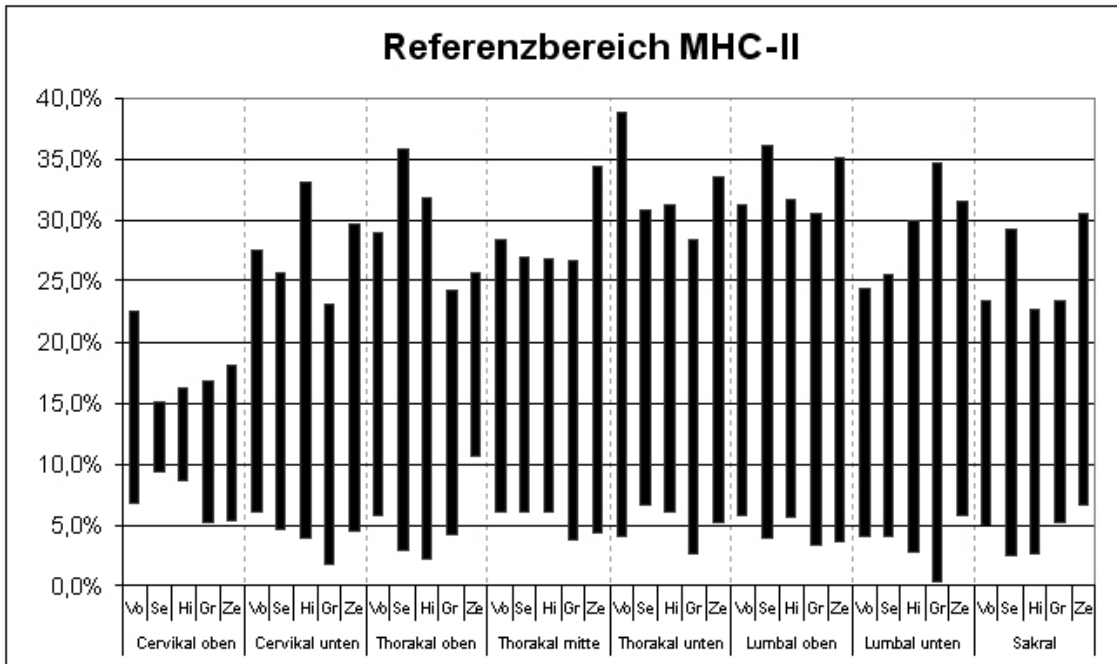


Diagramm 13: Referenzbereich MHC-II. Der Referenzbereich von MHC-II liegt auf dem Niveau von CD68 und damit deutlich oberhalb der Referenzbereiche von AIF-1 und IL-16.

### 3.1.7 Proteinexpression der pathologischen Fälle

Für alle der vier untersuchten Proteine fanden sich deutlich erhöhte Dichten von Mikroglia. Dabei zeigte sich für die untersuchten Proteine ein ähnliches Verteilungsmuster wie in der Normalpopulation. Die höchsten Dichten wurden von MHC-II<sup>+</sup> und CD68<sup>+</sup> Mikroglia erreicht. Hierbei zeigte sich, dass sich auch immer wieder Makrophagen unter den gefärbten Zellen befanden. Da morphologisch die ortsständige aktivierte Mikroglia nicht von eingewanderten Makrophagen unterschieden werden kann, wurden sowohl Zellen mit typischer ramifizierter Morphologie als auch Makrophagen gewertet. Für MHC-II fand sich die höchste Dichte mit 45,8 % der Gesamtzellzahl und für CD68 mit 45,4 % der Gesamtzellzahl. Es fanden sich ebenfalls erhöhte Dichten von AIF-1<sup>+</sup> und IL-16<sup>+</sup>, welche jedoch nicht das Niveau von CD68 und MHC-II erreichten. Die höchste Dichte für AIF-1 lag bei 34,6 % aller parenchymaler Zellen und für IL-16 bei 26,4 % aller parenchymaler Zellen.

Wie bei den Normalfällen fanden sich auch in 13 von 15 pathologischen Fällen MRP-8 und MRP-14 positive Zellen ausschliesslich in Blutgefässen. Lediglich in zwei Fällen (Fall 19 und 21) fanden sich vereinzelt ramifizierte Mikroglia im Parenchym.

Um die Proteinexpression der pathologischen Fälle weiter zu beurteilen, wurde überprüft, ob deren beobachtete Mittelwerte außerhalb des Referenzintervalls lagen. Zu diesem Zweck wurden die Referenzintervalle und die jeweiligen Werte in einem Diagramm dargestellt (siehe Anhang Seite 105 - 134). Bei insgesamt zwölf der fünfzehn Fälle lagen die Proteinexpressionsraten deutlich außerhalb des Referenzintervalls. Nicht alle untersuchten Proteine waren in gleichem Maße verändert. Teilweise erfolgte eine selektive Erhöhung einzelner Proteine. Andere Fälle wiederum zeigten keine Erhöhung, teilweise lagen die Werte sogar unterhalb des Referenzbereichs. Insgesamt fanden sich vier verschiedene Reaktionsmuster:

1. Fälle mit einer diffusen Erhöhung eines oder mehrerer Proteine.
2. Fälle mit einer auf bestimmte Regionen beschränkten Erhöhung eines oder mehrerer Proteine.
3. Fälle, bei denen die Werte überwiegend innerhalb des Referenzbereichs lagen.
4. Fälle, bei denen die Werte eines oder mehrerer Proteine unterhalb des Referenzbereichs lagen.

Nachfolgend findet eine detailliertere Analyse der einzelnen Gruppen statt. Die prozentualen Angaben in Klammern geben an, wie viele der Werte des jeweiligen Falles außerhalb des Referenzbereiches liegen. Die Diagramme finden sich im Anhang (Seite 105 - 134). Wenn mehr als 50 % der Werte für den jeweiligen Antikörper über bzw. unterhalb des Referenzbereiches lagen, wurden die Proteinexpressionsraten als eindeutig erhöht bzw. erniedrigt angesehen. Lagen 25 % bis 50 % der Werte außerhalb des Referenzbereichs wurde die Änderung der Proteinexpressionsrate als fraglich betrachtet. Die Proteinexpressionsrate wurde als nicht verändert betrachtet, wenn 0 % bis 25 % der Werte außerhalb des Referenzbereiches lagen.

**3.1.7.1 Fälle mit diffuser Erhöhung der mikroglialen Proteinexpression**

Bei Fall 21 (Meningitis) findet sich eine deutliche Erhöhung von AIF-1 (82,5 %), IL-16 (80 %) und MHC-II (80 %) (Abbildung 11). Erhöhungen der Proteine AIF-1 (97 %) und IL-16 (77 %) zeigte Fall 20 (Arteriosklerose). Ein alleiniger Anstieg von AIF-1 fand sich bei den Fälle 18 (Subarachnoidalblutung) und 22 (symptomatische Epilepsie). Bei ersterem lagen 60 % und bei letzterem 65,7 % der Werte für AIF-1 außerhalb des Referenzbereichs. Des weiteren zeigten Fall 15 (Guillain-Barré-Syndrom) und 16 (Meningitis) Erhöhungen von IL-16 (Pat.5: 55 %; Pat.6: 65,7 %). Eine Zusammenfassung der mikroglialen Proteinexpression von den pathologischen Fällen mit diffuser Erhöhung findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Pathologische Fälle mit diffuser Erhöhung der mikroglialen Proteinexpression

Fall	AIF-1	CD68	IL-16	MHC-II
Fall 21 (Meningitis)	↑	↗	↑	↑
Fall 20 (Arteriosklerose)	↑	→	↑	↗
Fall 18 (Subarachnoidalblutung)	↑	→	↗	→
Fall 22 (symptomatische Epilepsie)	↑	→	→	→
Fall 16 (Meningitis)	↗	→	↑	↓
Fall 15 (Guillain-Barré-Syndrom)	→	↑*	↑	→

↑ Erhöhung; ↗ fragliche Erhöhung; → keine Erhöhung; ↓ Erniedrigung

\* nur in der Hintersäule



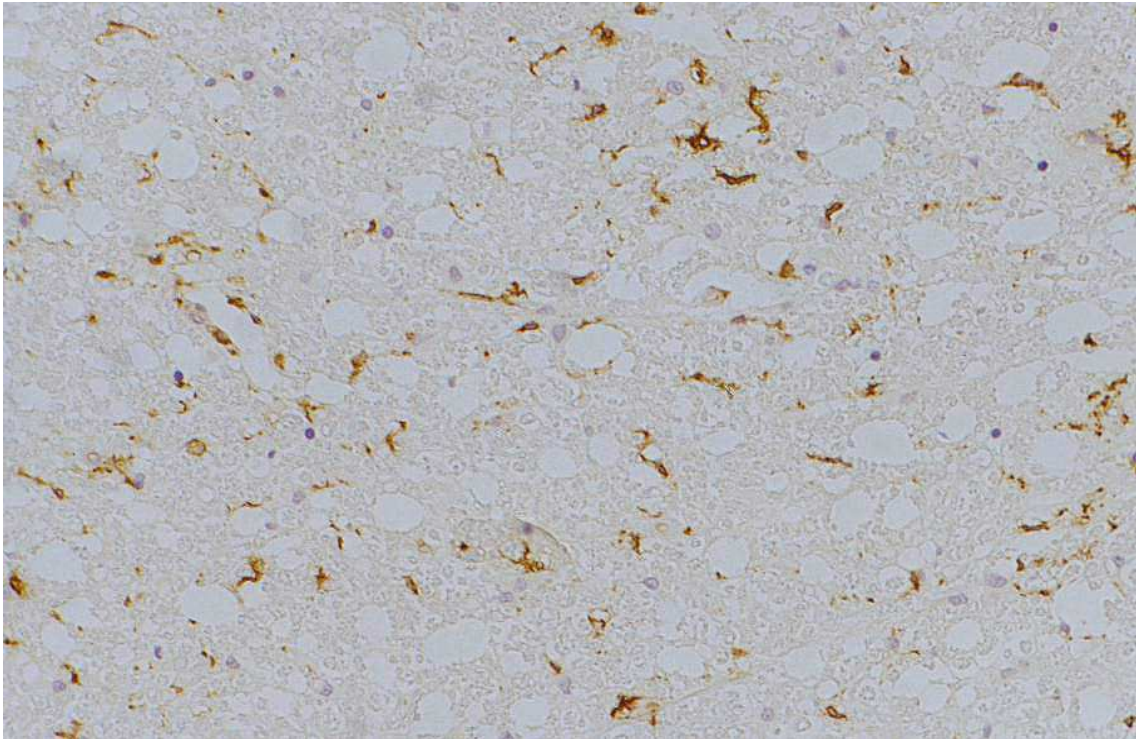


Abbildung 11: MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia im Rückenmark bei Meningitis (400-fache Vergrößerung im Original). Eine erhöhte Dichte an Mikroglia finden sich diffus über das ganze Rückenmark verteilt.

### **3.1.7.2 Fälle mit selektiver Erhöhung der mikroglialen Proteinexpression**

Eine selektive Erhöhung in den kortikospinalen Bahnen (Tractus corticospinalis anterior und lateralis) zeigte sich bei den an amyotropher Lateralsklerose erkrankten Fällen. Am deutlichsten ist dies bei Fall 14 anhand der Verteilung von MHC-II (Abbildung 12), CD68 und AIF-1 zu erkennen. Bei Fall 23 ist dieses Verteilungsmuster weniger deutlich, jedoch ebenfalls nachvollziehbar. Ein selektiver Befall der Hintersäule fand sich bei Fall 17 (Plasmozytom). Interessanterweise waren nur CD68 und MHC-II in dem betroffenen Gebiet erhöht. AIF-1 und IL-16 zeigten keine Reaktion. Fall 19 (Morbus Alexander) zeigte eine Erhöhung von CD68 vor allem im Seitenstrang, aufgrund einer im dorsolateralen Cervikalmark gelegenen Läsion. Der Fall des Guillian-Barré-Syndroms (Fall 15) zeigte interessanterweise neben der bereits erwähnten diffusen Erhöhung von IL-16, einen selektiv im Hinterstrang lokalisierten Anstieg CD68<sup>+</sup> Mikroglia.

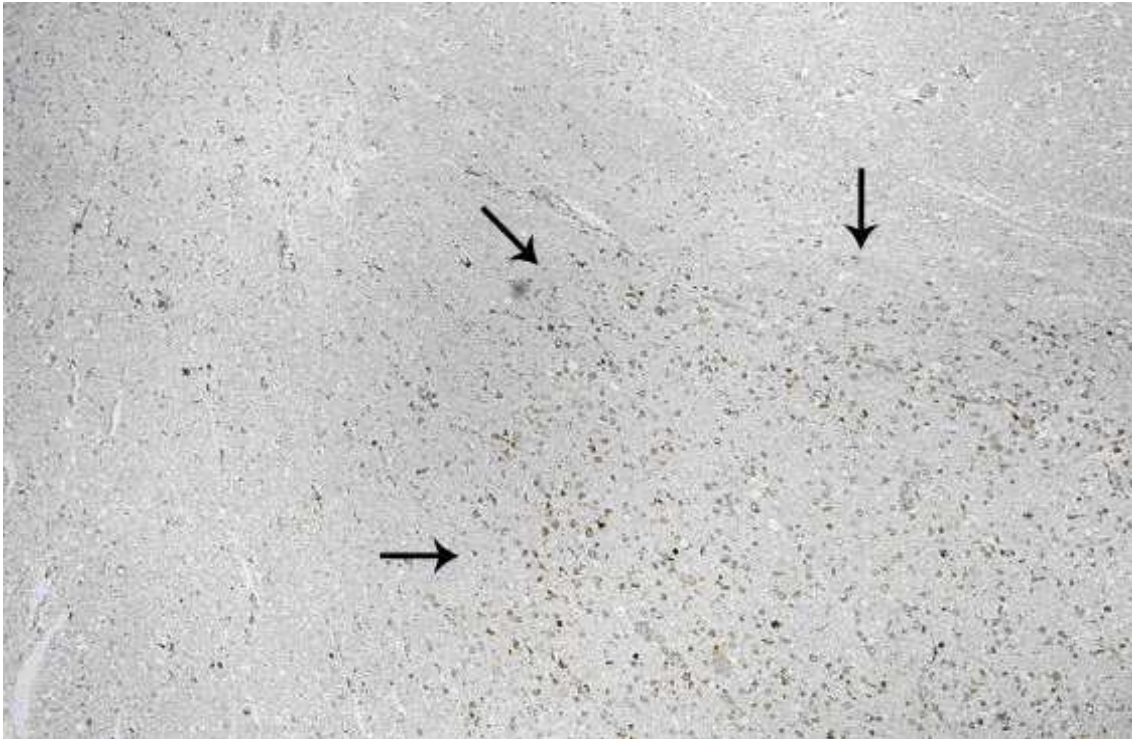


Abbildung 12: MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia/Makrophagen im Rückenmark bei amyotropher Lateralsklerose (100-fache Vergrößerung im Original). Es findet sich eine selektive Erhöhung von Mikroglia/Makrophagen im Tractus corticospinalis lateralis (schwarze Pfeile).

### **3.1.7.3 Fälle ohne mikrogliale Reaktion**

Bei insgesamt drei Fällen lag die überwiegende Zahl der Werte innerhalb des Referenzintervalls. Es handelt sich dabei um den Fall einer vaskulären Myelopathie (Fall 13), einen Fall mit einem Insult im linken Putamen (Fall 24) und um einen Fall mit einer Cephalgie mit unklaren Synkopen (Fall 25) welcher lediglich eine fragliche Erhöhung der Proteinexpression von AIF-1 und MHC-II aufwies.

### **3.1.7.4 Fälle mit verminderter mikroglialer Proteinexpression**

Bei insgesamt drei Fällen fanden sich Werte, die unterhalb des Referenzintervalls lagen. Eine Erniedrigung der MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia fand sich bei Fall 12 (Arteriosklerose, Multiple Infarkte) und überraschenderweise eine fragliche Erniedrigung bei Fall 16 (Meningitis), welcher für AIF-1 fraglich erhöhte Werte und für IL-16 eindeutig erhöhte Werte aufwies. Bei Fall 12 lagen 67,5 % und bei Fall 16 48,5 % der Werte für MHC-II

unterhalb des Referenzbereichs. Niedrigere Dichten von AIF-1 und IL-16 zeigten sich bei Fall 11 (Multiple Sklerose). Bei diesem Fall lagen 50 % der Werte für AIF-1 und 67,5 % der Werte für IL-16 unterhalb des Referenzintervalls.

## **4 DISKUSSION**

Untersuchungen des normalen Großhirns zeigen eine sehr heterogene Verteilung der Mikroglia. Die in diesen Arbeiten gewonnenen Daten stellen wichtiges Basiswissen zur Abgrenzung einer mikroglialen Vermehrung im Krankheitsfall dar. Jedoch zeigte sich in diesen Untersuchungen auch, wie vorsichtig man bei der Übertragung der tierexperimentell gewonnenen Daten auf die Situation im Menschen sein muss. Mittelbronn et al. (2001) fanden im humanen Großhirn eine grundlegend andere mikrogliale Verteilung als in tierexperimentellen Versuchen (Lawson et al. 1990). Die meisten Ergebnisse über die mikrogliale Population im Rückenmark stammen aus tierexperimentellen Arbeiten oder aus Untersuchungen des fötalen humanen Rückenmarks. Deshalb sollen in dieser Arbeit erstmals die Verteilung und das grundlegende Proteinexpressionsmuster der Mikroglia im humanen, nicht-pathologisch alterierten Rückenmark untersucht werden. Zusätzlich sollen die erhobenen Referenzdaten der normalen Rückenmarksgewebe auf ihre Validität im Vergleich zu pathologischen Rückenmarkern untersucht werden.

### **4.1 Proteinexpression der Normalfälle**

#### **4.1.1 Homogene Verteilung der Mikroglia im Rückenmark**

Auch in der vorliegenden Arbeit finden sich grundlegende Unterschiede zu den tierexperimentell gewonnenen Daten. So fand sich beispielsweise bei Ratten die höchste Konzentration an Mikroglia im lumbalen Rückenmark, sowohl unter pathologischen, als auch unter normalen Bedingungen (Lassmann et al. 1993, Vass und Lassmann 1990). Die Regionen höchster mikroglialer Dichte stimmten mit den Gebieten überein, in denen sich bei der Induktion einer EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalitis) die meisten inflammatorischen Infiltrate fanden. Daher sahen die Autoren die unterschiedliche Dichte an Mikroglia als Grund für den bevorzugten Befall bestimmter ZNS-Regionen bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen des ZNS an. Außerdem zeigte sich in tierexperimentellen Versuchen auf vergleichbare Stimuli eine stärkere inflammatorische Reaktion des Rückenmarks im Vergleich zum Großhirn (Schnell et al. 1999a, Schnell et al. 1999b). Möglicherweise findet sich die Ursache hierfür in der

höhere Dichte an Mikroglia im Rückenmark und der damit verbundenen Freisetzung einer größeren Menge an proinflammatorischen Zytokinen.

Im humanen Rückenmark findet sich hingegen keine Zunahme in kaudaler Richtung. Die Arbeiten, die am humanen fötalen Rückenmark durchgeführt wurden, zeigten tendenziell ähnliche Ergebnisse wie das in dieser Arbeit untersuchte Gewebe des adulten Rückenmarks. Bei Studien des fötalen Rückenmarks fand sich ebenfalls eine homogene mikrogliale Verteilung im Rückenmark (Rezaie und Male 1999, Rezaie et al. 1999, Wierzba-Bobrowicz et al. 2001). Schmitt et al. (2000) beschrieben in der Kontrollgruppe ihrer Arbeit eine höhere Dichte MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia in der weißen Substanz, ohne dass diese exakt quantifiziert wurden. Bei den zusätzlich mit Antikörpern gegen CD68 durchgeführten immunhistochemischen Versuchen ergaben sich hingegen keine Unterschiede in der regionalen Verteilung.

Mittelbronn et al. (2001) fanden im humanen ZNS eine Zunahme der Mikroglia in Richtung des Rhombenzephalons, mit den höchsten Werten im Pons (13,4 % der Gesamtzellzahl) und in der Medulla oblongata (16,6 % der Gesamtzellzahl). Diese rhombenzephalen Werte sind mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit vergleichbar. Somit zeigen die Mikroglia im Rückenmark keine weitere Zunahme in kaudaler Richtung, sondern bleiben auf dem Niveau, welches sich bereits in der Medulla oblongata findet. Hierbei gilt es zu beachten, dass sich im Rückenmark, trotz des Fehlens einer weiteren Zunahme, eine wesentlich höhere Dichte an Mikroglia findet als in den kortikalen Großhirnregionen. Möglicherweise lässt sich im humanen Rückenmark aufgrund der höheren mikroglialen Dichte, ähnlich wie in tierexperimentellen Studien, eine verstärkte inflammatorische Reaktion auf pathologische Stimuli nachweisen (Schnell et al 1999a, Schnell et al 1999b).

Beim Vergleich der einzelnen Rückenmarksregionen fanden sich nur vereinzelt Regionen mit einer signifikant höheren mikroglialen Dichte. Es fällt jedoch auf, dass bei diesen Regionen bis auf eine Ausnahme (CD68, oberes Cervikalmark), jedes Mal das Gebiet um den Zentralkanal eine erhöhte mikrogliale Dichte gegenüber den anderen Regionen aufweist. Es gilt zu bedenken, dass in dieser Region aufgrund der geringen Fläche jeweils nur vier Gesichtsfelder ausgewertet wurden. Dadurch ist eine größere Gefahr zufälliger Signifikanzen gegeben. Jedoch fanden auch andere Arbeitsgruppen

Hinweise für eine höhere mikrogliale Dichte in der Region des Zentralkanals. In ihren Untersuchungen des fötalen Rückenmarks fanden Wierzba-Bobrowicz et al. (2001) MHC-II<sup>+</sup> Zellen welche sich gehäuft in der Umgebung von Blutgefäßen und des Zentralkanals fanden. Banati (2002 und 2003) beschrieb in seinen mittels der Positronen-Emissions-Tomographie durchgeführten Untersuchungen der Mikroglia eine konstitutive Bindung des verwendeten Markers in der Umgebung des Zentralkanals. Er schrieb dies einer geringgradigen Aktivierung der Mikroglia in diesem Gebiet zu. Möglicherweise findet sich an dieser Grenze des Rückenmarkparenchyms zum Liquorkompartiment eine erhöhte immunologische Überwachung durch mikrogliale Zellen. Diese Frage kann jedoch nur durch zukünftige Studien abschließend geklärt werden.

#### **4.1.2 Heterogenität der Proteinexpression auf ruhender Mikroglia**

Im Gegensatz zur relativ homogenen regionalen Verteilung der Mikroglia, fanden sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expression der untersuchten Proteine auf mikroglialen Zellen.

##### **4.1.2.1 Proteine mit hohen Expressionsraten: CD68, MHC-II**

In allen untersuchten Regionen fand sich eine Expression von MHC-II und CD68 auf ruhenden ramifizierten Mikroglia. MHC-II wies von allen untersuchten Proteinen den höchsten Expressionsgrad auf. Der Anteil MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia machte 9,8 % bis 17,5 % der Gesamtzellzahl aus. Die Werte für CD68 lagen zwischen 9,3 % bis 15,2 % und unterschieden sich bis auf die Seitensäulen des oberen und unteren Thorakalmarks nicht signifikant von der MHC-II-Expression (siehe Diagramme 14 und 15, Seite 103). In den genannten zwei Regionen fanden sich leicht erhöhte Mittelwerte für MHC-II, so dass MHC-II dort signifikant gegenüber CD68 erhöht war.

Für CD68 konnte bereits in mehreren Studien die Expression auf ruhender Mikroglia gezeigt werden (Guillemin und Brew 2004, Hulette et al. 1992, Ulvestad et al. 1994). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der sich CD68 ebenfalls als zuverlässiger Marker für ruhende ramifizierte Mikroglia erwies. Da CD68 eine Rolle beim Transport von Vesikeln zwischen der Plasmamembran und Lysosomen spielt, scheinen diese Transportvorgänge auch in ruhender Mikroglia stattzufinden.

Für MHC-II findet sich ein uneinheitlicheres Bild. Einer Reihe von überwiegend älterer Studien gelang der immunhistochemische Nachweis von MHC-II-Antigenen auf ruhender Mikroglia nicht, wohingegen in neueren Studien der Nachweis selbiger Antigene möglich war (Mattiace et al. 1990). Diese differierenden Ergebnisse sind möglicherweise durch Unterschiede in der Fixationstechnik bedingt. Da eine längere Fixationszeit mit Formalin die zu detektierenden Antigene maskiert oder zerstört, wurden die meisten der älteren Arbeiten an azetonfixierten Kryostatschnitten durchgeführt, welche zu schlechteren morphologischen Ergebnissen führten. Dies hat möglicherweise dazu geführt, dass die Identifizierung MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia nicht gelang. Die positiven Ergebnisse der neueren Arbeiten stammen meist von formalinfixierten Mikrotomschnitten, bei denen die Fixationszeit limitiert wurde. Anhand dieser Tatsachen zeigt sich, wie sehr die Ergebnisse immunhistochemischer Färbungen von der Fixierungsmethode abhängen. Zusätzlich wurde im Laufe der Zeit die Antikörperspezifität erhöht.

Klinische Parameter stellten in den Untersuchungen von Mattiace et al. einen weiteren wichtigen Faktor für die mikrogliale Dichte im ZNS dar. So konnte in dieser Arbeit der von anderen Autoren beschriebene Anstieg der MHC-II-Dichte mit zunehmenden Alter nicht nachgewiesen werden (Landfield et al. 1981, Sheffield und Berman 1998). Vielmehr waren klinische Einflussgrößen, die eine pathologische Alteration des ZNS nach sich zogen, die entscheidenden Faktoren für eine Dichtezunahme MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia. Daher sind Daten, die unter pathologischen Bedingungen gewonnen wurden auch nur bedingt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Die umfangreichste Arbeit, welche die Population der Mikroglia unter nicht pathologischen Bedingungen im humanen ZNS untersuchte, fand mit dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse (Mittelbronn et al. 2001). Auch hier konnte eine konstitutive Expression von MHC-II und CD68 nachgewiesen werden. Das Rückenmark wurde zwar nicht untersucht, jedoch lagen die Werte in der Medulla oblongata für die beiden genannten Proteine auf dem gleichen Niveau wie die in dieser Arbeit beschriebenen Dichten im Rückenmark.

Die Expression von MHC-II-Molekülen im ZNS ist neben Mikroglia auch auf einer Reihe anderer Zellen beschrieben (Ting et al. 1981, Zeinstra et al. 2000). Da in der vorliegenden Arbeit sowohl immunhistochemische als auch morphologische Kriterien

herangezogen wurden, ließen sich die meisten dieser Zellen anhand ihrer Lokalisation und Morphologie mit hinreichender Sicherheit von Mikroglia abgrenzen. Lediglich mit Astrozyten besteht aufgrund ihrer ähnlichen Morphologie eine gewisse Verwechslungsgefahr. Deshalb wurden Doppelfärbungen mit GFAP und MHC-II bzw. CD68 durchgeführt. Dabei fand sich keine MHC-II-Expression auf astrozytären Zellen. Die Expression von MHC-II-Molekülen auf Astrozyten ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Bei einer Reihe von Versuchen, welche *in vitro* durchgeführt wurden, gelang die Induktion von MHC-II auf Astrozyten (Massa et al. 1987, Wong et al. 1984). Experimenten welche die Situation *in vivo* untersuchten, fanden in der überwiegenden Zahl der Fälle, wie in der vorliegenden Arbeit, keine Expression von MHC-II auf Astrozyten (Bo et al. 1994, Hoftberger et al. 2004). In einigen Arbeiten ist jedoch unter pathologischen Bedingungen auch eine MHC-II-Expression auf einer Subpopulation von Astrozyten *in vivo* beschrieben (Zeinstra et al. 2000). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die Induktion der MHC-II-Expression durch aktivierte T-Lymphozyten (Fontana et al. 1984). In Astrozyten lässt sich die Expression von MHC-II-Antigenen durch Neurotransmitter unterdrücken, was ebenfalls ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Studien sein könnte (Frohmann et al. 1988, Lee et al. 1992). Somit findet sich *in vivo* eine Expression von MHC-II-Molekülen nur auf reaktiven Astrozyten, welche im Vergleich zur Mikroglia in einem wesentlich geringerem Umfang stattfindet. Da über den MHC-II Rezeptor antigenpräsentierende Prozesse vermittelt werden, unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Schlüsselrolle der Mikroglia bei der immunologischen Kontrolle des ZNS.

Die oben genannten Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Mikrogliapopulation hin, welche MHC-II und CD68 konstitutiv exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass auch in ruhender Mikroglia Antigenpräsentation und lysosomalen Transportfunktionen stattfinden können. Dadurch sind die beiden Proteine hervorragend als Marker für die ruhende ramifizierte Mikroglia geeignet. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen somit eine wichtige Referenz für zukünftige Studien mikroglialer Aktivierungsvorgänge dar.



#### 4.1.2.2 Proteine mit geringen Expressionsraten: AIF-1, IL-16

IL-16 (LCF) spielt als natürlicher Ligand des CD4-Rezeptors eine wichtige Rolle bei proinflammatorischen Prozessen und der Aktivierung von T-Lymphozyten. Des Weiteren besitzt es chemotaktische Eigenschaften und wirkt inhibitorisch auf eine Verbreitung von HIV-1. Die Beteiligung von IL-16 ist bereits bei einer Reihe von Erkrankungen des ZNS nachgewiesen worden (Guo et al. 2004, Schwab et al. 2001b, Zhao et al. 2004). Außerdem spielt IL-16 eine Rolle bei der Entwicklung des ZNS. Im humanen fetalen ZNS fand sich zwischen der 11. und 20. Gestationswoche ein kontinuierlicher Anstieg der IL-16 Expression in neuronalen Proliferations-, Migrations- und Differenzierungszone. Damit dient IL-16 möglicherweise der Chemoattraktion mikroglialer Vorläuferzellen (Schwab et al. 2001c). Im Gegensatz zu Ratten fand sich die Expression von IL-16 im normalen humanen ZNS auf einer Subpopulation mikroglialer Zellen, welche unter pathologischen Bedingungen aktiviert werden kann (Guo et al. 2004, Mittelbronn et al. 2001). Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die im Vergleich zu MHC-II und CD68 geringeren Werte an IL-16<sup>+</sup> Mikroglia deuten auf eine mikrogliale Subpopulation hin und liegen in etwa auf dem Niveau, welches von Mittelbronn et al. in der Medulla oblongata beschrieben wurde.

AIF-1 wurde in zahlreichen Arbeiten als mikroglialer Aktivierungsmarker beschrieben, der in normalem ZNS nur in geringem Umfang nachweisen lässt, und unter pathologischen Bedingungen in verstärktem Maße exprimiert wird (Postler et al. 2000, Schluesener et al. 1998b, Schwab et al. 2001a). Allerdings beschreiben einige Arbeiten eine konstitutive Expression von AIF-1 auf Mikroglia. In humanem Gewebe konnte der bei Ratten beschriebene Anstieg der AIF-1-Expression bei Traumata nicht nachgewiesen werden (Beschorner et al. 2000, Schwab et al. 2001a). Des Weiteren fand die bereits beschriebene Arbeit von Mittelbronn et al. eine beträchtliche konstitutive Expression von AIF-1 im normalen ZNS, die in etwa auf dem Niveau der bereits besprochenen Proteine MHC-II und CD68 lag. In dieser Arbeit fand sich eine geringe Dichte AIF-1<sup>+</sup> Zellen, welche bei der überwiegenden Zahl der pathologischen Fälle eine Hochregulation erfuhr. Dies unterstützt die These, welche AIF-1 als mikroglialen

Aktivierungsmarker beschreibt. Allerdings ist zu bedenken, dass diese Erhöhung nicht bei allen pathologischen Fällen beobachtet werden konnte. Dies deutet auf eine unterschiedliche Regulierung von AIF-1 bei bestimmten Pathologien hin. So konnte im Gegensatz zu traumatischen Erkrankungen eine Erhöhung von AIF-1 bei ischämischen und neoplastischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Beschorner et al. 2000, Deininger et al. 2000b, Postler et al. 2000).

Die unterschiedlichen Expressionslevel von AIF-1 im Großhirn und Rückenmark lassen weiterhin auf eine regional unterschiedliche Regulation des Proteins schließen. So sind beispielsweise diskrete morphologische Unterschiede der Mikroglia in verschiedenen Regionen des ZNS beschrieben (Lawson et al. 1990). Möglicherweise findet sich diese morphologische Heterogenität auch auf der Ebene der Proteinexpression wiederfindet.

Diese kontroversen Ergebnisse unterstreichen, wie wichtig es ist, detaillierte Kenntnisse über die Proteinexpression von Mikroglia unter nicht pathologischen Bedingungen zu besitzen.

Die im Vergleich zu MHC-II und CD68 geringeren Werte an AIF-1<sup>+</sup> und IL-16<sup>+</sup> Mikroglia deuten auf eine mikrogliale Subpopulation hin, welche unter pathologischen Vorgängen aktiviert werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen damit eine wichtige Referenz für die neuropathologische Diagnostik und für zukünftige Studien mikroglialer Aktivierungsvorgänge dar.

#### **4.1.2.3 Nicht exprimierte Proteine: MRP-8, MRP-14**

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Expression von MRP-8 und MRP-14 im Parenchym des normalen Rückenmarks detektiert werden. In Blutgefäßen fand sich dagegen eine deutliche Anfärbung von Zellen der weissen Reihe. Dies entspricht den Ergebnissen, welche andere Autoren im normalen ZNS fanden (Abe et al. 1999, Beschorner et al. 2000, Mittelbronn et al. 2001). Bei einer Reihe von Pathologien ist eine starke Expression von MRP-8 und MRP-14 beschrieben. So ist die Expression der beiden Proteine sowohl bei traumatischen, als auch bei entzündlichen Erkrankungen wie der HTLV-1 (Human T-cell Lymphotropic Virus type 1) assoziierten Myelopathie, der zerebralen Malaria und bei akuten bakteriellen Enzephalitiden beschrieben (Abe et al. 1999, Akiyama et al. 1994, Beschorner et al. 2000, Engel et al. 2000, Schluesener et al. 1998a). Darüber hinaus findet sich eine Beteiligung der beiden Proteine bei

ischämischen Läsionen und bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer (Akiyama et al. 1994, Postler et al. 1997). Daher wurden die beiden kalziumbindenden Proteine bisher als zuverlässige Marker für pathologische Stimuli im ZNS angesehen.

## 4.2 Proteinexpression der pathologischen Fälle

### 4.2.1 Expression von MRP-8 und MRP- 14

Wie bereits beschrieben wurden MRP-8 und MRP-14 bisher als zuverlässige Marker für pathologische Stimuli angesehen, da sie bei einer Reihe von Erkrankungen von Mikroglia exprimiert werden, sich unter physiologischen Bedingungen jedoch nicht auf selbigen nachweisen lassen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, fanden sich in den Untersuchungen dieser Arbeit lediglich in zwei pathologischen Fälle vereinzelt MRP-8<sup>+</sup> und MRP-14<sup>+</sup> Mikroglia (Fall 19 und 21). Bei ischämischen Erkrankungen des ZNS ist eine zeitlich begrenzte Erhöhung der MRP-Proteine beschrieben. Bereits nach drei Tagen waren die zunächst erhöhten Werte nicht mehr nachweisbar (Postler et al. 1997). Auch bei anderen nicht das ZNS betreffenden Erkrankungen ist eine zeitlich begrenzte, bzw. von der Krankheitsaktivität und Therapie abhängige Erhöhung der beiden Proteine beschrieben (Bhardwaj et al. 1992, Herndon et al. 2003, Youssef et al. 1999). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei traumatischen Veränderungen eine verzögerte, dafür aber über den gesamten untersuchten Zeitraum von 6 Monaten anhaltende Erhöhung der beiden kalziumbindenden Proteine (Beschoner et al. 2000, Engel et al. 2000). Dies spricht für eine unterschiedliche Regulation der beiden MRP-Proteine bei diesen beiden Erkrankungen. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv der pathologischen Fälle beinhaltet keine traumatischen Erkrankungen. Möglicherweise zeigt sich bei den hier untersuchten Pathologien eine wie bei ischämischen Veränderungen zeitlich kurz begrenzte Erhöhung von MRP-8 und MRP-14. Da die überwiegende Anzahl der untersuchten Patienten an chronischen Erkrankungen litt, oder bereits mit einer Behandlung begonnen wurde, ist der Zeitraum, in dem eine Erhöhung der MRP-Proteine beobachtet werden kann, möglicherweise bereits überschritten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine fehlende Expression von MRP-8 und MRP-14 pathologische Veränderungen nicht mit absoluter Sicherheit ausschliessen kann. Nur unter Berücksichtigung der Proteinkinetik der jeweiligen Erkrankung können Aussagen über pathologische Veränderungen gemacht werden. Der positive Nachweis der beiden kalziumbindenden Proteine ist jedoch als eindeutiges Zeichen für pathologische Vorgänge zu werten.

#### **4.2.2 Zunahme der Proteinexpression auf Mikroglia**

Für alle der vier untersuchten Proteine fanden sich deutlich erhöhte Dichten von Mikroglia. Dabei ergab sich für die untersuchten Proteine ein ähnliches Verteilungsmuster wie in der Normalpopulation. Die höchsten Dichten wurden von MHC-II<sup>+</sup> und CD68<sup>+</sup> Mikroglia erreicht. Für MHC-II fand sich die höchste Dichte mit 45,8 % der Gesamtzellzahl und für CD68 mit 45,4 % der Gesamtzellzahl. Für AIF-1 und IL-16 fanden sich ebenfalls erhöhte Zellzahlen, welche jedoch nicht das Niveau von CD68 und MHC-II erreichten. Die höchste Dichte für AIF-1 lag bei 34,6 % aller parenchymaler Zellen und für IL-16 bei 26,4 % aller parenchymaler Zellen. Daher ist eine Zunahme der Dichte AIF-1<sup>+</sup> und IL-16<sup>+</sup> Mikroglia im Vergleich zu MHC-II und CD68 bereits bei niedrigeren Werten als pathologisch zu betrachten. MHC-II und CD68 erwiesen sich als zuverlässige Marker um ruhende ramifizierte Mikroglia zu detektieren. Sie sind allerdings nicht spezifisch für diese, da die beiden Proteine sich auch auf aktivierter, morphologisch jedoch unterscheidbarer Mikroglia finden. Diese Ergebnisse bieten daher eine wichtige Referenz für zukünftige Studien und für die Diagnostik neuropathologischer Erkrankungen.

#### **4.2.3 Beurteilung der pathologischen Fälle anhand der Referenzintervalle**

Zur Evaluation der Proteinexpression unter pathologischen Bedingungen wurde ein Referenzintervall errechnet. Mit selbigem wurde dann überprüft, wie viele Werte der einzelnen pathologischen Fälle außerhalb dieses Referenzbereichs liegen. Dadurch konnte evaluiert werden, inwiefern sich die aus den Normalfällen gewonnenen Daten zur Abgrenzung pathologischer Fälle eignen.

In zwölf der fünfzehn untersuchten Fälle fanden sich Werte, welche eindeutig außerhalb des Referenzintervalls lagen. Dabei zeigten sich diffuse und selektive Erhöhungen sowie in drei Fällen erniedrigte Werte eines oder mehrerer der untersuchten Proteine. Bei drei Fällen war keine mikrogliale Reaktion nachweisbar.

##### **4.2.3.1 Fälle mit diffuser Zunahme mikroglialer Proteinexpression**

Insgesamt sechs der fünfzehn untersuchten Patienten zeigten Werte, die deutlich außerhalb des Referenzbereichs lagen. Allerdings waren nicht alle Proteine im gleichen Masse erhöht. Hierbei gilt es zu bedenken, dass es sich bei den untersuchten Fällen um

Erkrankungen unterschiedlichster Ätiologie und Erkrankungsdauer handelt. So ist beispielsweise für AIF-1 wie bereits erwähnt ein Anstieg bei ischämischen und neoplastischen, nicht jedoch bei traumatisch bedingten Erkrankungen nachgewiesen worden (Beschoner et al. 2000, Deininger et al. 2000b, Postler et al. 2000). Möglicherweise sind die unterschiedlichen Erhöhungen der Proteine durch ein unterschiedliches Aktivierungsmuster bei den einzelnen Erkrankungen bedingt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der in dieser Arbeit etablierte Referenzbereich zur Identifikation von pathologischen Ereignissen unterschiedlichster Ätiologie geeignet ist. Allerdings sollten zu diesem Zweck immer mehrere Proteine untersucht werden, da es abhängig von der jeweiligen Erkrankung zur Erhöhung einzelner Proteine kommen kann. Die Etablierung des Referenzintervalls weiterer geeigneter Proteine ermöglicht unter Umständen eine noch exaktere Abgrenzung pathologischer Ereignisse von Rückenmark ohne pathologische Alterationen. Die erarbeiteten Proteinexpressionmuster stellen eine wichtige Referenz für zukünftige Studien der Aktivierungsvorgänge von Mikroglia und für die Diagnostik pathologischer Veränderungen dar.

#### **4.2.3.2 Fälle mit selektiver Zunahme mikroglialer Proteinexpression**

Bei den Fällen mit bahnspezifischen Pathologien kam es zu einer selektiven Erhöhung der mikroglialen Dichte in den jeweils betroffenen Gebieten. Bei der selektiven Erhöhung mikroglialer Zellen in den kortikospinalen Bahnen der beiden Fälle mit amyotropher Lateralsklerose handelt es sich um ein Phänomen, welches bereits von einer Reihe von Autoren beschrieben wurde (Engelhardt und Appel 1990, Kawamata et al. 1992). Bei zwei weiteren Fällen (Fall 17 und 19) fand sich eine erhöhte Proteinexpression in der Hinter- und Seitensäule durch eine weiter kranial gelegene Läsion der Axone in den entsprechenden Gebieten. Dieser selektive Befall von Bahnen in der weissen Substanz des Rückenmarks ist ebenfalls ein bekanntes Phänomen (Koshinaga und Whittemore 1995, Popovich et al. 2002). Dies deutet auf eine räumlich begrenzte Aktivierung von Mikroglia am Ort der Schädigung hin. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang das Ausbleiben einer Reaktion von AIF-1 und IL-16 in den beiden zuletzt genannten Fällen und lässt auf unterschiedliche Ursachen für die Schädigung der axonalen Bahnen schließen. Da es sich bei AIF-1 und IL-16 um proinflammatorisch wirksame Indikatoren für eine mikrogliale Aktivierung handelt,

scheinen diese, wie es bereits für andere Moleküle beschrieben wurde, zur inflammatorischen Reaktion bei der amyotrophen Lateralsklerose beizutragen (Rauschka et al. 2003). Bei denen beiden anderen Fällen kam es durch die unterschiedliche Pathogenese der Läsion der Bahnen anscheinend nicht zu einer Aktivierung der dieser beiden proinflammatorischen Moleküle, sondern lediglich zu einer vermehrten Expression von MHC-II und CD68. Daher scheinen MHC-II und CD68 Indikatoren für eine weniger spezifische Proliferation und Vermehrung von Mikroglia und Makrophagen zu sein. Die Untersuchung an fixiertem Gewebe lässt jedoch nur begrenzte Einblicke in die Funktion dieser Proteine zu. Für ein besseres Verständnis ihrer Rolle in der Aktivierung von Mikroglia sind weitere Untersuchungen an unfixiertem Gewebe nötig.

Der Fall des Guillain-Barré-Syndroms zeigte einen selektiven Anstieg CD68<sup>+</sup> Zellen in den Hintersträngen. Diese Veränderung der Hinterstränge ist ebenfalls bereits beschrieben und wird als Sekundärveränderung in der Folge der pathologischen Affektion des peripheren Nervensystems betrachtet (Maier et al. 1997). Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz zu dem lokalisierten Anstieg von CD68 eine diffuse Erhöhung von IL-16. Dies spricht für eine unterschiedliche Regulation der beiden Proteine bei dieser Erkrankung.

Die genannten Ergebnisse zeigen, dass sich der in dieser Arbeit etablierte Referenzbereich auch zur Detektion lokal begrenzter pathologischer Veränderungen eignet.

#### **4.2.3.3 Fälle ohne mikrogliale Reaktion**

Bei drei Patienten fand sich die überwiegende Zahl der Werte innerhalb des Referenzintervalls. Bei den untersuchten Fällen sollte beachtet werden, dass es sich unter anderem auch um chronische Erkrankungen handelt. Mikroglia zeigen ein gewisses zeitliches Aktivierungsmuster. Eine Hypertrophie findet sich während der ersten 24 Stunden, gefolgt von der Proliferation der Mikroglia ab dem zweiten Tag welche schliesslich ihr Maximum zwischen dem vierten und siebten Tag erreicht (Gehrmann et al. 1991, Morioka et al. 1991). Dabei handelt es sich jedoch um einen selbstlimitierenden Prozess, der auch nach schweren Schädigungen innerhalb eines Monats nachlässt (Koshinaga and Whitemore 1995). So kommt es bei einer längeren

Dauer der Erkrankung zu einer Abnahme der Zytokinexpression (Umehara et al. 1994). Da es sich bei den Fällen 13 (Vaskuläre Myelopathie), 24 (Infarkt Stadium II) und 25 (Cephalgien mit unklaren Synkopen) um bereits länger andauernde Erkrankungen handelt, ist das Maximum der mikroglialen Reaktion möglicherweise bereits überschritten und auf ein Niveau zurückgegangen bei dem eine Erhöhung nicht mehr nachweisbar ist.

#### **4.2.3.4 Fälle mit erniedrigter mikroglialer Proteinexpression**

Bei drei Patienten ergaben sich Werte, die größtenteils unterhalb des Referenzbereichs lagen. Bei Patient 11 handelt es sich um einen Fall von multipler Sklerose, bei dem sich erniedrigte Werte für AIF-1 und IL-16 fanden. Diese Ergebnisse stehen möglicherweise in Zusammenhang mit einer bei dieser Erkrankung üblichen Therapie mit Kortikosteroiden. (Drew und Chavis 2000, Vijayan und Cotman 1987, Wu et al. 2001).

Bei den Patienten 11 und 12 handelt es sich um die ältesten untersuchten Fälle, bei denen die Sektion bereits 1996 stattfand. Die lange Aufbewahrung in Paraffinblöcken und die damals längere Fixationszeit in Formalin bieten eine weitere mögliche Ursache für die erniedrigten Werte dieser Fälle. Wie bereits beschrieben, führt eine längere Fixation mit Formalin zu einer Maskierung bzw. Zerstörung der zu detektierenden Antigene. Es ist ebenfalls bekannt, dass längere Aufbewahrung von formalinfixiertem Gewebe zu einem Nachlassen der Reaktivität der Antigene mit den bei der Immunhistochemie verwendeten Antikörpern führt. Somit kann nicht abschließend geklärt werden, ob sich die gefundenen erniedrigten Werte dieser beiden Fälle aufgrund technischer Probleme oder aufgrund der Pathomechanismen der einzelnen Erkrankung ergeben.

Bei einem Fall einer Meningitis (Fall 16) fanden sich erwartungsgemäß erhöhte Werte der mikroglialen Induktionsmarker AIF-1 und IL-16. Überraschenderweise war die Dichte der MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia erniedrigt. Bei diesem Fall kam es zu einer septischen Streuung der Meningitis. Es ist ein bekanntes Phänomen, dass es bei septischen Erkrankungen zu Störungen des Immunsystems kommt, welche als auch als „Immunoparalyse“ bezeichnet werden (Volk et al. 1991). Im Zuge dieser Veränderungen kommt es zu einer Reduktion der MHC-II-Expression auf Monozyten (Docke et al. 1997). Es ist auch eine Reduktion MHC-II-positiver Zellen wie



beispielsweise der Dendritischen Zellen beschrieben (Hotchkiss et al. 2002). Diese Reduktion der Zellen wird auf apoptotische Vorgänge zurückgeführt. Möglicherweise kommt es in der Population der Mikroglia zu ähnlichen Vorgängen, welche eine Erklärung für die erniedrige Dichte der MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia liefern würde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der etablierte Referenzbereich sich ebenfalls hervorragend zur Detektion verminderter mikrogialer Dichten eignet.

### 4.3 Schlussfolgerungen

Wichtige Schlussfolgerungen dieser Arbeit sind:

- 1) Im Gegensatz zum Großhirn findet sich im Rückenmark eine homogene Verteilung der Mikroglia. Die Dichte an Mikroglia im Rückenmark zeigt keine weitere Zunahme in kaudaler Richtung, sondern bleibt auf dem Niveau, welches bereits in der Medulla oblongata beschrieben wurde (Mittelbronn et al. 2001). Hierbei gilt es zu beachten, dass sich im Rückenmark, trotz des Fehlens einer weiteren Zunahme, eine wesentlich höhere Dichte an Mikroglia findet als in den kortikalen Großhirnregionen.
- 2) MHC-II und CD68 erweisen sich als zuverlässige Marker für die ruhende, ramifizierte Mikroglia. Die beiden Proteine sind jedoch nicht spezifisch für diese, da sie sich ebenfalls auf aktivierter Mikroglia finden, welche jedoch anhand morphologischer Kriterien unterscheidbar ist.
- 3) AIF-1 und IL-16 werden im humanen Rückenmark von einer Subpopulation mikroglialer Zellen exprimiert. Unter pathologischen Bedingungen erfolgt eine Hochregulation der beiden Proteine. Diese Hochregulation kann jedoch abhängig von der zugrundeliegenden Pathologie stark unterschiedlich ausfallen oder sogar ganz ausbleiben.
- 4) Es finden sich unterschiedliche Expressionsniveaus für AIF-1 im Großhirn und Rückenmark. Dies deutet auf eine regional unterschiedliche Regulation des Proteins hin.
- 5) MRP-8 und MRP-14 sind als Marker für pathologische Ereignisse geeignet, da sie im normalen Rückenmark nicht exprimiert werden und nur unter pathologischen Bedingungen nachweisbar sind. Allerdings sollte beachtet werden, dass der Nachweis nicht bei allen Pathologien und nur zeitlich begrenzt gelingt. Durch einen fehlenden Nachweis kann ein pathologischer Prozess somit nicht sicher ausgeschlossen werden. Der positive Nachweis ist jedoch als eindeutiges Zeichen für einen pathologischen Vorgang zu werten.
- 6) Der in dieser Arbeit etablierte Referenzbereich ist zur Erfassung von Veränderungen der mikroglialen Proteinexpression geeignet. Neben einer Erhöhung der Dichte an Mikroglia fanden sich zum Teil auch Fälle mit einer verminderten Dichte. Des Weiteren lassen sich mit Hilfe des Referenzbereichs sowohl diffuse, als auch lokal begrenzte pathologische Veränderungen detektieren. Er erweist sich dadurch als wichtige Referenz für die Evaluation pathologischer Ereignisse im humanen Rückenmark.

#### 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse die in dieser Arbeit gewonnen wurden, werfen viele neue Fragen und Anregungen auf, die es in zukünftigen Studien zu klären gilt:

1. Es findet sich im humanen Rückenmark eine wesentlich höhere Dichte an Mikroglia. Hat dies auch funktionelle Auswirkungen? So fanden Schnell et al. 1999 beispielsweise in tierexperimentellen Studien Hinweise für eine stärkere inflammatorische Reaktion im Rückenmark.
2. AIF-1 wird im Großhirn und Rückenmark in unterschiedlich starkem Ausmaß auf Mikroglia exprimiert. Finden sich diese Unterschiede auch für andere Proteine und welche funktionellen Konsequenzen haben sie?
3. Es konnte gezeigt werden, dass MHC-II, CD68, AIF-1 und IL-16 bei verschiedenen Pathologien starke Unterschiede in der Zunahme der Expression zeigen. Welche Unterschiede gibt es in den Aktivierungskaskaden der einzelnen Proteine?
4. AIF-1 und IL-16 werden auf einer Subpopulation der Mikroglia exprimiert. Gelingt eine genaue Charakterisierung der Aufgaben und Funktionen dieser und anderer Subpopulationen der Mikroglia?
5. In dieser Arbeit fanden sich Hinweise für Erkrankungen die mit erniedrigten Dichten an Mikroglia einhergehen. Lässt sich dies in weiteren Studien bestätigen? Gibt es bei diesen Erkrankungen eventuell Faktoren, welche zu einer Suppression der Mikroglia führen und lassen sich diese eventuell therapeutisch nutzen?
6. Mikroglia stehen im Verdacht bei einer Reihe von Erkrankungen einen schädigende Einflüsse zu haben, wie zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose und der amyotrophen Lateralsklerose. Gelingt es diese Einflüsse zu inhibieren?
7. Mikroglia besitzen auch neuroprotektive und gewebserhaltende Eigenschaften. Gelingt es diese Eigenschaften zu stimulieren und somit therapeutisch einzusetzen?

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mikroglia ist die immunologische Haupteffektorzelle im ZNS und ist bei nahezu jedem pathologischen Vorgang innerhalb des ZNS beteiligt, unter anderem bei entzündlichen, neoplastischen, metabolischen, vaskulären, traumatischen und degenerativen Erkrankungen. Trotz dieser zentralen Rolle der Mikroglia ist ihre Verteilung und Proteinexpression im normalen menschlichen Rückenmark bisher kaum untersucht.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit 10 Fälle mit neuropathologisch nicht veränderten Rückenmark untersucht, um eine Referenz für die Verteilung und Proteinexpression der Mikroglia in einer Normalpopulation zu erhalten. Diese Referenz wurde dann mit 15 Fällen mit den verschiedensten pathologischen Veränderungen verglichen. Zu diesem Zweck wurde jedes Rückenmark auf acht verschiedene Höhen in jeweils drei Gebieten der Weißen und zwei Gebieten der Grauen Substanz immunhistochemisch untersucht. Für die Untersuchung wurden Antikörper gegen Proteine gewählt, welche von Mikroglia konstitutiv (MHC-II, CD68, AIF, IL-16) oder fakultativ (MRP-8, MRP-14) exprimiert werden.

Im Gegensatz zum Großhirn mit deutlichen regionalen Unterschieden, fand sich im Rückenmark eine homogene Verteilung der Mikroglia. Die höchste Dichte ergab sich hierbei für MHC-II<sup>+</sup> Mikroglia (bis zu 17% der Gesamtzellpopulation), welche sich nicht signifikant von der auf dem selben Niveau liegenden Dichte der CD68<sup>+</sup> Mikroglia (bis zu 15,2 % der Gesamtzellpopulation) unterschied. Die Expressionsgrade der beiden Proteine AIF-1 (bis zu 5,7 % der Gesamtzellpopulation) und IL-16 (bis zu 6 % der Gesamtzellpopulation) zeigten ebenfalls keine statistisch nachweisbaren Unterschiede. Die absolute Zahl an AIF-1<sup>+</sup> und IL-16<sup>+</sup> Mikroglia war jedoch im Vergleich mit den beiden oben genannten Antikörpern signifikant niedriger. Bei den Normalfällen zeigte sich keine parenchymale oder perivaskuläre Expression von MRP-8 und MRP-14.

Diese Daten bildeten die Basis für die Etablierung eines Referenzbereichs und dem Vergleich des selbigen mit den 15 pathologisch veränderten Rückenmarksgeweben. Hier zeigten sich deutlich erhöhte Dichten mikroglialer Zellen, welche bis zu 45% der Gesamtzellpopulation ausmachten. Auch bei dem pathologischen veränderten

Rückenmarksgewebe fanden sich lediglich bei zwei Fällen vereinzelt MRP-8<sup>+</sup> und MRP-14<sup>+</sup> Mikroglia.

Es zeigten sich insgesamt vier verschiedene Reaktionsmuster der Mikroglia auf pathologische Stimuli. Zu einem kommt es bei Erkrankungen, welche nicht an neuroanatomische Kompartimente gebunden sind, zu einer diffusen Erhöhung mikroglialer Zellen im gesamten Rückenmark. Bei den Fällen mit bahnspezifischen Pathologien kam es zu einer selektiven Erhöhung der mikroglialen Dichte in den jeweils betroffenen Gebieten. So kam es beispielsweise bei Fällen mit amyotropher Lateralsklerose zur selektiven Erhöhung mikroglialer Zellen in den kortikospinalen Bahnen. Bei drei Fällen kam es zu keiner Vermehrung der Mikroglia, in drei weiteren Fällen lies sich sogar eine verminderte mikrogliale Dichte nachweisen. Des weitern fanden sich Hinweise für eine unterschiedliche Regulation der untersuchten Proteine bei den einzelnen Erkrankungen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Informationen über die Verteilung und Proteinexpression der Mikroglia dienen als wichtige Referenz für eine zukünftige Untersuchung und Diagnostik pathologischer Vorgänge innerhalb des menschlichen Rückenmarks.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe M, Umehara F, Kubota R, Moritoyo T, Izumo S, Osame M (1999) Activation of macrophages/microglia with the calcium-binding proteins MRP14 and MRP8 is related to the lesional activities in the spinal cord of HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol* 246: 358-364
2. Akiyama H, Ikeda K, Katoh M, McGeer EG, McGeer PL (1994) Expression of MRP14, 27E10, interferon-alpha and leukocyte common antigen by reactive microglia in postmortem human brain tissue. *J Neuroimmunol* 50: 195-201
3. Alexander DR (2000) The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin Immunol* 12: 349-359
4. Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117: 145-152
5. Alzheimer A (1904) Histologische Studien zur Differentialdiagnose der progressiven Paralyse. *Histopath Arb Nissl-Alzheimer* 1: 18-314
6. Arai H, Lee VM, Messinger ML, Greenberg BD, Lowery DE, Trojanowski JQ (1991) Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Ann Neurol* 30: 686-693
7. Arends YM, Duyckaerts C, Rozemuller JM, Eikelenboom P, Hauw JJ (2000) Microglia, amyloid and dementia in alzheimer disease. A correlative study. *Neurobiol Aging* 21: 39-47
8. Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R (1995) HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 378: 563
9. Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-118
10. Banati RB, Graeber MB (1994) Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci* 16: 114-127
11. Banati RB (2002) Visualising microglial activation in vivo. *Glia* 40: 206-217
12. Banati RB (2003) Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in the brain. *Br Med Bull* 65: 121-131
13. Barcikowska M, Liberski PP, Boellaard JW, Brown P, Gajdusek DC, Budka H (1993) Microglia is a component of the prion protein amyloid plaque in the Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* 85: 623-627
14. Baron M, Gallego A (1972) The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 128: 42-57
15. Baron P, Bussini S, Cardin V, Corbo M, Conti G, Galimberti D, Scarpini E, Bresolin N, Wharton SB, Shaw PJ, Silani V (2005) Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 32: 541-544
16. Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD (1994) Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic

- relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 38: 365-375
17. Becher B, Antel JP (1996) Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia* 18: 1-10
  18. Berger AC, Tang G, Alexander HR, Libutti SK (2000) Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived cytokine that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis. *J Immunother* 23: 519-527
  19. Bertolotto A, Agresti C, Castello A, Manzardo E, Riccio A (1998) 5D4 keratan sulfate epitope identifies a subset of ramified microglia in normal central nervous system parenchyma. *J Neuroimmunol* 85: 69-77
  20. Beschoner R, Engel S, Mittelbronn M, Adjodah D, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2000) Differential regulation of the monocytic calcium-binding peptides macrophage-inhibiting factor related protein-8 (MRP8/S100A8) and allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 100: 627-634
  21. Bhardwaj RS, Zotz C, Zwadlo-Klarwasser G, Roth J, Goebeler M, Mahnke K, Falk M, Meinardus-Hager G, Sorg C (1992) The calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 form a membrane-associated heterodimer in a subset of monocytes/macrophages present in acute but absent in chronic inflammatory lesions. *Eur J Immunol* 22: 1891-1897
  22. Bo L, Mork S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD (1994) Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 51: 135-146
  23. Boll G (1874) Zur Histologie und Histiogenese der nervösen Zentralorgane. *Arch Psychiat* 4: 1-138
  24. Brabeck C, Michetti F, Geloso MC, Corvino V, Goezalan F, Meyermann R, Schluesener HJ (2002) Expression of EMAP-II by activated monocytes/microglial cells in different regions of the rat hippocampus after trimethyltin-induced brain damage. *Exp Neurol* 177: 341-346
  25. Brown DC, Gatter KC (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40: 2-11
  26. Bruce-Keller AJ (1999) Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 58: 191-201
  27. Cajal S Ramón y (1913) Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab del Lab de invest biol* 11: 254
  28. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363
  29. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW (1996) Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 17: 476-481
  30. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW (1997) Interleukin-16. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1231-1234
  31. Chabot S, Williams G, Yong VW (1997) Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferon-beta-1b. *J Clin Invest* 100: 604-612

32. Chen XH, Meaney DF, Xu BN, Nonaka M, McIntosh TK, Wolf JA, Saatman KE, Smith DH (1999) Evolution of neurofilament subtype accumulation in axons following diffuse brain injury in the pig. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 588-596
33. Cheng B, Mattson MP (1991) NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron* 7: 1031-1041
34. Crofford LJ (1997) COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 24 Suppl 49: 15-19
35. Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM (1987) Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 138: 3817-3823
36. Cruikshank WW, Lim K, Theodore AC, Cook J, Fine G, Weller PF, Center DM (1996) IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J Immunol* 157: 5240-5248
37. Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM (2000) Interleukin-16. *J Leukoc Biol* 67: 757-766
38. De Groot CJ, Huppel W, Sminia T, Kraal G, Dijkstra CD (1992) Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia* 6: 301-309
39. Deininger MH, Schluesener HJ (1999) Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. *J Neuroimmunol* 95: 202-208
40. Deininger MH, Kremser PG, Meyermann R, Schluesener HJ (2000a) Focal accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 expressing cells in cerebral malaria. *J Neuroimmunol* 106: 198-205
41. Deininger MH, Seid K, Engel S, Meyermann R, Schluesener HJ (2000b) Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 100: 673-680
42. Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ (2002) The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett* 514: 115-121
43. Deininger MH, Bekure-Nemariam K, Trautmann K, Morgalla M, Meyermann R, Schluesener HJ (2003) Cyclooxygenase-1 and -2 in brains of patients who died with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Mol Neurosci* 20: 25-30
44. Dhenn ST, Hao AJ, Ng YK, Ling EA (2002) Regulatory factors and functions of microglia during development. *Neuroembryology* 105-112
45. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3: 678-681
46. Dolinak D, Smith C, Graham DI (2000) Hypoglycaemia is a cause of axonal injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 448-453
47. Draheim HJ, Prinz M, Weber JR, Weiser T, Kettenmann H, Hanisch UK (1999) Induction of potassium channels in mouse brain microglia: cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* 89: 1379-1390



48. Drew PD, Chavis JA (2000) Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Res Bull* 52: 391-396
49. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073
50. Eager RP, Eager PR (1966) Glial responses to degenerating cerebellar cortico-nuclear pathways in the cat. *Science* 153: 553-555
51. Eder C (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* 275: C327-C342
52. Eder C, Klee R, Heinemann U (1998) Involvement of stretch-activated Cl<sup>-</sup> channels in ramification of murine microglia. *J Neurosci* 18: 7127-7137
53. Eichhorst H (1875) Über die Entwicklung des menschlichen Rückenmarks und seiner Formelemente. *Virchow's Arch* 64: 425-475.
54. Engel S, Wehner HD, Meyermann R (1996) Expression of microglial markers in the human CNS after closed head injury. *Acta Neurochir Suppl* 66: 89-95
55. Engel S, Schluesener H, Mittelbronn M, Seid K, Adjodah D, Wehner HD, Meyermann R (2000) Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol (Berl)* 100: 313-322
56. Engelhardt JI, Appel SH (1990) IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 47: 1210-1216
57. Esiri MM, Morris CS (1991) Immunocytochemical study of macrophages and microglial cells and extracellular matrix components in human CNS disease. 2. Non-neoplastic diseases. *J Neurol Sci* 101: 59-72
58. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, . (1993) PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* 142: 1359-1372
59. Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50: 477-486
60. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 ( Pt 3): 393-399
61. Fischer HG, Eder C, Hadding U, Heinemann U (1995) Cytokine-dependent K<sup>+</sup> channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 64: 183-191
62. Fontana A, Fierz W, Wekerle H (1984) Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307: 273-276
63. Forsum U, Claesson K, Hjelm E, Karlsson-Parra A, Klareskog L, Scheynius A, Tjernlund U (1985) Class II transplantation antigens: distribution in tissues and involvement in disease. *Scand J Immunol* 21: 389-396
64. Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol* 17: 1271-1278
65. Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A (1994) Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 152: 2720-2728

66. Frohman EM, Vayuvegula B, Gupta S, van den NS (1988) Norepinephrine inhibits gamma-interferon-induced major histocompatibility class II (Ia) antigen expression on cultured astrocytes via beta-2-adrenergic signal transduction mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1292-1296
67. Fujita S (1965) An autoradiographic study on the origin and fate of the sub-pial glioblast in the embryonic chick. *J Comp Neurol* 124: 51-59.
68. Fujita S, Kitamura T (1975) Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia. *Acta Neuropathol Suppl (Berl) Suppl 6*: 291-296
69. Geddes JF, Whitwell HL, Graham DI (2000) Traumatic axonal injury: practical issues for diagnosis in medicolegal cases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 105-116
70. Gehrman J, Schoen SW, Kreutzberg GW (1991) Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 82: 442-455
71. Gehrman J, Banati RB, Kreutzberg GW (1993) Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J Neuroimmunol* 48: 189-198
72. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW (1993) Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 160: 139-144
73. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20
74. Giulian D, Vaca K, Noonan CA (1990) Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* 250: 1593-1596
75. Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki PA (1994) The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev Neurosci* 16: 128-136
76. Gluge C (1841) Experimente über Encephalitis. *Abh Physiol Pathol* 2: 13-47.
77. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22: 219-240
78. Grady MS, McLaughlin MR, Christman CW, Valadka AB, Fligner CL, Povlishock JT (1993) The use of antibodies targeted against the neurofilament subunits for the detection of diffuse axonal injury in humans. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 143-152
79. Graeber MB, Streit WJ (1990a) Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1: 2-5
80. Graeber MB, Streit WJ (1990b) Perivascular microglia defined. *Trends Neurosci* 13: 366
81. Griffin R, Illis LS, Mitchell J (1972) Identification of neuroglia by light and electronmicroscopy. *Acta Neuropathol (Berl)* 22: 7-12
82. Groisman GM, Amar M, Schafer I (2002) The histiocytic marker PG-M1 is helpful in differentiating histiocytes and histiocytic tumors from melanomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10: 205-209
83. Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75: 388-397

84. Guo LH, Mittelbronn M, Brabeck C, Mueller CA, Schluesener HJ (2004) Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain. *J Neuroimmunol* 146: 39-45
85. Hameed A, Hruban RH, Gage W, Pettis G, Fox WM, III (1994) Immunohistochemical expression of CD68 antigen in human peripheral blood T cells. *Hum Pathol* 25: 872-876
86. Herndon BL, Abbasi S, Bennett D, Bamberger D (2003) Calcium-binding proteins MRP 8 and 14 in a *Staphylococcus aureus* infection model: role of therapy, inflammation, and infection persistence. *J Lab Clin Med* 141: 110-120
87. Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M (2004) Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 186: 134-144
88. Hickey WF, Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292
89. Hickey WF, Vass K, Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 246-256
90. Hoff T, DeWitt D, Kaever V, Resch K, Goppelt-Struebe M (1993) Differentiation-associated expression of prostaglandin G/H synthase in monocytic cells. *FEBS Lett* 320: 38-42
91. Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2004) Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 14: 43-50
92. Holness CL, Simmons DL (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81: 1607-1613
93. Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Janssen I, de Groot CJ, Veerhuis R, Eikelenboom P (2001) Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 101: 2-8
94. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE (2002) Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 168: 2493-2500
95. Hulette CM, Downey BT, Burger PC (1992) Macrophage markers in diagnostic neuropathology. *Am J Surg Pathol* 16: 493-499
96. Hunter MJ, Chazin WJ (1998) High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J Biol Chem* 273: 12427-12435
97. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409: 349-354
98. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP (2005) Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81: 363-373
99. Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, Gaber R, Schock S, Schwitzer R, Wonigeit K, Lindert RB, Kantarci O, Schaefer-Klein J, Schipper HI, Oertel WH, Heidenreich F, Weinshenker BG, Sommer N, Hemmer B (2000) A point

- mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet* 26: 495-499
100. Jellinger K, Radaskiewicz TH, Slowik F (1975) Primary malignant lymphomas of the central nervous system in man. *Acta Neuropathol Suppl (Berl) Suppl* 6: 95-102
  101. Julien JP, Mushynski WE (1998) Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 1-23
  102. Kao J, Houck K, Fan Y, Haehnel I, Libutti SK, Kayton ML, Grikscheit T, Chabot J, Nowygrod R, Greenberg S, . (1994) Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. *J Biol Chem* 269: 25106-25119
  103. Kaplan MD, Olschowka JA, O'Banion MK (1997) Cyclooxygenase-1 behaves as a delayed response gene in PC12 cells differentiated by nerve growth factor. *J Biol Chem* 272: 18534-18537
  104. Kaur C, Singh J, Ling EA (1993) Immunohistochemical and lectin-labelling studies of the distribution and development of microglia in the spinal cord of postnatal rats. *Arch Histol Cytol* 56: 475-484
  105. Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001) Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 54: 2-9
  106. Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140: 691-707
  107. Kedzierska K, Crowe SM (2002) The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem* 9: 1893-1903
  108. Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg G (1990) Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J Neurosci Res* 26: 278-287
  109. Kettenmann H, Banati R, Walz W (1993) Electrophysiological behavior of microglia. *Glia* 7: 93-101
  110. Kim TI, Lee YC, Lee KH, Han JH, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS (2001) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae of mice: apoptosis, cell proliferation, and inflammatory activity. *Infect Immun* 69: 5056-5063
  111. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kundig TM, Kawai K, Wakeham A, Timms E, Pfeffer K, Ohashi PS, Thomas ML, . (1993) Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 74: 143-156
  112. Kitamura T, Miyake T, FUJITA S (1984) Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 226: 421-433
  113. Klempt M, Melkonyan H, Nacken W, Wiesmann D, Holtkemper U, Sorg C (1997) The heterodimer of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins MRP8 and MRP14 binds to arachidonic acid. *FEBS Lett* 408: 81-84
  114. Koshinaga M, Whittemore SR (1995) The temporal and spatial activation of microglia in fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord lesion. *J Neurotrauma* 12: 209-222
  115. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318

116. Kruger L, Maxwell DS (1966) Electron microscopy of oligodendrocytes in normal rat cerebrum. *Am J Anat* 118: 411-435
117. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648-659
118. Landfield PW, Braun LD, Pitler TA, Lindsey JD, Lynch G (1981) Hippocampal aging in rats: a morphometric study of multiple variables in semithin sections. *Neurobiol Aging* 2: 265-275
119. Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7: 19-24
120. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-170
121. Lee SC, Collins M, Vanguri P, Shin ML (1992) Glutamate differentially inhibits the expression of class II MHC antigens on astrocytes and microglia. *J Immunol* 148: 3391-3397
122. Leong SK, Ling EA (1992) Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6: 39-47
123. Lewis PD (1968) The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia. *Brain* 91: 721-736
124. Ling EA (1976a) Electron-microscopic identification of amoeboid microglia in the spinal cord of newborn rats. *Acta Anat (Basel)* 96: 600-609
125. Ling EA (1976b) Study in the changes of the proportions and numbers of the various glial cell types in the spinal cord of neonatal and young adult rats. *Acta Anat (Basel)* 96: 188-195
126. Ling EA, Penney D, Leblond CP (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* 193: 631-657
127. Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18
128. Maier H, Schmidbauer M, Pfausler B, Schmutzhard E, Budka H (1997) Central nervous system pathology in patients with the Guillain-Barre syndrome. *Brain* 120 ( Pt 3): 451-464
129. Maihofner C, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundorfer B, Heuss D (2003) Expression and localization of cyclooxygenase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 18: 1527-1534
130. Mankowski JL, Queen SE, Tarwater PM, Fox KJ, Perry VH (2002) Accumulation of beta-amyloid precursor protein in axons correlates with CNS expression of SIV gp41. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 85-90
131. Mannoji H, Yeger H, Becker LE (1986) A specific histochemical marker (lectin *Ricinus communis* agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 71: 341-343
132. Massa PT, ter M, V, Fontana A (1987) Hyperinducibility of Ia antigen on astrocytes correlates with strain-specific susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4219-4223

133. Mathy NL, Scheuer W, Lanzendorfer M, Honold K, Ambrosius D, Norley S, Kurth R (2000) Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology* 100: 63-69
134. Mattiace LA, Davies P, Dickson DW (1990) Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors. *Am J Pathol* 136: 1101-1114
135. McKeever PE (1998) Insights about brain tumors gained through immunohistochemistry and in situ hybridization of nuclear and phenotypic markers. *J Histochem Cytochem* 46: 585-594
136. Meller D, Bellander BM, Schmidt-Kastner R, Ingvar M (1993) Immunohistochemical studies with antibodies to neurofilament proteins on axonal damage in experimental focal lesions in rat. *J Neurol Sci* 117: 164-174
137. Miller CC, Ackerley S, Brownlees J, Grierson AJ, Jacobsen NJ, Thornhill P (2002) Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell Mol Life Sci* 59: 323-330
138. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol (Berl)* 101: 249-255
139. Moore S, Thanos S (1996) The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol* 48: 441-460
140. Mori S, Leblond CP (1969) Identification of microglia in light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 135: 57-80
141. Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 966-973
142. Mueller CA, Richt JA, Meyermann R, Deininger M, Schluesener H (2003a) Accumulation of the proinflammatory cytokine endothelial-monocyte-activating polypeptide II in ramified microglial cells in brains of Borna virus infected Lewis rats. *Neurosci Lett* 339: 215-218
143. Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Meyermann R, Schwab JM (2003b) Spinal cord injury induces lesional expression of the proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II. *J Neurotrauma* 20: 1007-1015
144. Murray JC, Heng YM, Symonds P, Rice K, Ward W, Huggins M, Todd I, Robins RA (2004) Endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP-II): a novel inducer of lymphocyte apoptosis. *J Leukoc Biol* 75: 772-776
145. Nacken W, Roth J, Sorg C, Kerkhoff C (2003) S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc Res Tech* 60: 569-580
146. Nau R, Bruck W (2002) Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25: 38-45
147. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-1318
148. Nissl F (1899) Ueber einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen und gliöse Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch Psych* 32: 1-21

149. Oehmichen M, Meissner C, Schmidt V, Pedal I, König HG (1999) Pontine axonal injury after brain trauma and nontraumatic hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Legal Med* 112: 261-267
150. Perry VH, Gordon S (1987) Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J Exp Med* 166: 1138-1143
151. Perry VH, Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11: 273-277
152. Pessac B, Godin I, Alliot F (2001) [Microglia: origin and development]. *Bull Acad Natl Med* 185: 337-346
153. Popovich PG, Guan Z, McGaughy V, Fisher L, Hickey WF, Basso DM (2002) The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 623-633
154. Postler E, Lehr A, Schluesener H, Meyermann R (1997) Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 19: 27-34
155. Postler E, Rimmer A, Beschoner R, Schluesener HJ, Meyermann R (2000) "Allograft-inflammatory-factor-1 is upregulated in microglial cells in human cerebral infarctions". *J Neuroimmunol* 108: 244-250
156. Powis SH, Trowsdale J (1991) HLA and disease. *Br J Clin Pract* 45: 116-120
157. Quevillon S, Agou F, Robinson JC, Mirande M (1997) The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J Biol Chem* 272: 32573-32579
158. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 77-105
159. Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 28: 571-573
160. Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D (1996) Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14833-14838
161. Rauschka H, Jellinger K, Lassmann H, Braier F, Schmidbauer M (2003) Guillain-Barre syndrome with marked pleocytosis or a significant proportion of polymorphonuclear granulocytes in the cerebrospinal fluid: neuropathological investigation of five cases and review of differential diagnoses. *Eur J Neurol* 10: 479-486
162. Reichard RR, White CL, III, Hladik CL, Dolinak D (2003) Beta-amyloid precursor protein staining in nonhomicidal pediatric medicolegal autopsies. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 237-247
163. Rezaie P, Male D (1999) Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech* 45: 359-382
164. Rezaie P, Patel K, Male DK (1999) Microglia in the human fetal spinal cord--patterns of distribution, morphology and phenotype. *Brain Res Dev Brain Res* 115: 71-81
165. Rimmer WA, Bauer J, Schmidts M, Lassmann H, Hickey WF (1995) Resident microglia and hematogenous macrophages as phagocytes in adoptively

- transferred experimental autoimmune encephalomyelitis: an investigation using rat radiation bone marrow chimeras. *Glia* 14: 257-266
166. Rio-Hortega del P (1919) El "tercer elemento" de los centros nerviosus. *Bol Soc Esp Biol* 9: 69-120
  167. Rio-Hortega del P (1932) Microglia. In: *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. (W. Penfield, ed.), pp 482-534, Vol 2, Hoeber Verlag, New York
  168. Robertson WF (1900) A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. *J ment Sci* 46: 733-752
  169. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA (2003) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 170: 3233-3242
  170. Rydberg E (1932) Cerebral injury in newborn children consequent on birth trauma, with an inquiry into the normal and pathological anatomy of neuroglia. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 10: 1-247
  171. Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL (1995) Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules. *Immunol Today* 16: 581-587
  172. Santha K, Juba A (1933) Weitere Untersuchungen über die Entwicklung der Hortegaschen Mikroglia. *Arch Psychiat Nervenkr* 98: 598-613
  173. Schelper RL, Adrian EK, Jr. (1986) Monocytes become macrophages; they do not become microglia: a light and electron microscopic autoradiographic study using 125-iododeoxyuridine. *J Neuropathol Exp Neurol* 45: 1-19
  174. Schluesener HJ, Seid K, Kretzschmar J, Meyermann R (1996) Leukocyte chemotactic factor, a natural ligand to CD4, is expressed by lymphocytes and microglial cells of the MS plaque. *J Neurosci Res* 44: 606-611
  175. Schluesener HJ, Seid K, Zhao Y, Meyermann R (1997) Localization of endothelial-monocyte-activating polypeptide II (EMAP II), a novel proinflammatory cytokine, to lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis: expression by monocytes and activated microglial cells. *Glia* 20: 365-372
  176. Schluesener HJ, Kremser PG, Meyermann R (1998a) Widespread expression of MRP8 and MRP14 in human cerebral malaria by microglial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 96: 575-580
  177. Schluesener HJ, Seid K, Kretzschmar J, Meyermann R (1998b) Allograft-inflammatory factor-1 in rat experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis, and uveitis: expression by activated macrophages and microglial cells. *Glia* 24: 244-251
  178. Schmidtayer J, Jacobsen C, Miksch G, Sievers J (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12: 259-267
  179. Schmitt AB, Buss A, Breuer S, Brook GA, Pech K, Martin D, Schoenen J, Noth J, Love S, Schroder JM, Kreutzberg GW, Nacimiento W (2000) Major histocompatibility complex class II expression by activated microglia caudal to lesions of descending tracts in the human spinal cord is not associated with a T cell response. *Acta Neuropathol (Berl)* 100: 528-536



180. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH (1999a) Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 11: 3648-3658
181. Schnell L, Fearn S, Schwab ME, Perry VH, Anthony DC (1999b) Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 245-254
182. Schwab JM, Brechtel K, Nguyen TD, Schluesener HJ (2000a) Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 111: 122-130
183. Schwab JM, Nguyen TD, Postler E, Meyermann R, Schluesener HJ (2000b) Selective accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells/macrophages in lesions of human focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 99: 609-614
184. Schwab JM, Frei E, Klusman I, Schnell L, Schwab ME, Schluesener HJ (2001a) AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. *J Neuroimmunol* 119: 214-222
185. Schwab JM, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ (2001b) Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. *J Neuroimmunol* 114: 232-241
186. Schwab JM, Schluesener HJ, Seid K, Meyermann R (2001c) IL-16 is differentially expressed in the developing human fetal brain by microglial cells in zones of neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* 19: 93-100
187. Schwab JM, Seid K, Schluesener HJ (2001d) Traumatic brain injury induces prolonged accumulation of cyclooxygenase-1 expressing microglia/brain macrophages in rats. *J Neurotrauma* 18: 881-890
188. Schwab JM, Beschorner R, Meyermann R, Gozalan F, Schluesener HJ (2002) Persistent accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. *J Neurosurg* 96: 892-899
189. Schwinzer R, Witte T, Hundrieser J, Ehlers S, Momot T, Hunzelmann N, Krieg T, Schmidt RE, Wonigeit K (2003) Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis. *Genes Immun* 4: 168-169
190. Sedgwick JD, Hickey WF (1997) Antigen presentation in the central nervous system. Oxford University Press, New York.
191. Shah VO, Civin CI, Loken MR (1988) Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol* 140: 1861-1867
192. Shalak V, Kaminska M, Mitnacht-Kraus R, Vandenabeele P, Clauss M, Mirande M (2001) The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem* 276: 23769-23776
193. Sheffield LG, Berman NE (1998) Microglial expression of MHC class II increases in normal aging of nonhuman primates. *Neurobiol Aging* 19: 47-55

194. Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S (1994) Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 87: 55-62
195. Shibata M, Ohtani R, Ihara M, Tomimoto H (2004) White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 35: 2598-2603
196. Shillabeer G, Kumar V, Tibbo E, Lau DC (1998) Arachidonic acid metabolites of the lipoxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation. *Metabolism* 47: 461-466
197. Sievers J, Schmidtmayer J, Parwaresch R (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Anat Anz* 176: 45-51
198. Simard AR, Rivest S (2004) Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* 18: 998-1000
199. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157-33160
200. Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58: 233-247
201. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301-307
202. Strobl H, Scheinecker C, Csmarits B, Majdic O, Knapp W (1995) Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. *Br J Haematol* 90: 774-782
203. Theodore AC, Center DM, Nicoll J, Fine G, Kornfeld H, Cruikshank WW (1996) CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 157: 1958-1964
204. Ting JP, Shigekawa BL, Linthicum DS, Weiner LP, Frelinger JA (1981) Expression and synthesis of murine immune response-associated (Ia) antigens by brain cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3170-3174
205. Ting JP, Nixon DF, Weiner LP, Frelinger JA (1983) Brain Ia antigens have a bone marrow origin. *Immunogenetics* 17: 295-301
206. Trowbridge IS, Thomas ML (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12: 85-116
207. Turrin NP, Rivest S (2004) Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis* 16: 321-334
208. Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R (1994) Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 56: 732-740
209. Umehara F, Izumo S, Ronquillo AT, Matsumuro K, Sato E, Osame M (1994) Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 72-77
210. Unger ER, Sung JH, Manivel JC, Chenggis ML, Blazar BR, Krivit W (1993) Male donor-derived cells in the brains of female sex-mismatched bone marrow

- transplant recipients: a Y-chromosome specific in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 460-470
211. Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME (1995) Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest* 95: 2954-2962
  212. Van der Kooij MA, der Mark EM, Kruijt JK, van Velzen A, van Berkel TJ, Morand OH (1997) Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD Ox-LDL binding protein with strong identity to CD68. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3107-3116
  213. Vass K, Lassmann H (1990) Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol* 137: 789-800
  214. Verani A, Gras G, Pancino G (2005) Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol* 42: 195-212
  215. Vijayan VK, Cotman CW (1987) Hydrocortisone administration alters glial reaction to entorhinal lesion in the rat dentate gyrus. *Exp Neurol* 96: 307-320.
  216. Virchow R (1846) Über das granuliertes Aussehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allg Z Psychiat* 3: 242-250
  217. Virchow R (1851) Über die Erweiterung kleiner Gefäße. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 3: 427-462
  218. Virchow R (1867) Zur pathologischen Anatomie des Gehirns. *Arch Pathol Anat* 38: 129-142
  219. Visentin S, Agresti C, Patrizio M, Levi G (1995) Ion channels in rat microglia and their different sensitivity to lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Neurosci Res* 42: 439-451
  220. Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, Manger D, Zuckermann S, Golosubow A, Nieter B, . (1991) Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt* 208-215
  221. Wagner S, Czub S, Greif M, Vince GH, Suss N, Kerkau S, Rieckmann P, Roggendorf W, Roosen K, Tonn JC (1999) Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int J Cancer* 82: 12-16
  222. Walz W, Bekar LK (2001) Ion channels in cultured microglia. *Microsc Res Tech* 54: 26-33
  223. Wesselingh SL, Takahashi K, Glass JD, McArthur JC, Griffin JW, Griffin DE (1997) Cellular localization of tumor necrosis factor mRNA in neurological tissue from HIV-infected patients by combined reverse transcriptase/polymerase chain reaction in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Neuroimmunol* 74: 1-8
  224. Wierzbica-Bobrowicz T, Kosno-Kruszewska E, Gwiazda E, Lechowicz W, Schmidt-Sidor B (2001) Major histocompatibility complex class II (MHC II) expression in the normal and pathological human foetal spinal cord. *Folia Neuropathol* 39: 49-56
  225. Williams CS, Mann M, Dubois RN (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18: 7908-7916

226. Wilms H, Wollmer MA, Sievers J (1999) In vitro-staining specificity of the antibody 5-D-4 for microglia but not for monocytes and macrophages indicates that microglia are a unique subgroup of the myelomonocytic lineage. *J Neuroimmunol* 98: 89-95
227. Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW (1984) Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 310: 688-691
228. Wu CH, Chien HF, Chang CY, Chen SH, Huang YS (2001) Response of amoeboid and differentiating ramified microglia to glucocorticoids in postnatal rats: a lectin histochemical and ultrastructural study. *Neurosci Res* 40: 235-244
229. Yamamoto M, Fukushima T, Ueno Y, Hayashi S, Kimura H, Soma G, Tomonaga M (2000) Clinical significance of the expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII) in the treatment of glioblastoma with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2). *Anticancer Res* 20: 4081-4086
230. Yermakova AV, Rollins J, Callahan LM, Rogers J, O'Banion MK (1999) Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 1135-1146
231. Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C, Bresnihan B (1999) Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol* 26: 2523-2528
232. Zeinstra E, Wilczak N, Streefland C, De Keyser J (2000) Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHC class II molecules. *Neuroreport* 11: 89-91
233. Zhao ML, Si Q, Lee SC (2004) IL-16 expression in lymphocytes and microglia in HIV-1 encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30: 233-242
234. Zhou Y, Wang Y, Kovacs M, Jin J, Zhang J (2005) Microglial activation induced by neurodegeneration: a proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 4: 1471-1479

## 7.1 Tabellen

Antikörper	Höhe	Rückenmarksregion	Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
AIF-1	Cervikal oben	Vordersäule	2,17	6,03
AIF-1	Cervikal oben	Seitensäule	0,50	9,02
AIF-1	Cervikal oben	Hintersäule	1,08	7,89
AIF-1	Cervikal oben	Graue Substanz	0,34	6,79
AIF-1	Cervikal oben	Zentralkanal	0,39	7,64
AIF-1	Cervikal unten	Vordersäule	0,73	9,25
AIF-1	Cervikal unten	Seitensäule	0,59	6,21
AIF-1	Cervikal unten	Hintersäule	0,44	6,13
AIF-1	Cervikal unten	Graue Substanz	0,47	5,82
AIF-1	Cervikal unten	Zentralkanal	0,44	13,63
AIF-1	Thorakal oben	Vordersäule	0,52	9,34
AIF-1	Thorakal oben	Seitensäule	0,69	7,38
AIF-1	Thorakal oben	Hintersäule	0,38	6,06
AIF-1	Thorakal oben	Graue Substanz	0,65	8,33
AIF-1	Thorakal oben	Zentralkanal	0,85	11,08
AIF-1	Thorakal mitte	Vordersäule	0,25	8,73
AIF-1	Thorakal mitte	Seitensäule	0,46	9,48
AIF-1	Thorakal mitte	Hintersäule	0,64	8,44
AIF-1	Thorakal mitte	Graue Substanz	1,02	6,36
AIF-1	Thorakal mitte	Zentralkanal	0,90	11,59
AIF-1	Thorakal unten	Vordersäule	0,01	12,71
AIF-1	Thorakal unten	Seitensäule	1,20	7,43
AIF-1	Thorakal unten	Hintersäule	0,18	9,50
AIF-1	Thorakal unten	Graue Substanz	0,64	8,10
AIF-1	Thorakal unten	Zentralkanal	0,77	10,48
AIF-1	Lumbal oben	Vordersäule	0,23	10,31
AIF-1	Lumbal oben	Seitensäule	0,37	9,19
AIF-1	Lumbal oben	Hintersäule	0,25	8,41
AIF-1	Lumbal oben	Graue Substanz	0,44	7,53
AIF-1	Lumbal oben	Zentralkanal	0,35	16,94
AIF-1	Lumbal unten	Vordersäule	0,00	10,32
AIF-1	Lumbal unten	Seitensäule	0,01	9,25
AIF-1	Lumbal unten	Hintersäule	0,10	9,40
AIF-1	Lumbal unten	Graue Substanz	0,17	6,81
AIF-1	Lumbal unten	Zentralkanal	0,15	11,12
AIF-1	Sakral	Vordersäule	0,17	7,82
AIF-1	Sakral	Seitensäule	0,69	9,60
AIF-1	Sakral	Hintersäule	0,06	9,11
AIF-1	Sakral	Graue Substanz	0,17	7,32
AIF-1	Sakral	Zentralkanal	0,14	8,69

Tabelle 5: Referenzbereich AIF-1

Antikörper	Höhe	Rückenmarksregion	Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
CD 68	Cervikal oben	Vordersäule	6,12	21,09
CD 68	Cervikal oben	Seitensäule	3,57	23,65
CD 68	Cervikal oben	Hintersäule	4,05	20,08
CD 68	Cervikal oben	Graue Substanz	3,72	20,27
CD 68	Cervikal oben	Zentralkanal	1,84	16,38
CD 68	Cervikal unten	Vordersäule	5,60	23,81
CD 68	Cervikal unten	Seitensäule	3,07	21,14
CD 68	Cervikal unten	Hintersäule	2,87	25,31
CD 68	Cervikal unten	Graue Substanz	1,76	26,95
CD 68	Cervikal unten	Zentralkanal	3,42	25,42
CD 68	Thorakal oben	Vordersäule	3,46	25,49
CD 68	Thorakal oben	Seitensäule	1,61	23,40
CD 68	Thorakal oben	Hintersäule	1,27	30,20
CD 68	Thorakal oben	Graue Substanz	3,04	20,82
CD 68	Thorakal oben	Zentralkanal	5,85	24,90
CD 68	Thorakal mitte	Vordersäule	5,18	24,13
CD 68	Thorakal mitte	Seitensäule	2,66	27,06
CD 68	Thorakal mitte	Hintersäule	2,98	27,49
CD 68	Thorakal mitte	Graue Substanz	3,00	24,37
CD 68	Thorakal mitte	Zentralkanal	2,15	26,28
CD 68	Thorakal unten	Vordersäule	5,10	26,88
CD 68	Thorakal unten	Seitensäule	2,93	24,89
CD 68	Thorakal unten	Hintersäule	5,35	28,81
CD 68	Thorakal unten	Graue Substanz	3,00	25,40
CD 68	Thorakal unten	Zentralkanal	3,81	22,76
CD 68	Lumbal oben	Vordersäule	4,70	24,13
CD 68	Lumbal oben	Seitensäule	3,85	24,43
CD 68	Lumbal oben	Hintersäule	4,00	24,78
CD 68	Lumbal oben	Graue Substanz	2,39	24,43
CD 68	Lumbal oben	Zentralkanal	2,65	29,22
CD 68	Lumbal unten	Vordersäule	6,37	20,36
CD 68	Lumbal unten	Seitensäule	6,36	20,31
CD 68	Lumbal unten	Hintersäule	2,38	24,64
CD 68	Lumbal unten	Graue Substanz	3,87	24,23
CD 68	Lumbal unten	Zentralkanal	4,32	27,14
CD 68	Sakral	Vordersäule	5,56	16,41
CD 68	Sakral	Seitensäule	2,64	22,45
CD 68	Sakral	Hintersäule	1,74	21,89
CD 68	Sakral	Graue Substanz	2,50	18,76
CD 68	Sakral	Zentralkanal	2,16	27,57

Tabelle 6: Referenzbereich CD68

Antikörper	Höhe	Rückenmarksregion	Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
IL-16	Cervikal oben	Vordersäule	2,03	8,22
IL-16	Cervikal oben	Seitensäule	0,48	9,89
IL-16	Cervikal oben	Hintersäule	0,36	10,10
IL-16	Cervikal oben	Graue Substanz	0,94	10,37
IL-16	Cervikal oben	Zentralkanal	1,18	8,89
IL-16	Cervikal unten	Vordersäule	1,31	8,76
IL-16	Cervikal unten	Seitensäule	0,37	10,63
IL-16	Cervikal unten	Hintersäule	0,98	9,43
IL-16	Cervikal unten	Graue Substanz	1,38	13,46
IL-16	Cervikal unten	Zentralkanal	1,32	15,62
IL-16	Thorakal oben	Vordersäule	1,72	8,35
IL-16	Thorakal oben	Seitensäule	1,58	9,07
IL-16	Thorakal oben	Hintersäule	1,69	7,15
IL-16	Thorakal oben	Graue Substanz	2,08	9,07
IL-16	Thorakal oben	Zentralkanal	2,18	13,40
IL-16	Thorakal mitte	Vordersäule	0,60	10,09
IL-16	Thorakal mitte	Seitensäule	0,96	10,76
IL-16	Thorakal mitte	Hintersäule	1,10	11,14
IL-16	Thorakal mitte	Graue Substanz	0,34	11,33
IL-16	Thorakal mitte	Zentralkanal	2,22	10,11
IL-16	Thorakal unten	Vordersäule	0,95	9,83
IL-16	Thorakal unten	Seitensäule	1,04	10,32
IL-16	Thorakal unten	Hintersäule	1,65	7,31
IL-16	Thorakal unten	Graue Substanz	0,95	9,20
IL-16	Thorakal unten	Zentralkanal	1,21	11,96
IL-16	Lumbal oben	Vordersäule	0,92	10,35
IL-16	Lumbal oben	Seitensäule	0,62	11,96
IL-16	Lumbal oben	Hintersäule	0,87	10,22
IL-16	Lumbal oben	Graue Substanz	1,00	10,04
IL-16	Lumbal oben	Zentralkanal	1,79	11,12
IL-16	Lumbal unten	Vordersäule	0,69	8,53
IL-16	Lumbal unten	Seitensäule	0,42	11,59
IL-16	Lumbal unten	Hintersäule	0,31	12,63
IL-16	Lumbal unten	Graue Substanz	0,18	13,95
IL-16	Lumbal unten	Zentralkanal	0,73	13,51
IL-16	Sakral	Vordersäule	0,57	8,09
IL-16	Sakral	Seitensäule	0,64	9,56
IL-16	Sakral	Hintersäule	0,35	10,52
IL-16	Sakral	Graue Substanz	0,46	10,94
IL-16	Sakral	Zentralkanal	1,35	10,96

Tabelle 7: Referenzbereich IL-16

Antikörper	Höhe	Rückenmarksregion	Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
MHC-II	Cervikal oben	Vordersäule	6,81	22,54
MHC-II	Cervikal oben	Seitensäule	9,31	15,09
MHC-II	Cervikal oben	Hintersäule	8,62	16,32
MHC-II	Cervikal oben	Graue Substanz	5,20	16,73
MHC-II	Cervikal oben	Zentralkanal	5,30	18,06
MHC-II	Cervikal unten	Vordersäule	6,12	27,63
MHC-II	Cervikal unten	Seitensäule	4,61	25,67
MHC-II	Cervikal unten	Hintersäule	3,87	33,04
MHC-II	Cervikal unten	Graue Substanz	1,84	23,09
MHC-II	Cervikal unten	Zentralkanal	4,54	29,71
MHC-II	Thorakal oben	Vordersäule	5,87	28,95
MHC-II	Thorakal oben	Seitensäule	2,91	35,87
MHC-II	Thorakal oben	Hintersäule	2,23	31,85
MHC-II	Thorakal oben	Graue Substanz	4,28	24,32
MHC-II	Thorakal oben	Zentralkanal	10,53	25,71
MHC-II	Thorakal mitte	Vordersäule	6,06	28,28
MHC-II	Thorakal mitte	Seitensäule	6,13	26,99
MHC-II	Thorakal mitte	Hintersäule	6,12	26,88
MHC-II	Thorakal mitte	Graue Substanz	3,81	26,67
MHC-II	Thorakal mitte	Zentralkanal	4,34	34,44
MHC-II	Thorakal unten	Vordersäule	4,01	38,78
MHC-II	Thorakal unten	Seitensäule	6,70	30,91
MHC-II	Thorakal unten	Hintersäule	6,03	31,26
MHC-II	Thorakal unten	Graue Substanz	2,68	28,45
MHC-II	Thorakal unten	Zentralkanal	5,25	33,59
MHC-II	Lumbal oben	Vordersäule	5,70	31,28
MHC-II	Lumbal oben	Seitensäule	3,95	36,15
MHC-II	Lumbal oben	Hintersäule	5,64	31,73
MHC-II	Lumbal oben	Graue Substanz	3,27	30,54
MHC-II	Lumbal oben	Zentralkanal	3,59	35,18
MHC-II	Lumbal unten	Vordersäule	4,02	24,42
MHC-II	Lumbal unten	Seitensäule	3,99	25,48
MHC-II	Lumbal unten	Hintersäule	2,85	29,98
MHC-II	Lumbal unten	Graue Substanz	0,33	34,61
MHC-II	Lumbal unten	Zentralkanal	5,86	31,56
MHC-II	Sakral	Vordersäule	5,15	23,37
MHC-II	Sakral	Seitensäule	2,47	29,31
MHC-II	Sakral	Hintersäule	2,66	22,60
MHC-II	Sakral	Graue Substanz	5,23	23,29
MHC-II	Sakral	Zentralkanal	6,67	30,51

Tabelle 8: Referenzbereich MHC-II



7.2 Diagramme

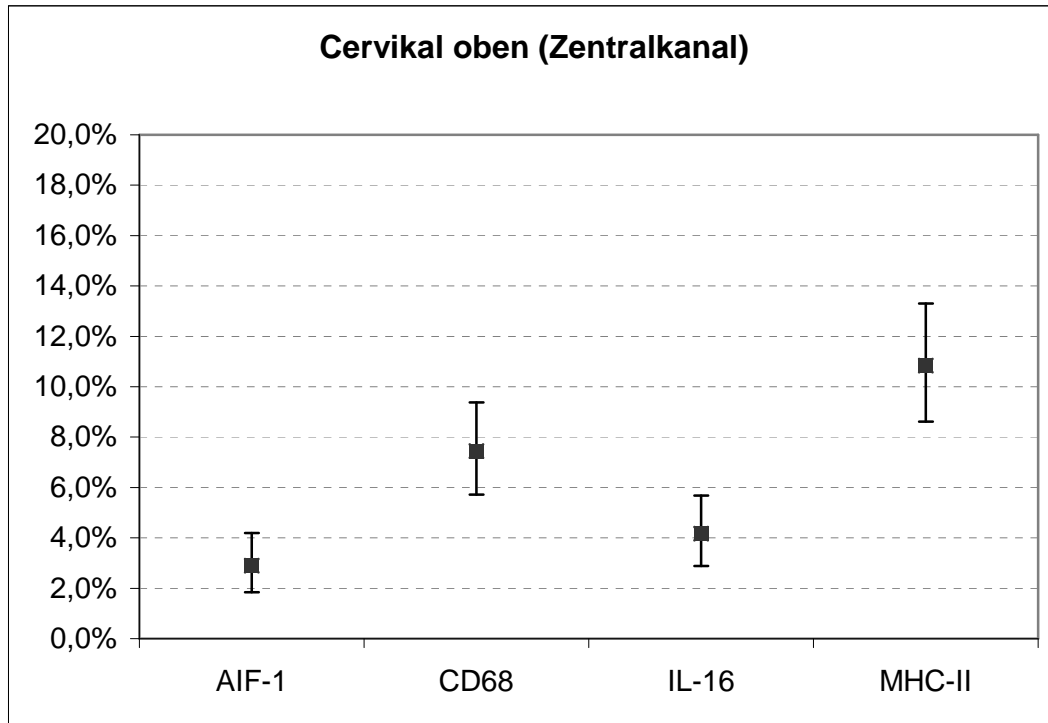


Diagramm 14

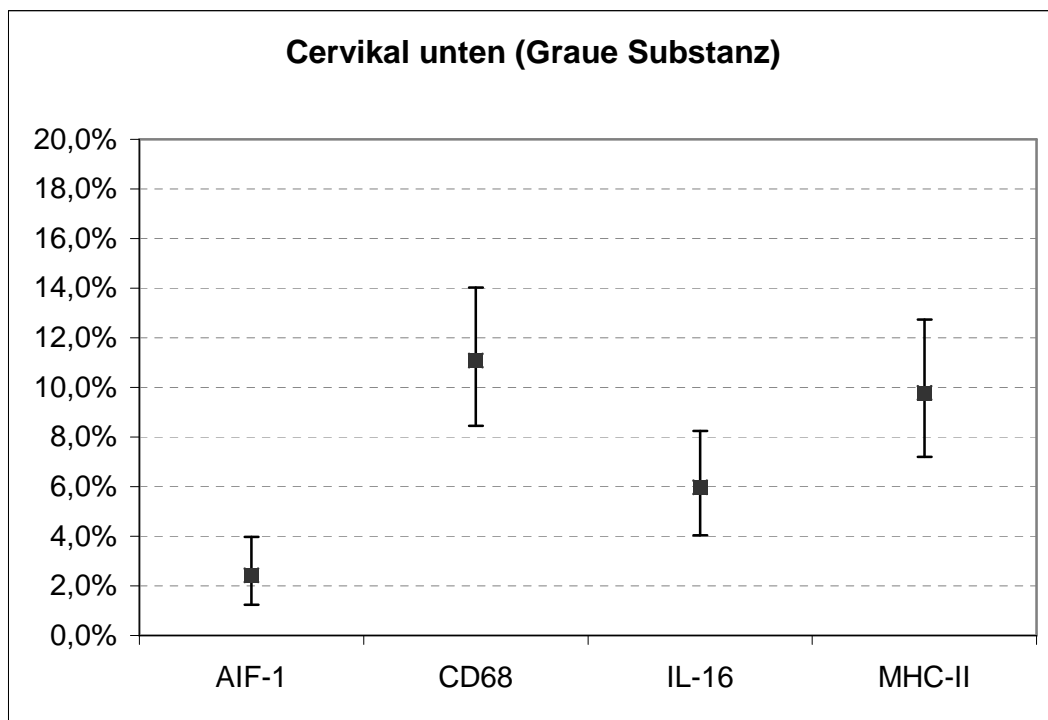


Diagramm 15

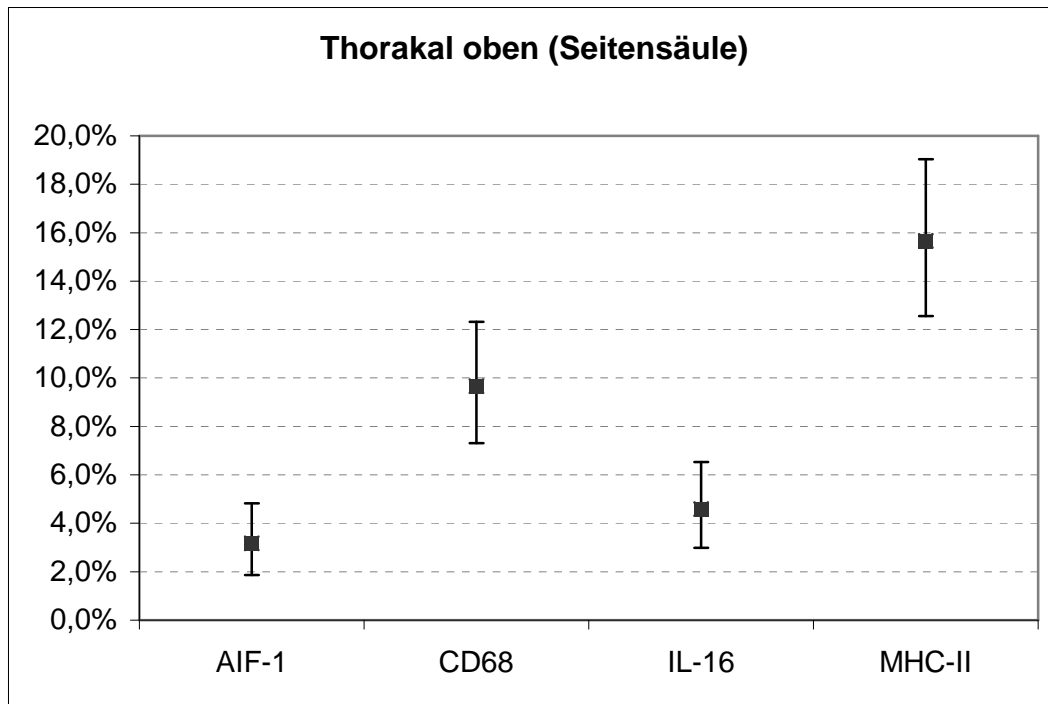


Diagramm 16

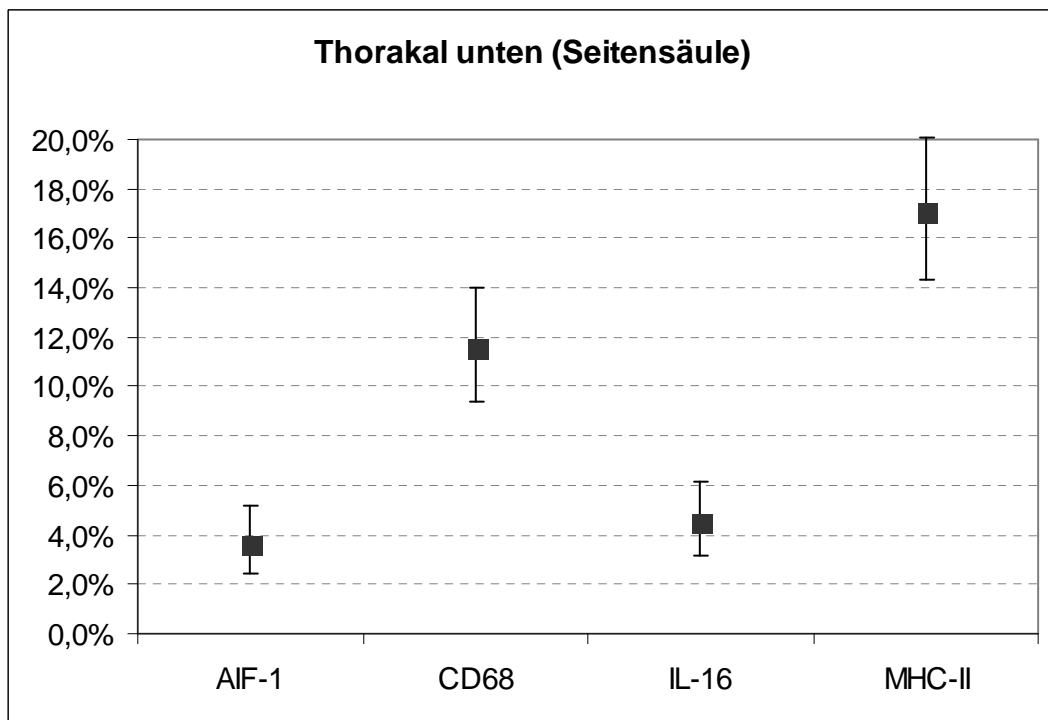


Diagramm 17

**Diagramme der pathologischen Fälle**

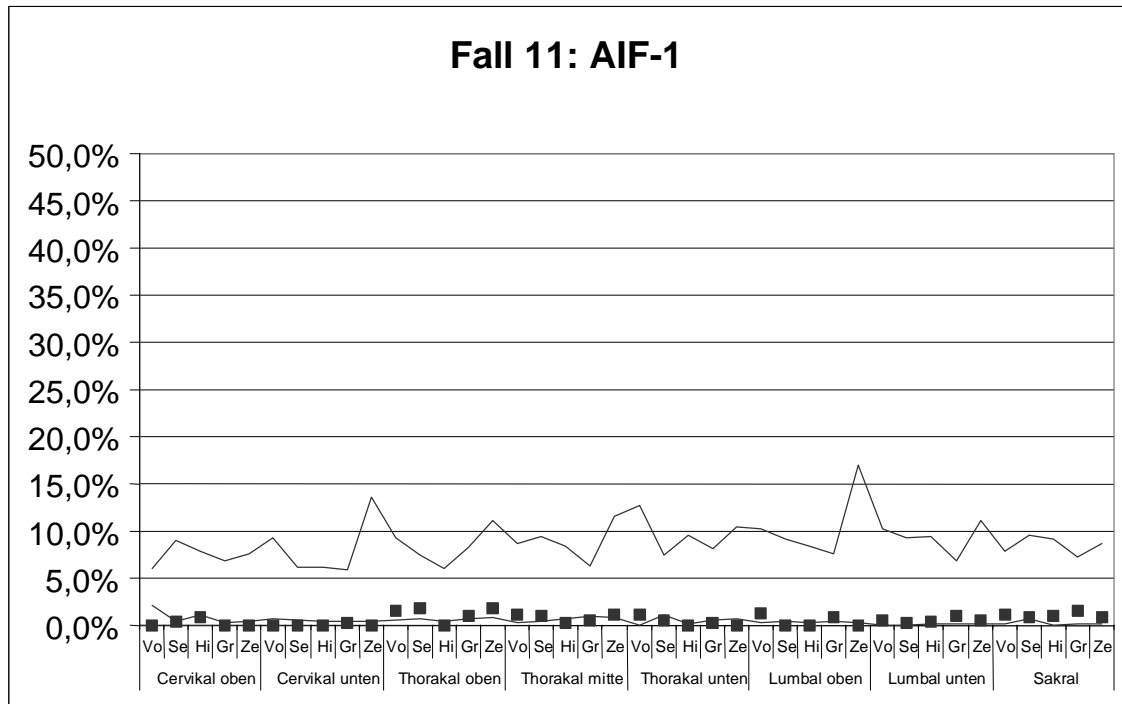


Diagramm 18

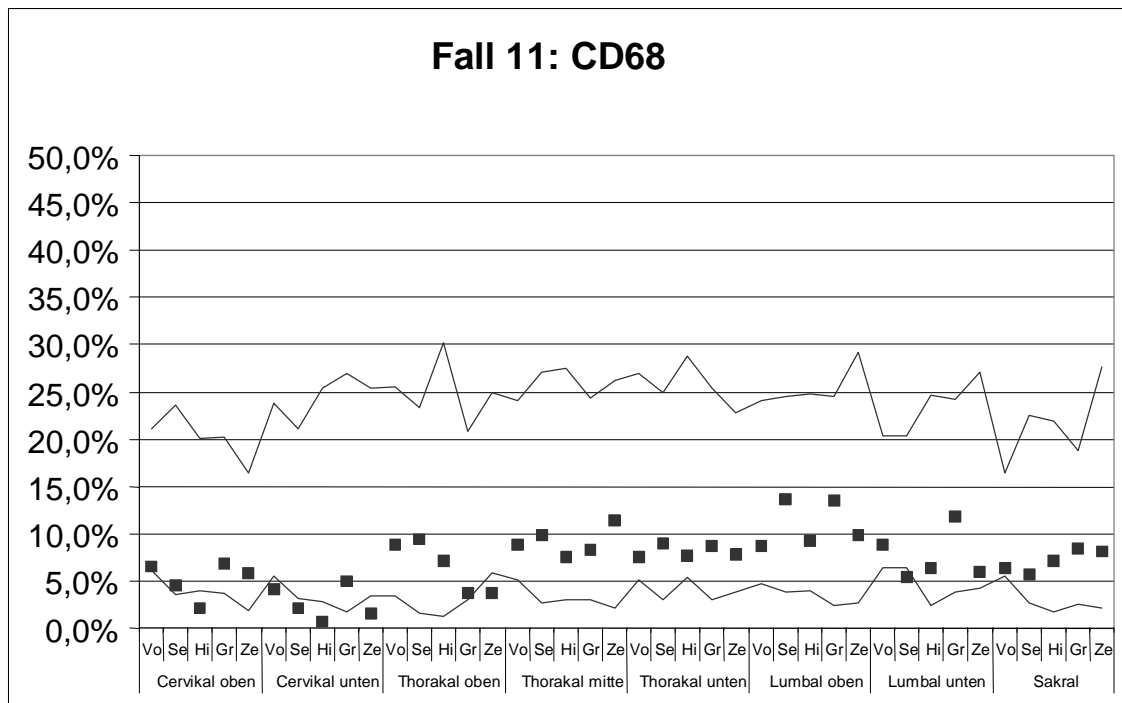


Diagramm 19

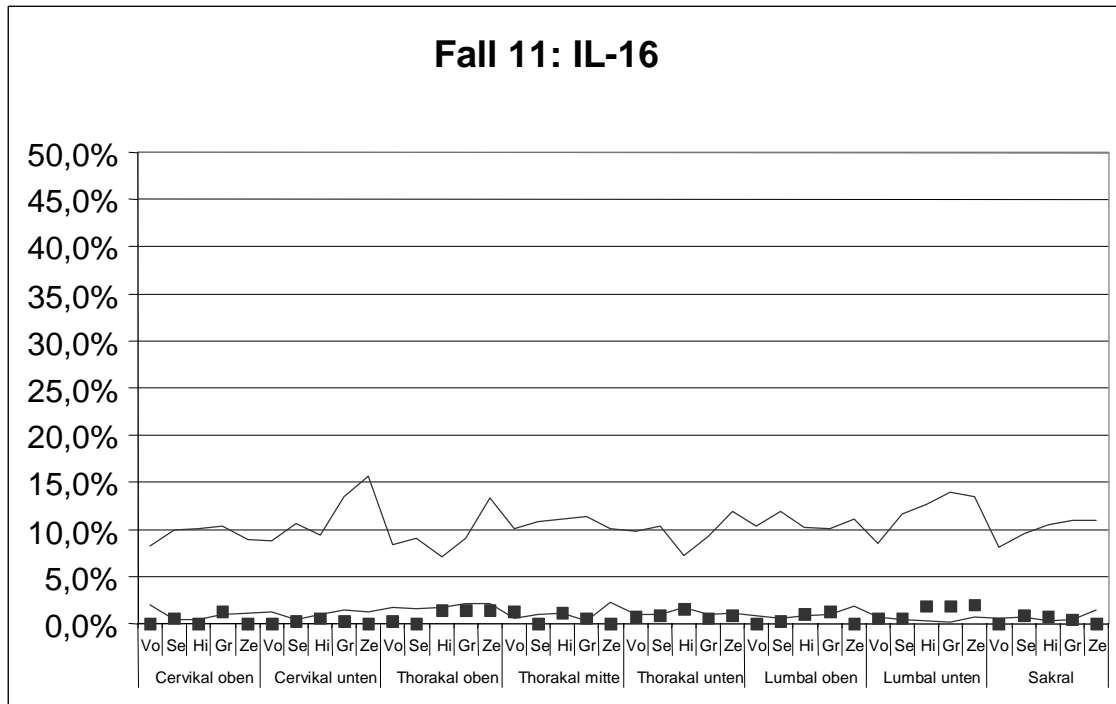


Diagramm 20

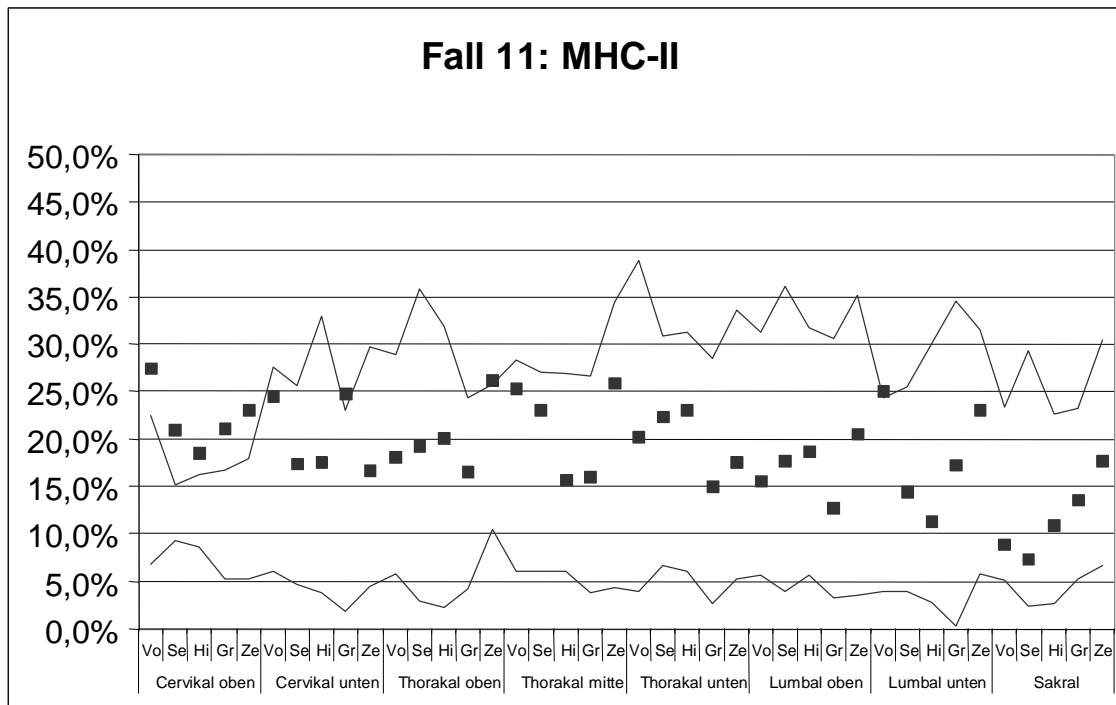


Diagramm 21

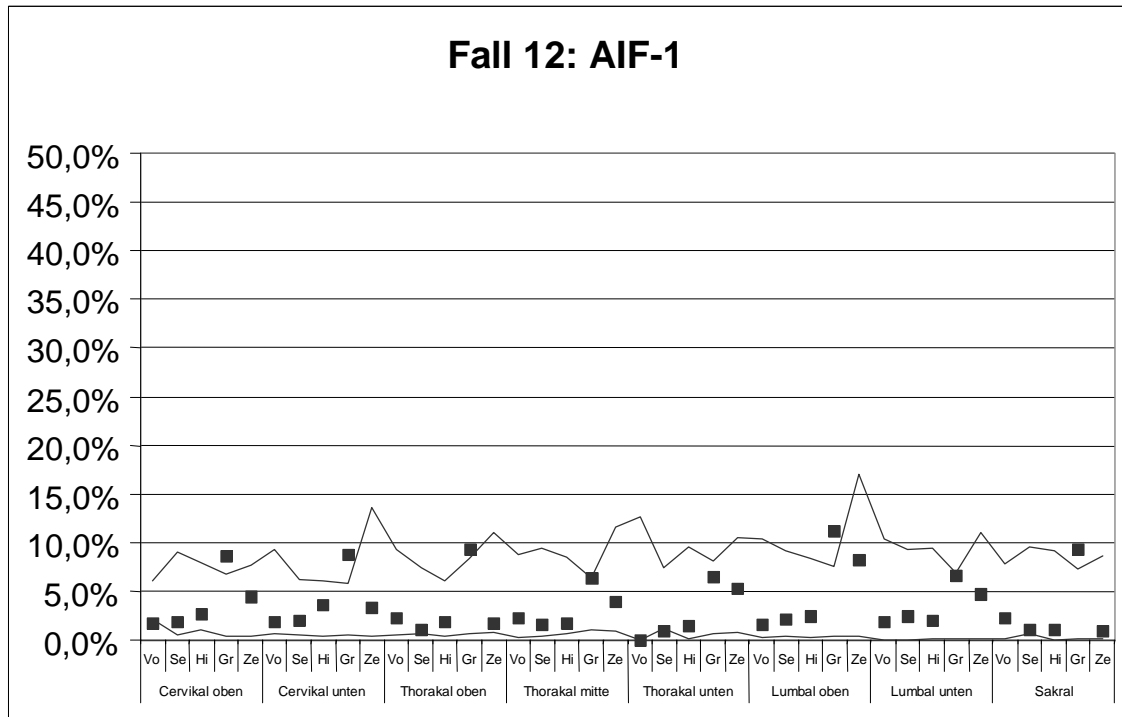


Diagramm 22

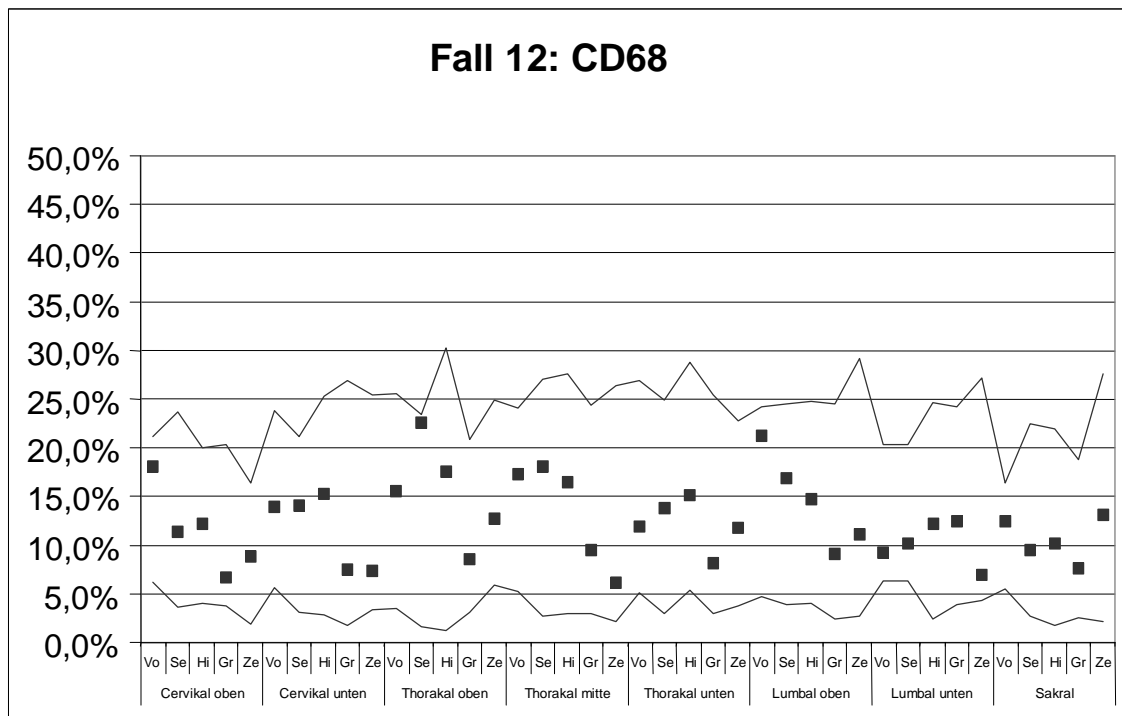


Diagramm 23

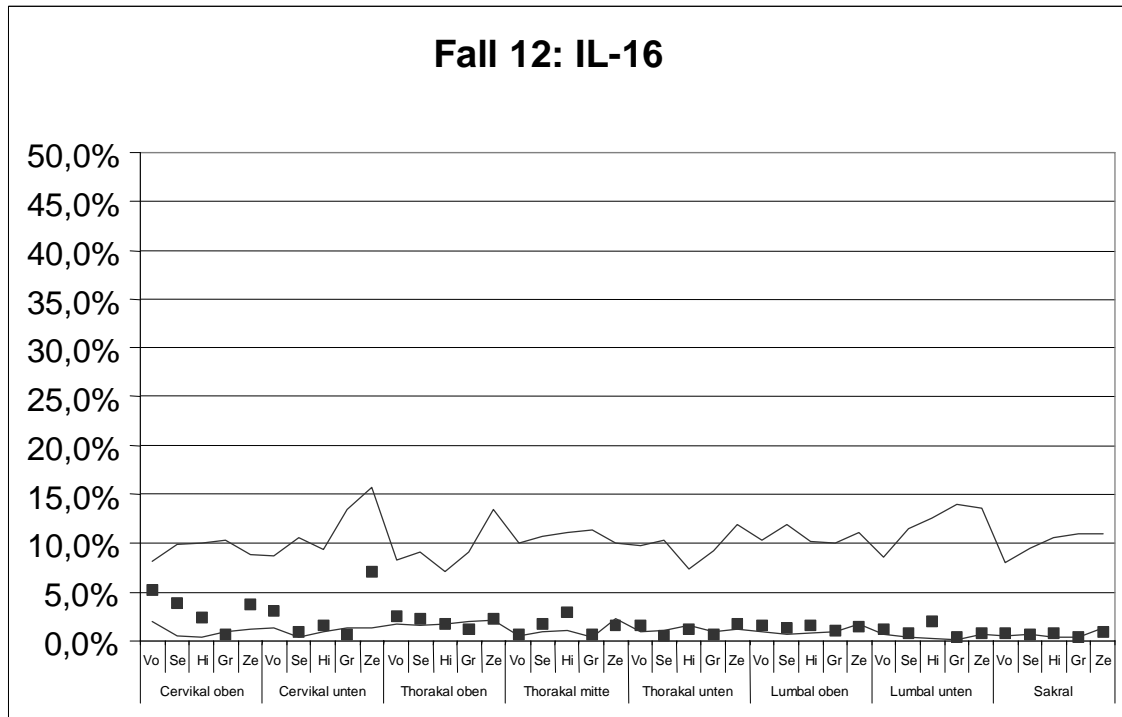


Diagramm 24

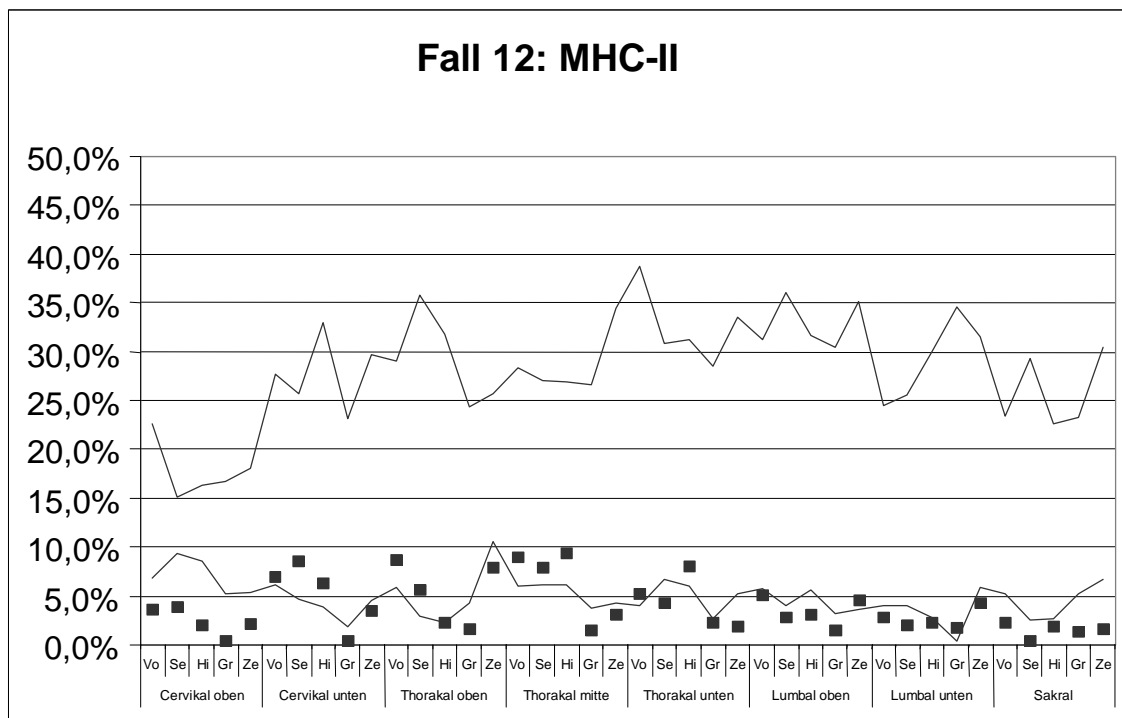


Diagramm 25

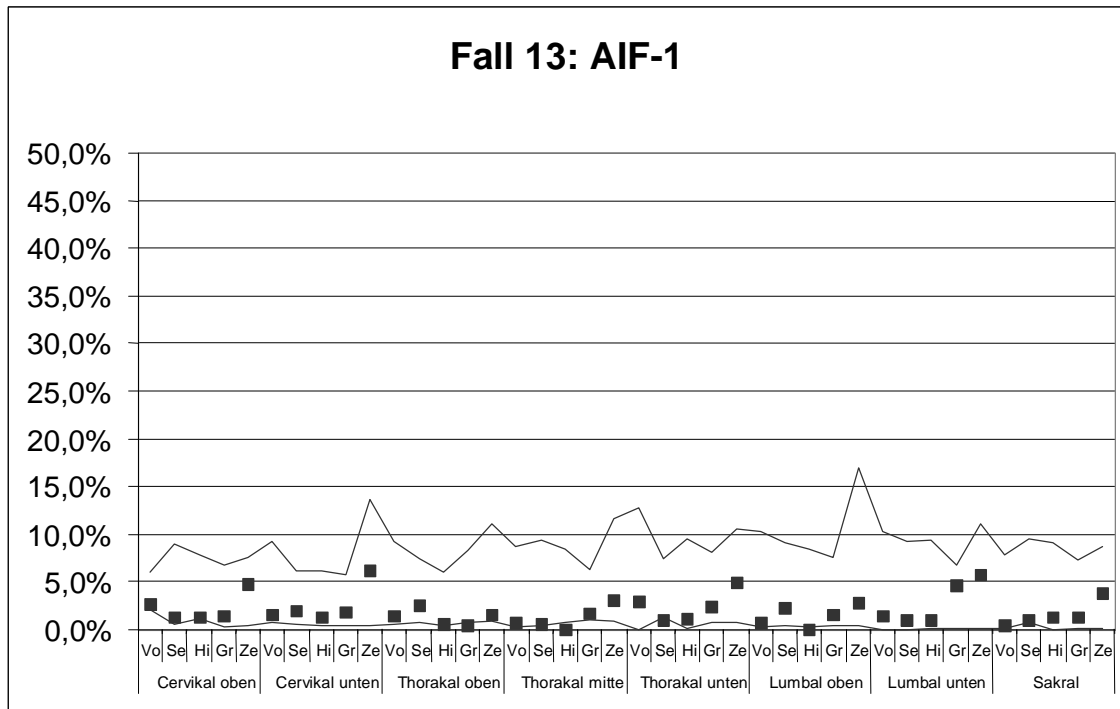


Diagramm 26

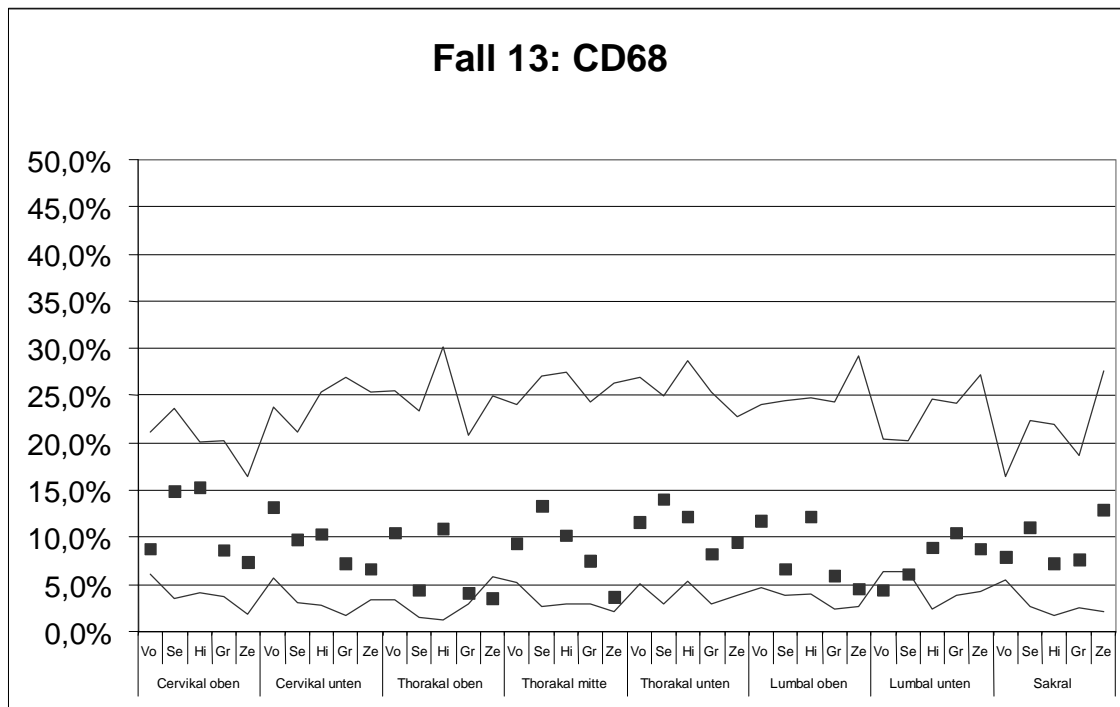


Diagramm 27

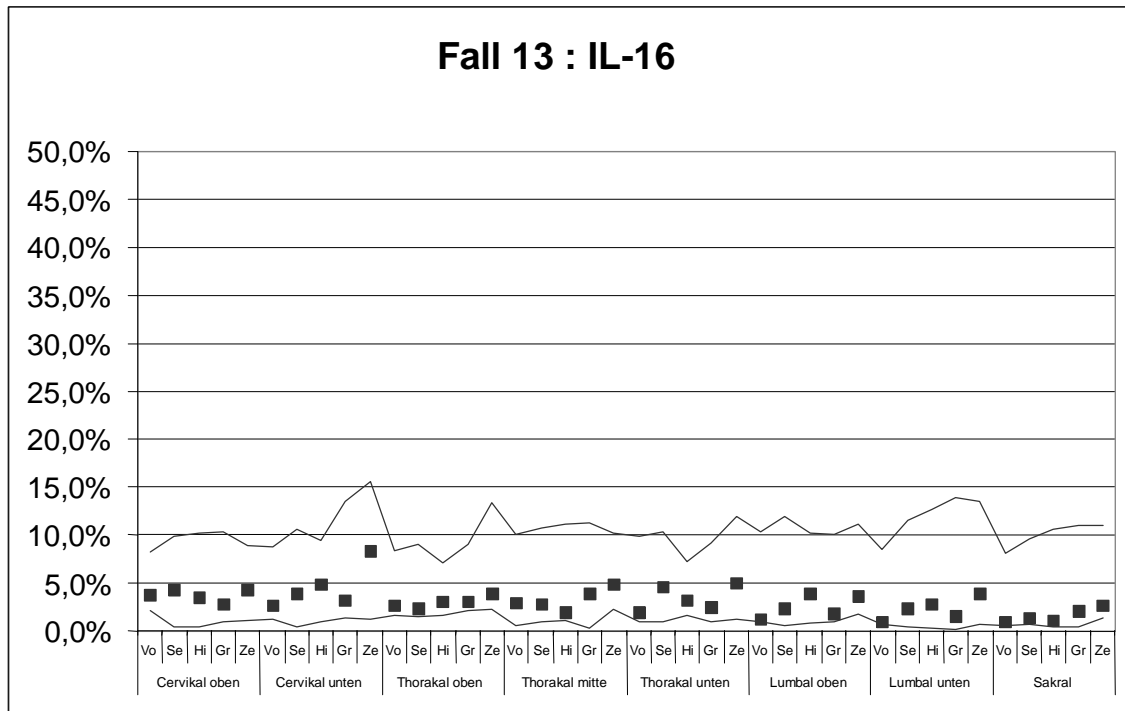


Diagramm 28

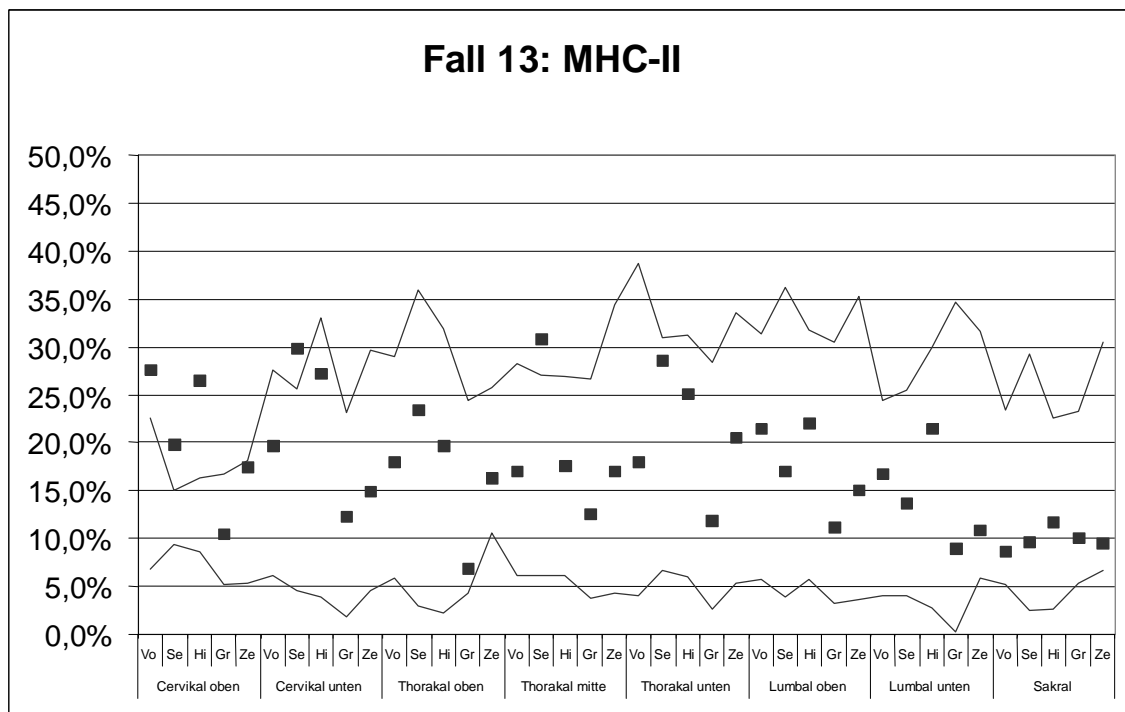


Diagramm 29



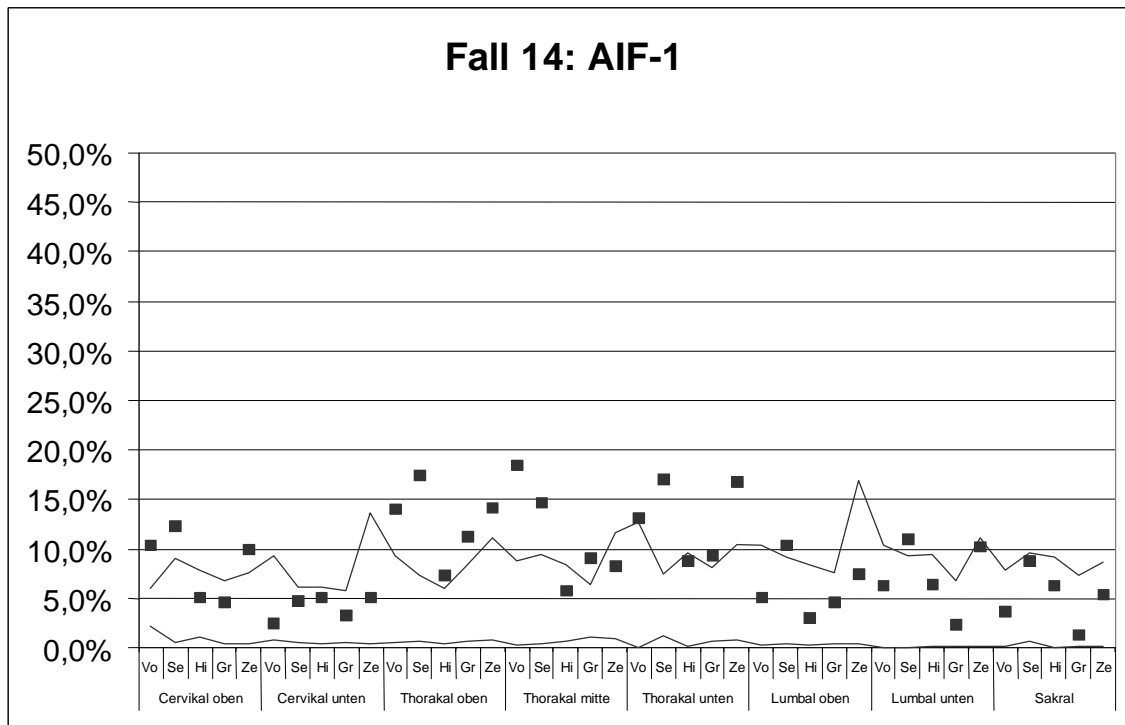


Diagramm 30

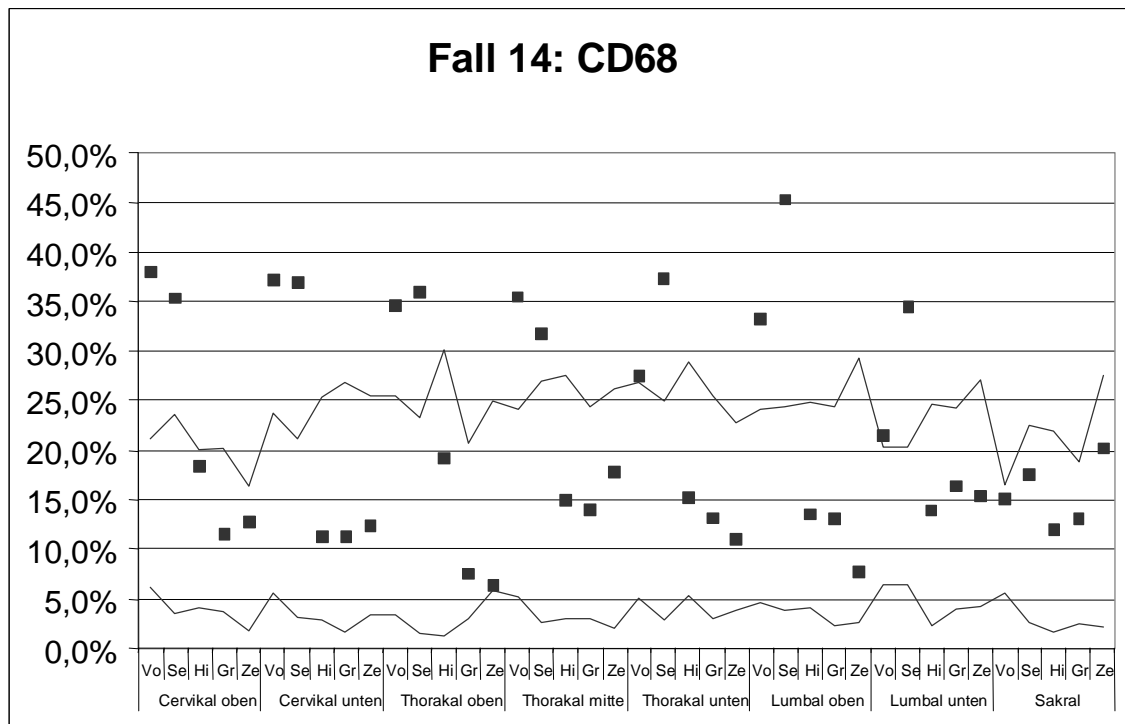


Diagramm 31

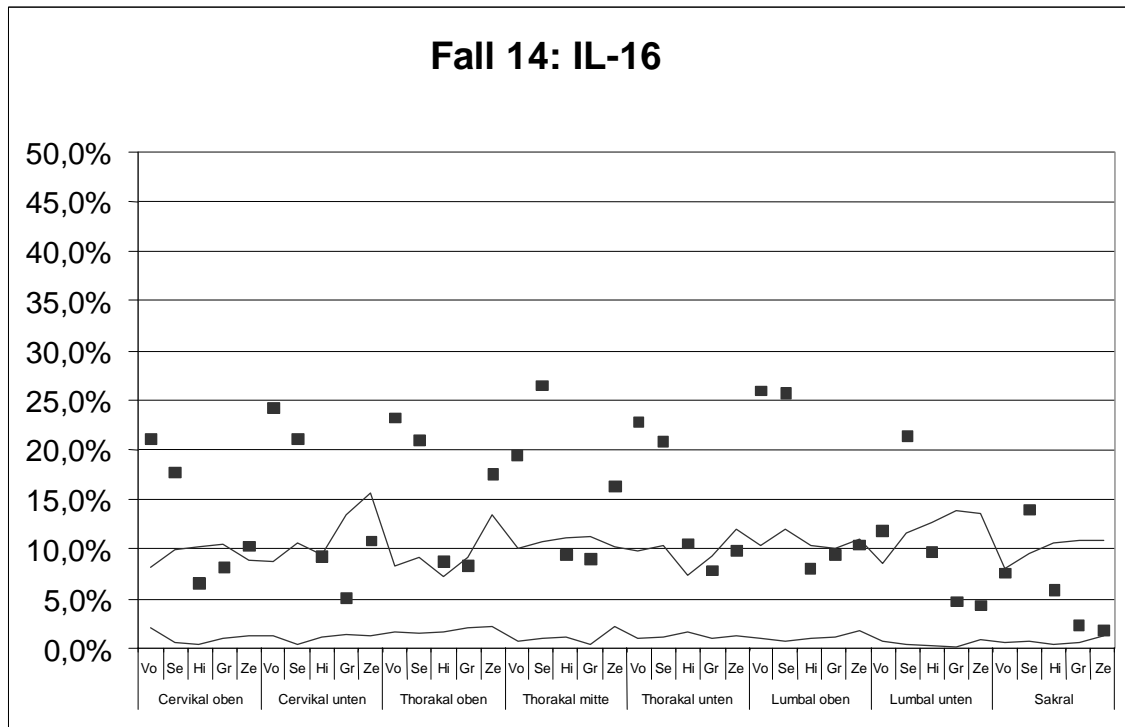


Diagramm 32

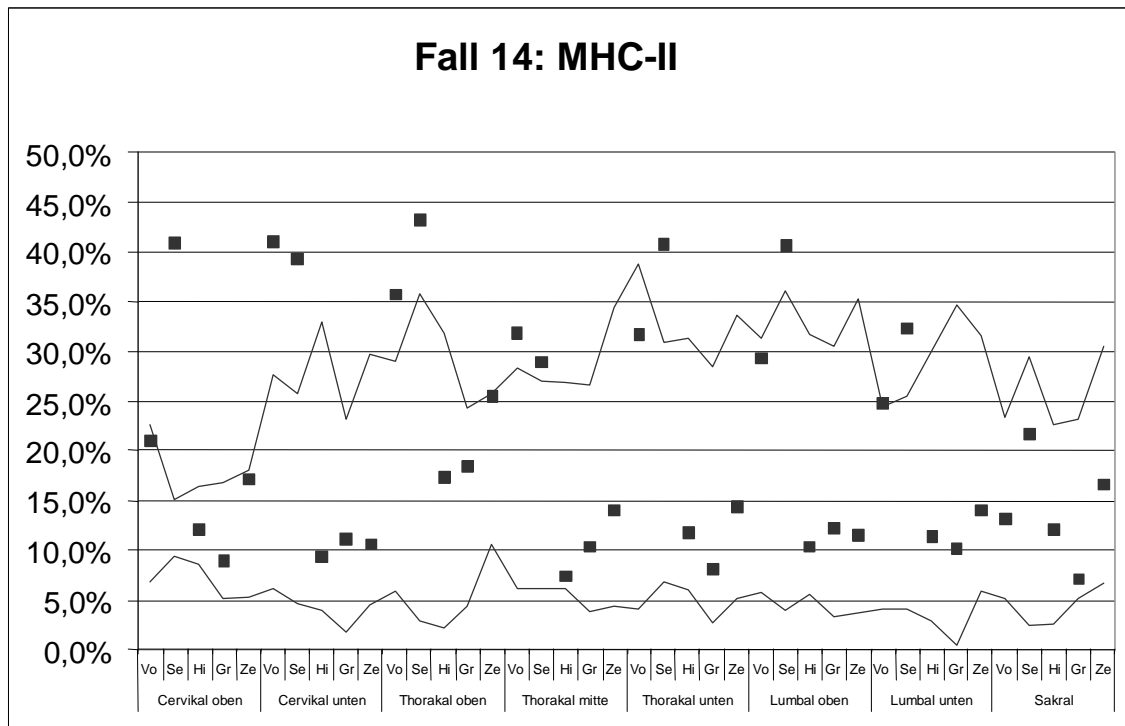


Diagramm 33

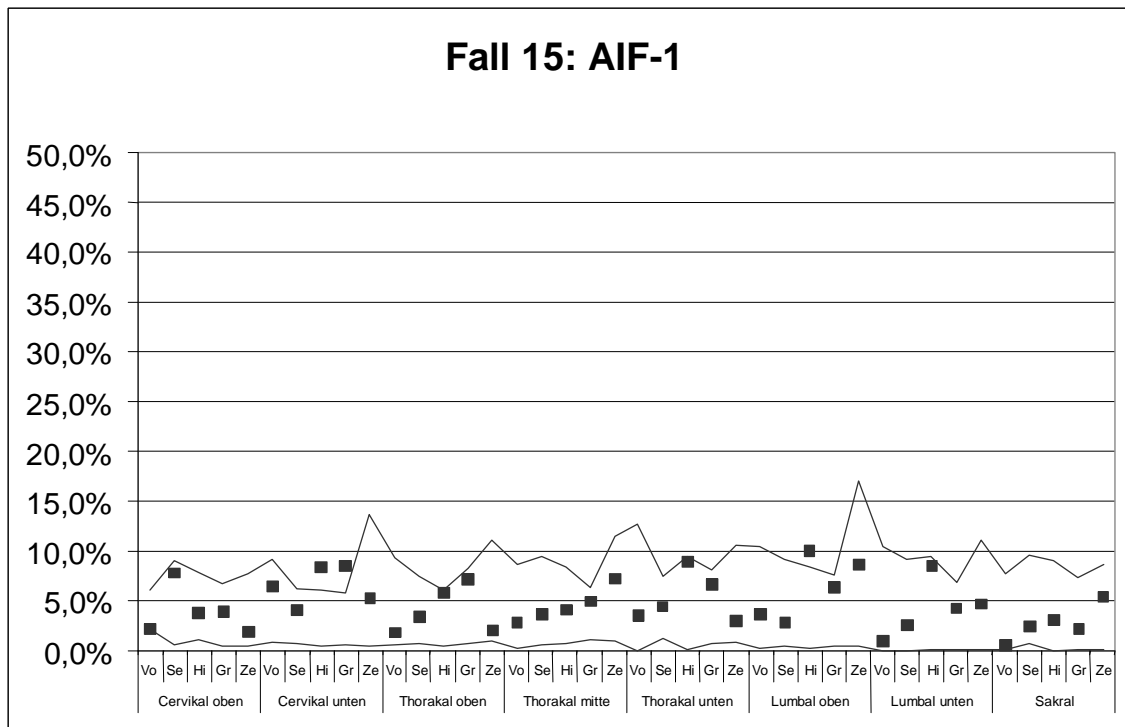


Diagramm 34

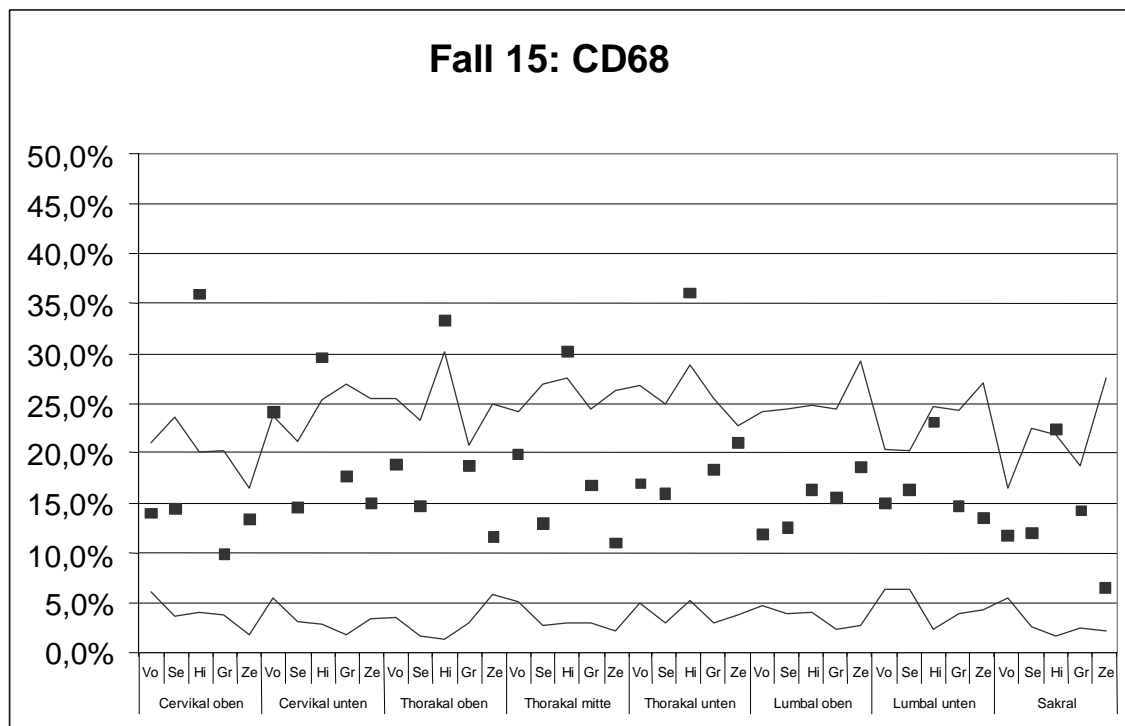


Diagramm 35

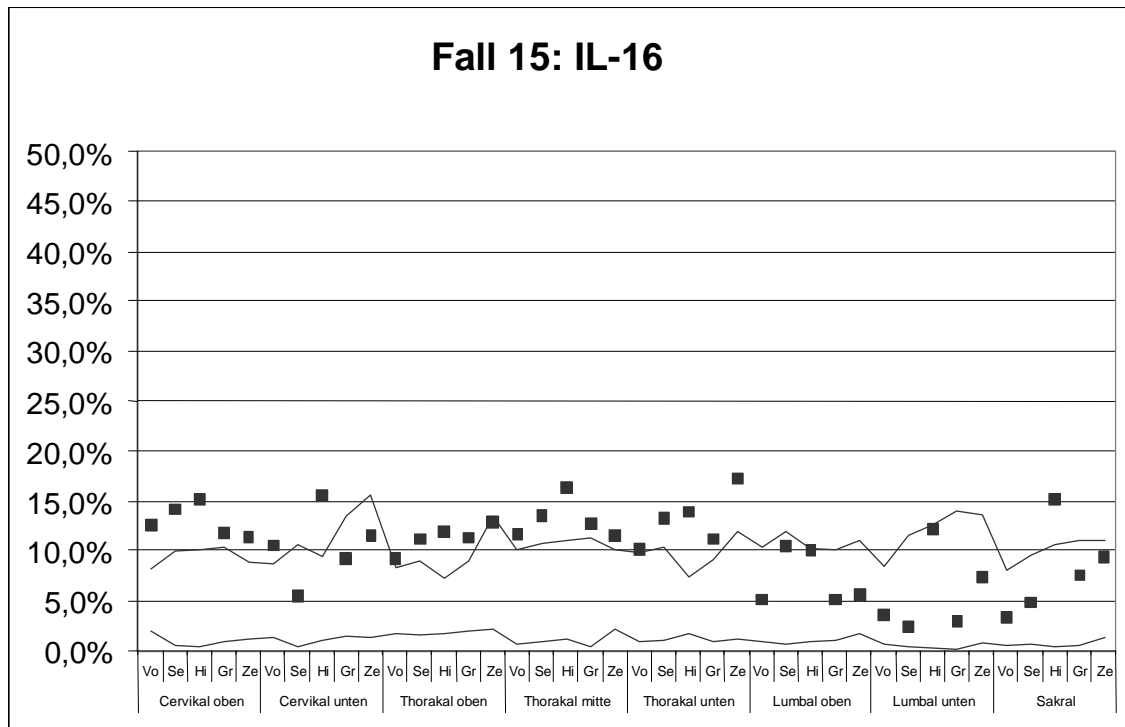


Diagramm 36

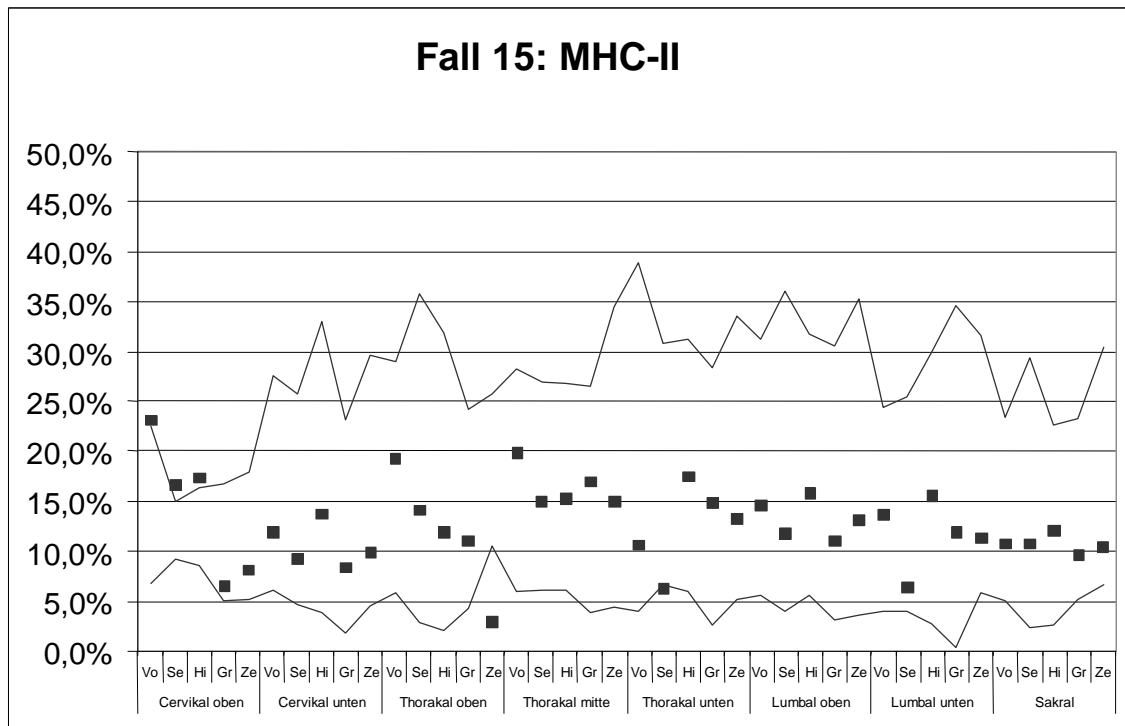


Diagramm 37

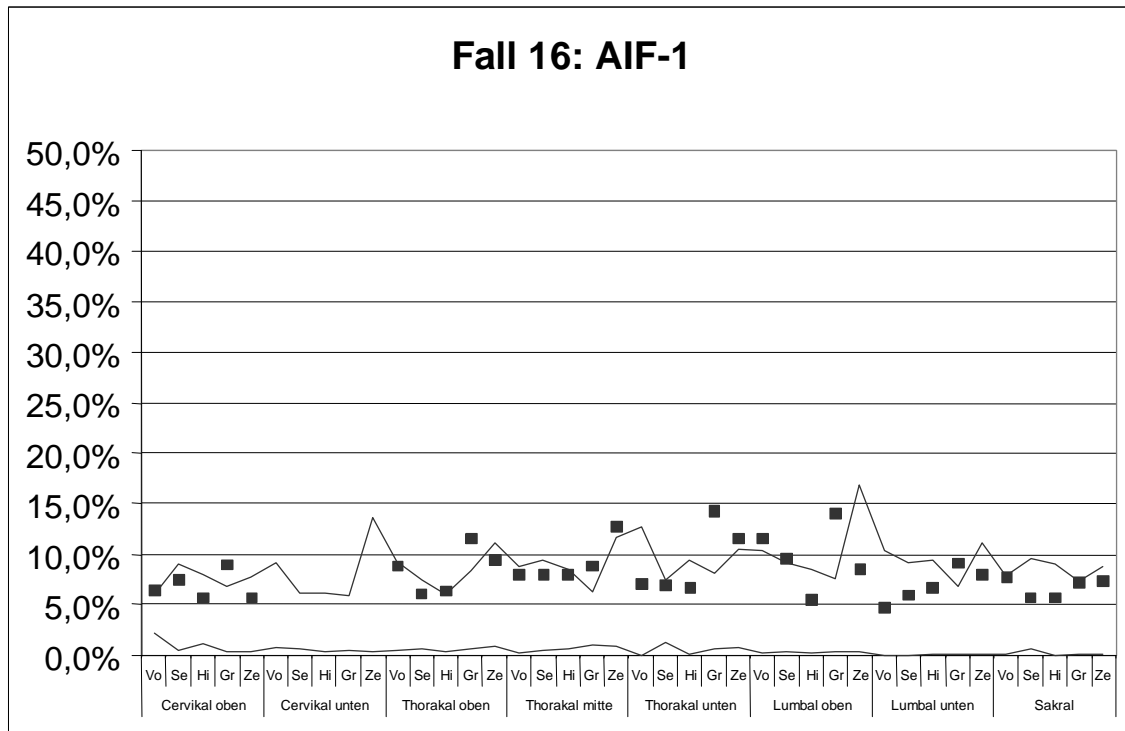


Diagramm 38

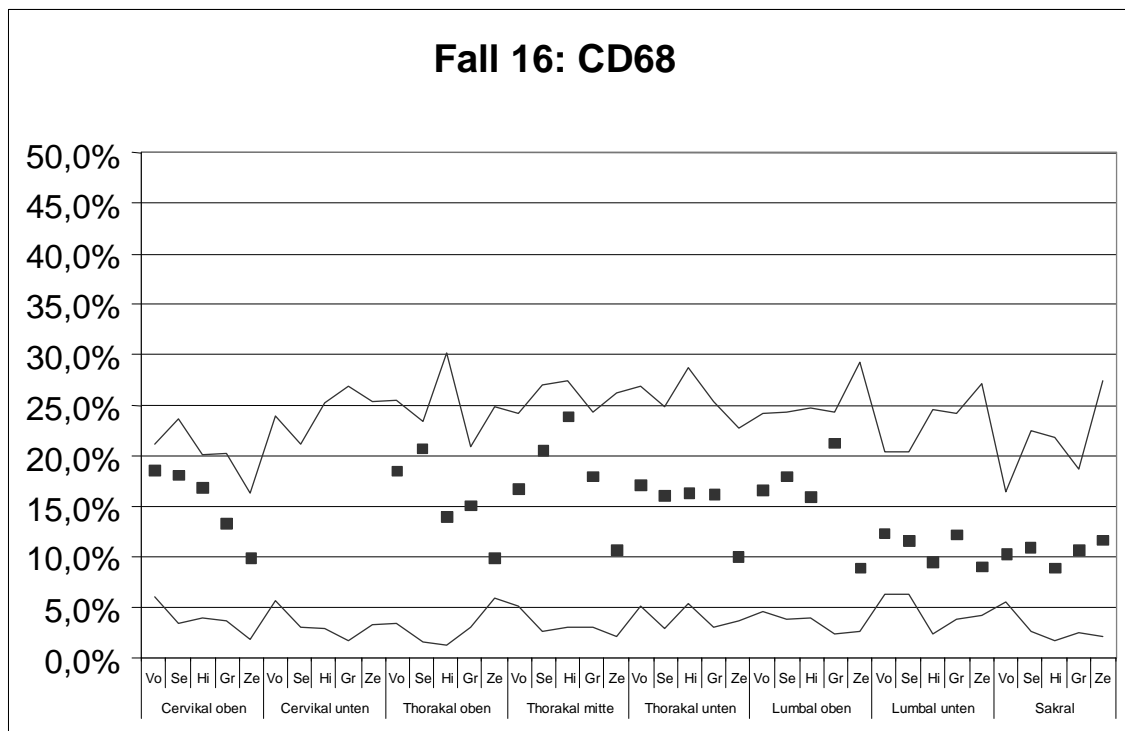


Diagramm 39

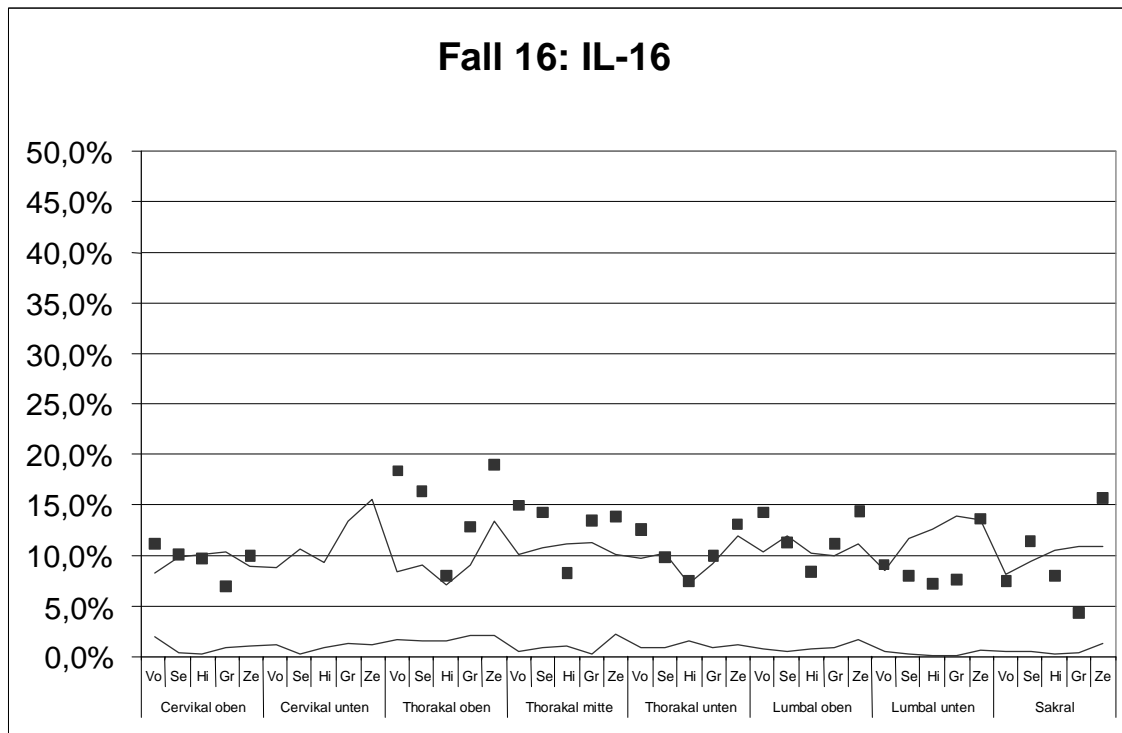


Diagramm 40

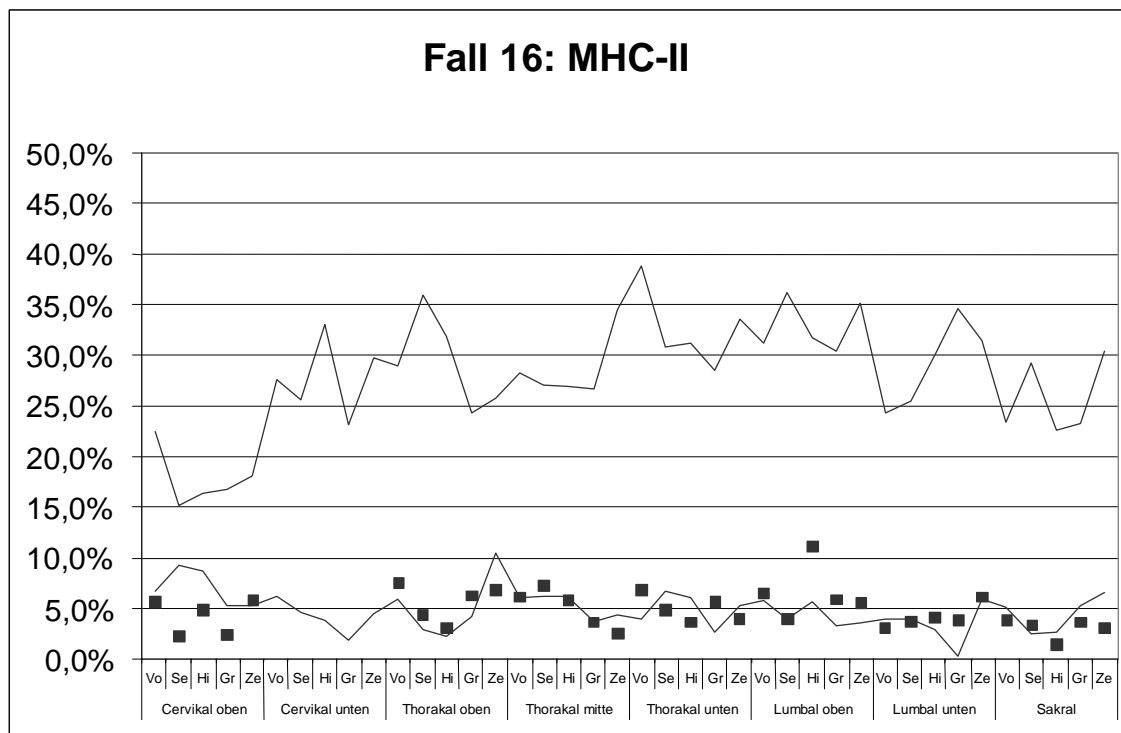


Diagramm 41

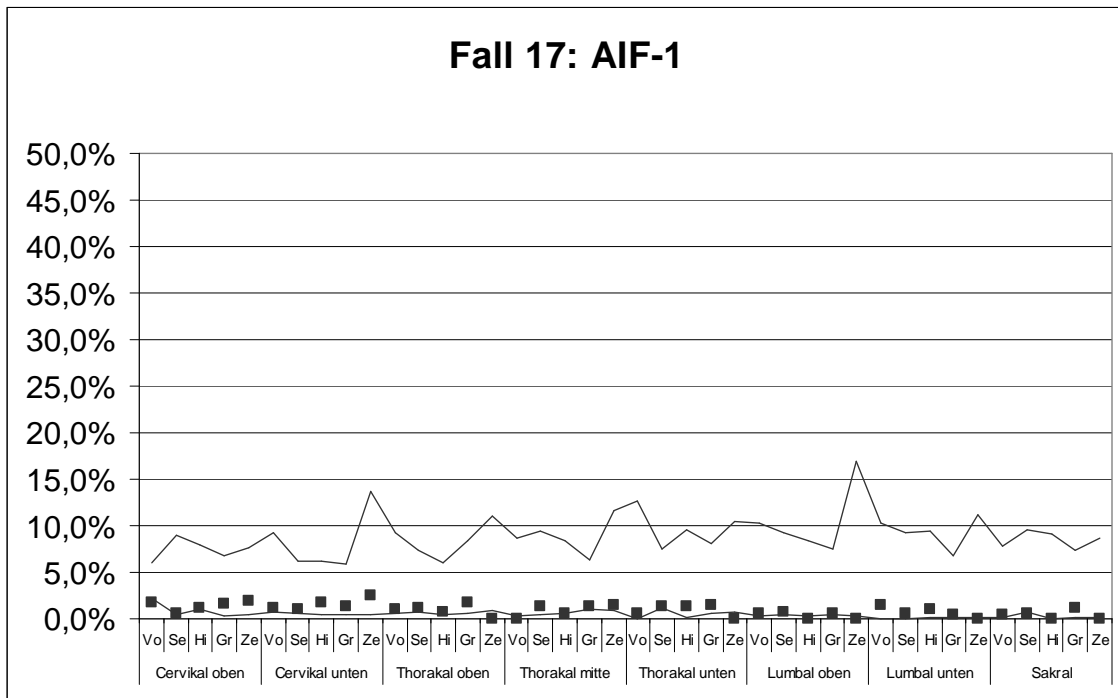


Diagramm 42

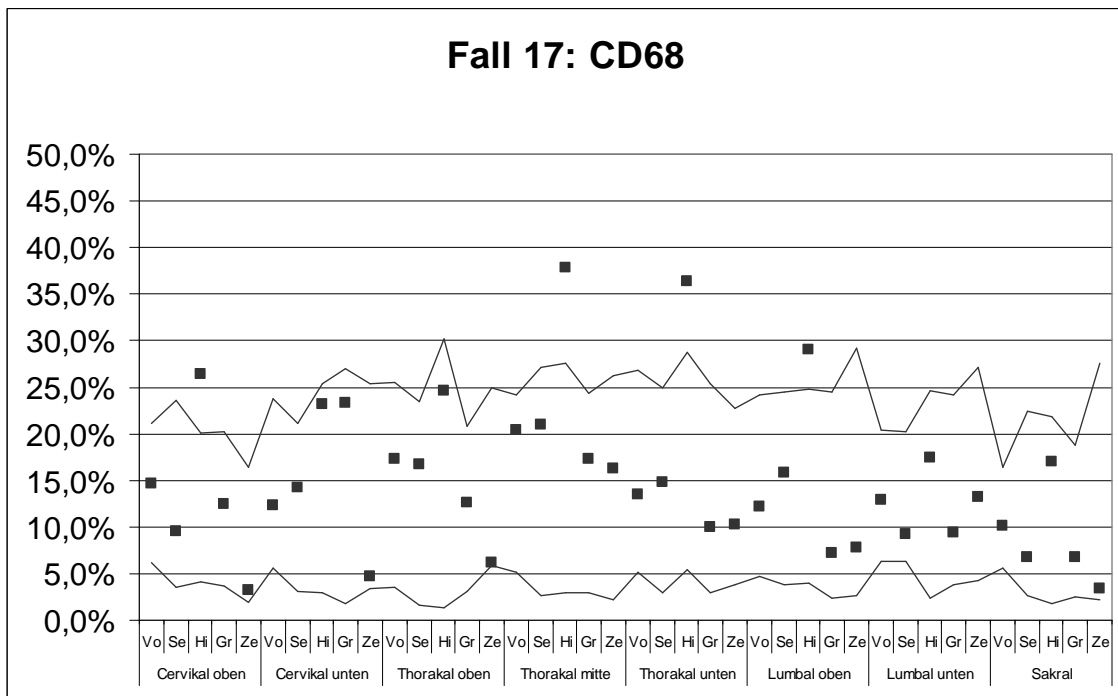


Diagramm 43

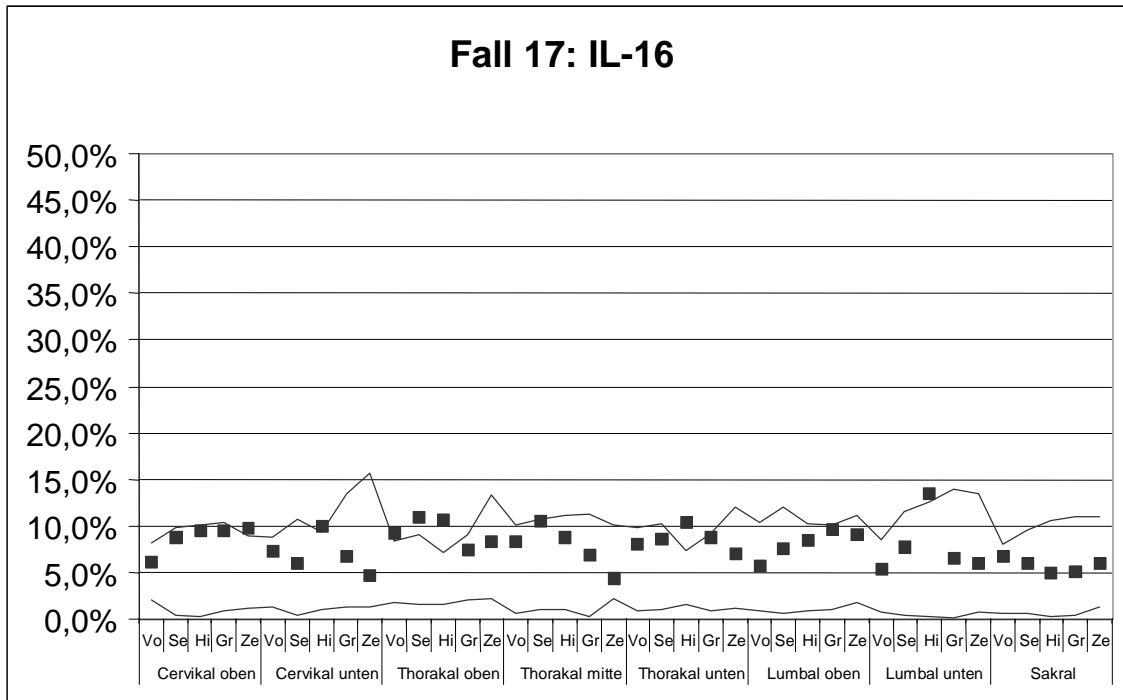


Diagramm 44

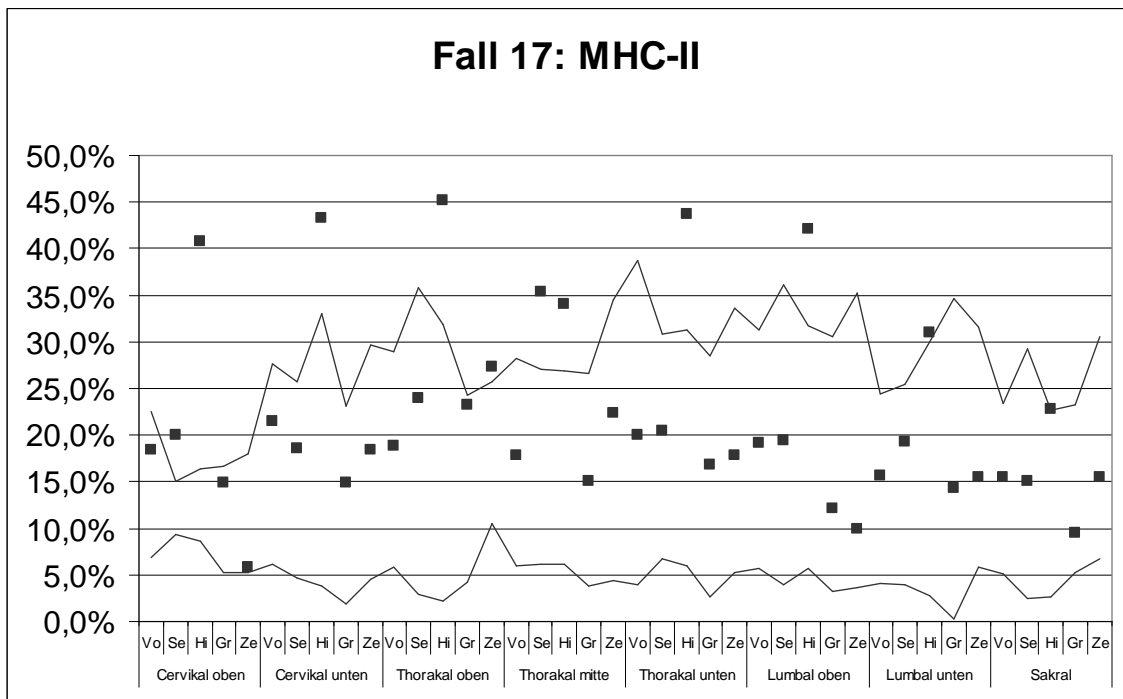


Diagramm 45



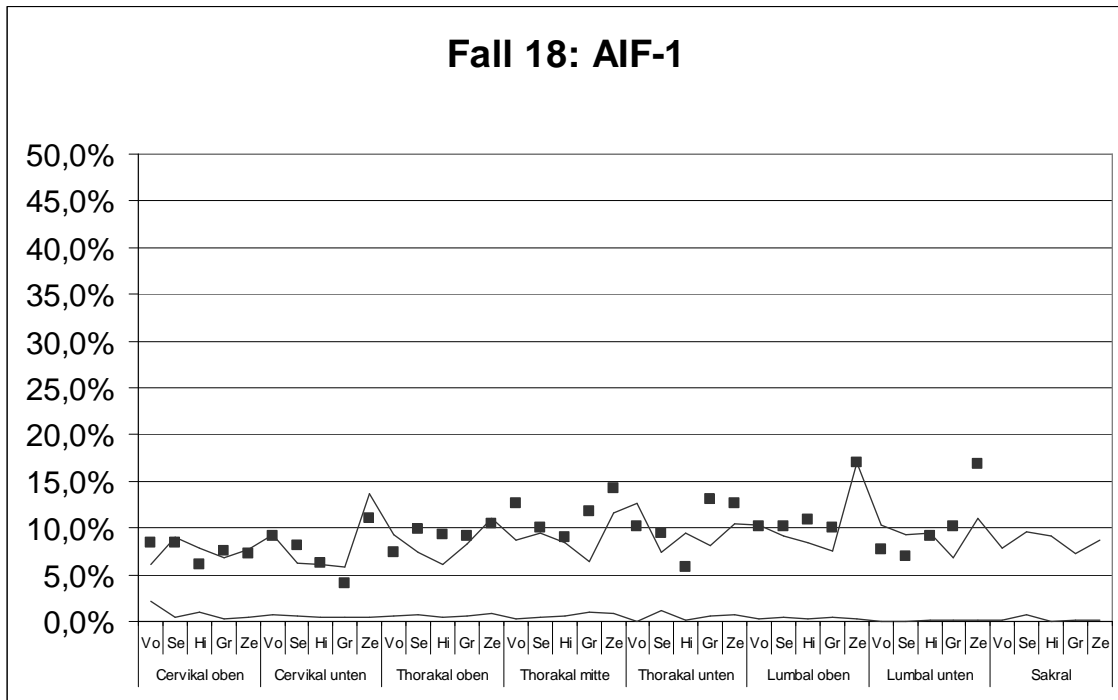


Diagramm 46

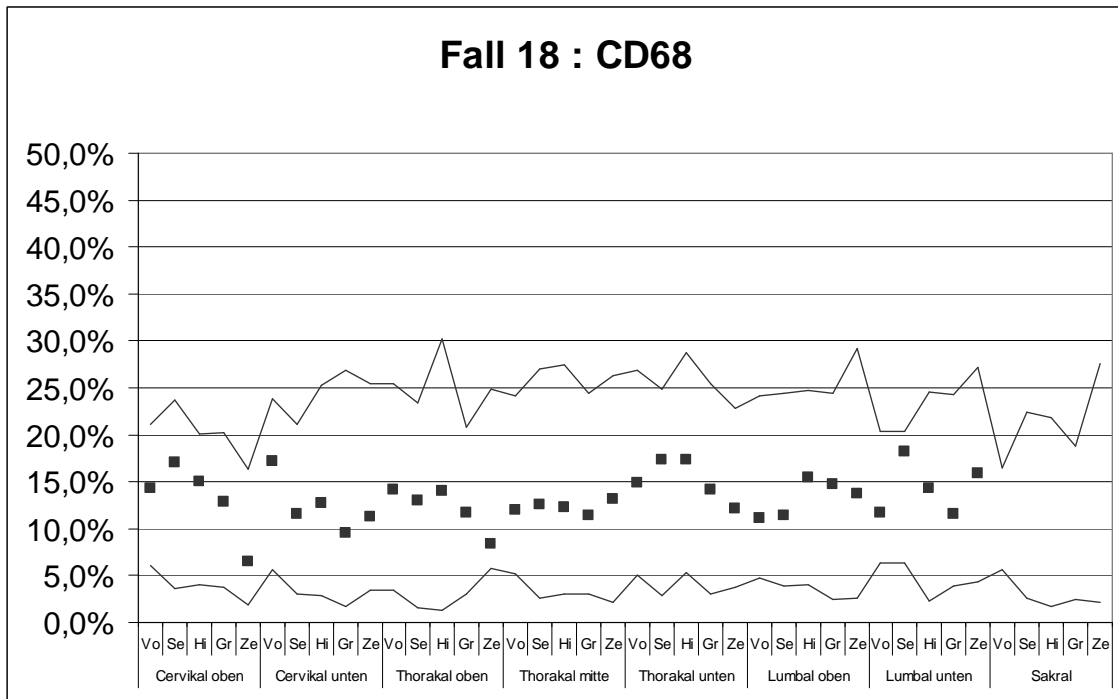


Diagramm 47

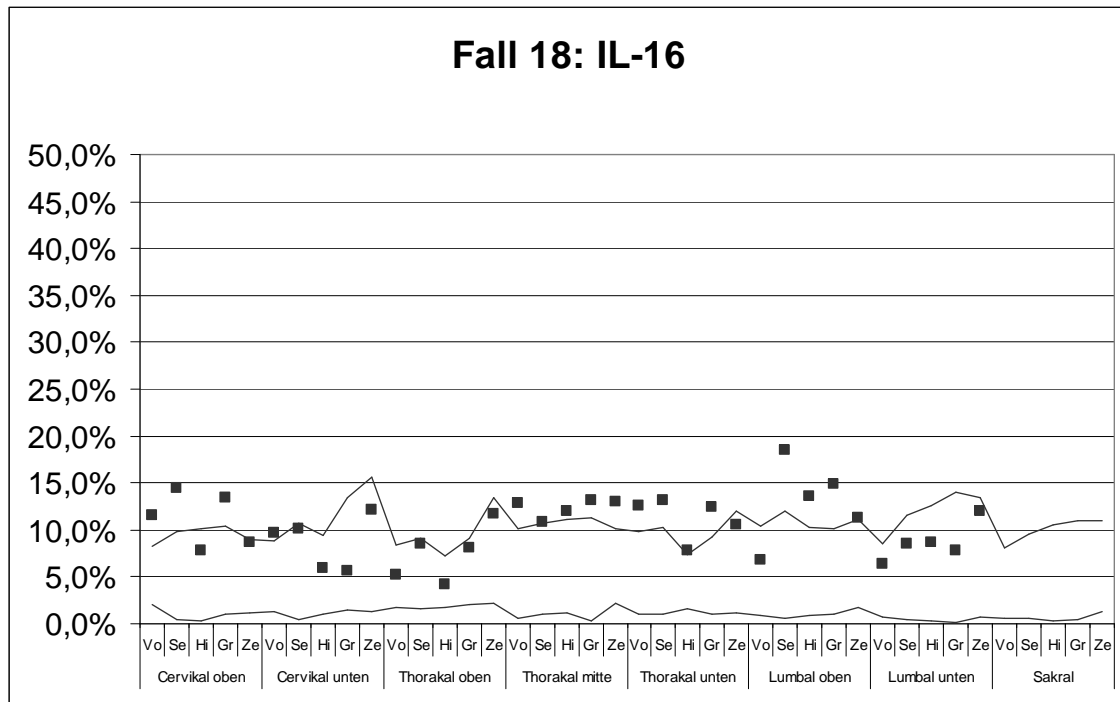


Diagramm 48

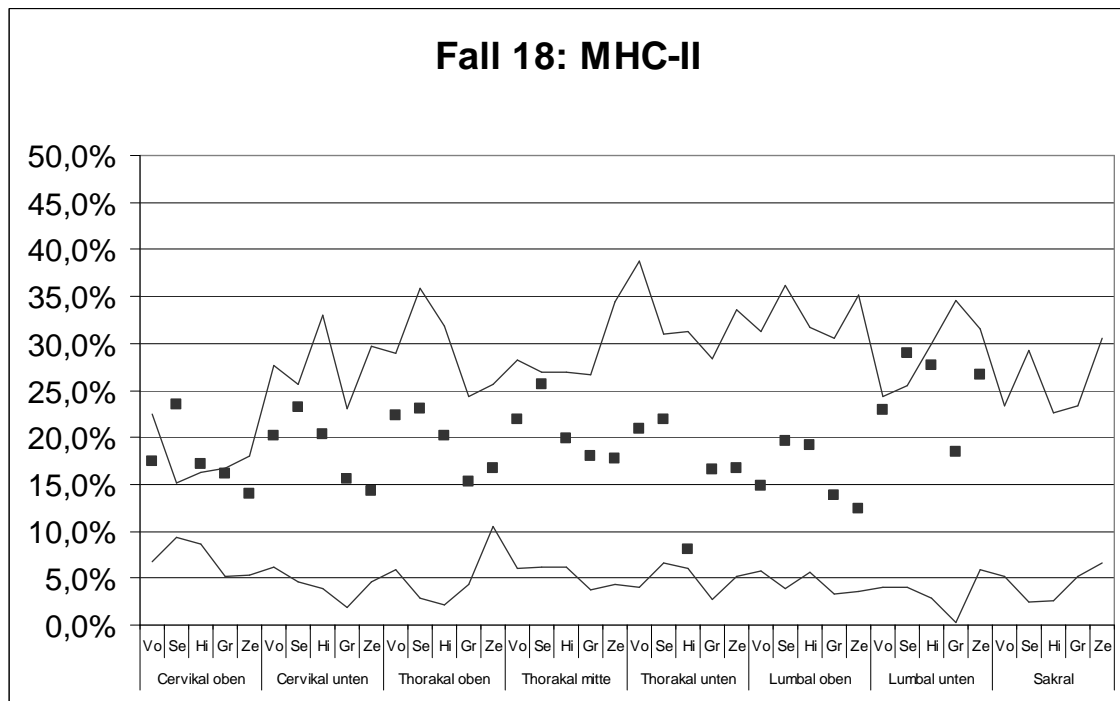


Diagramm 49

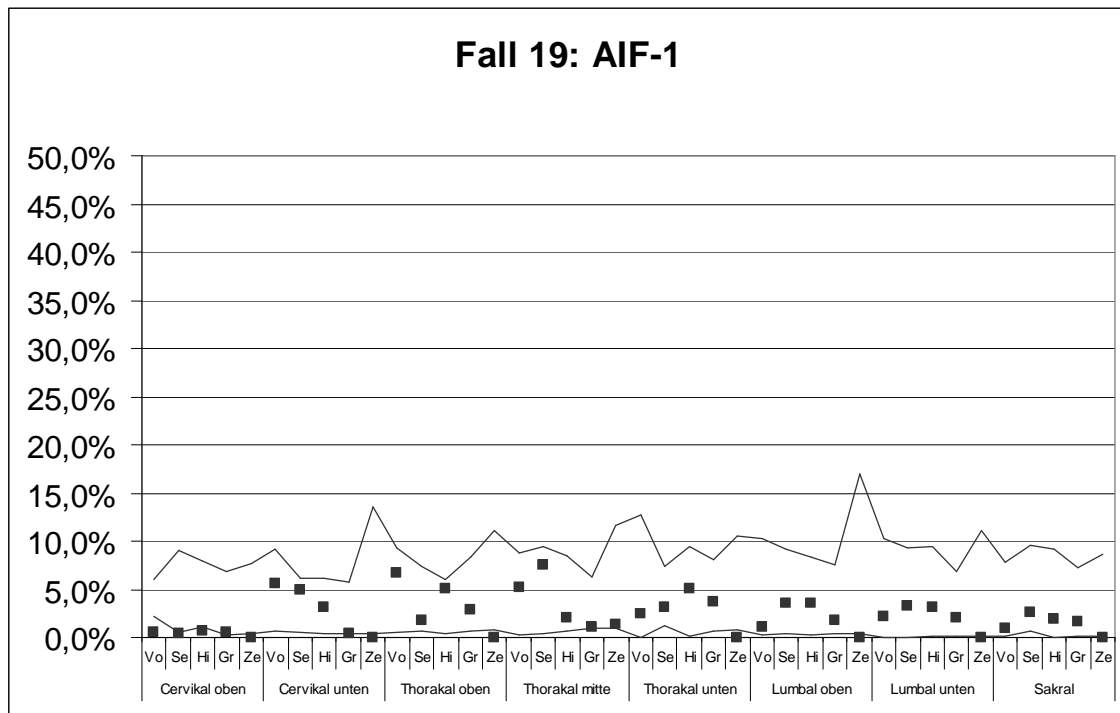


Diagramm 50

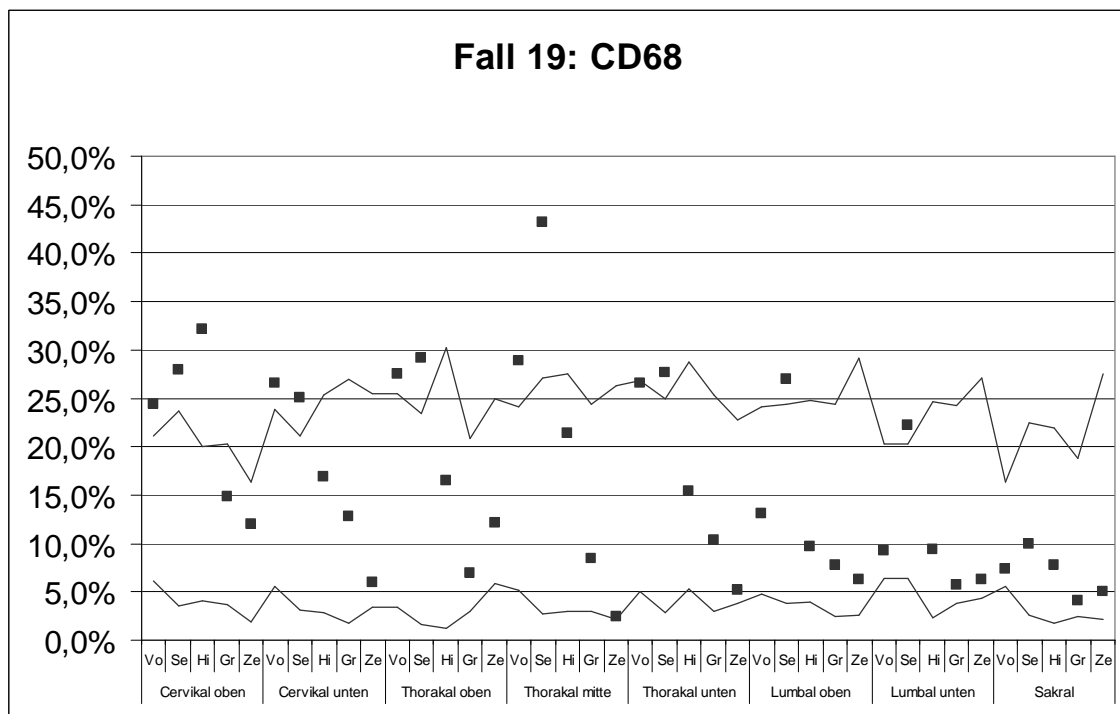


Diagramm 51

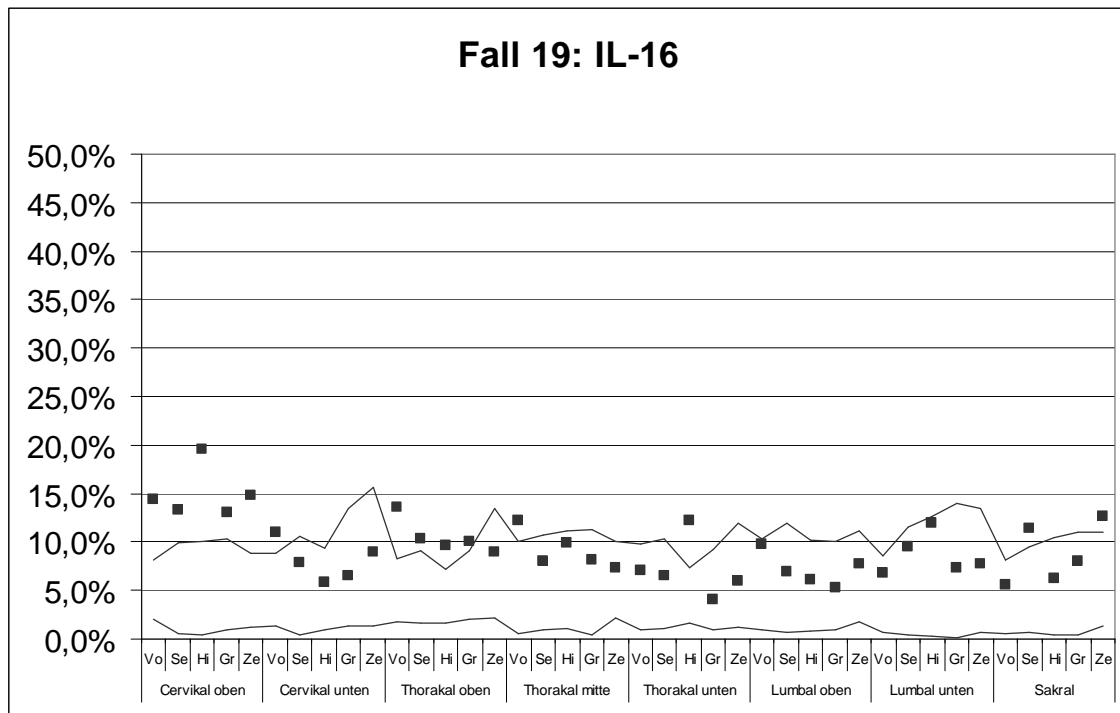


Diagramm 52

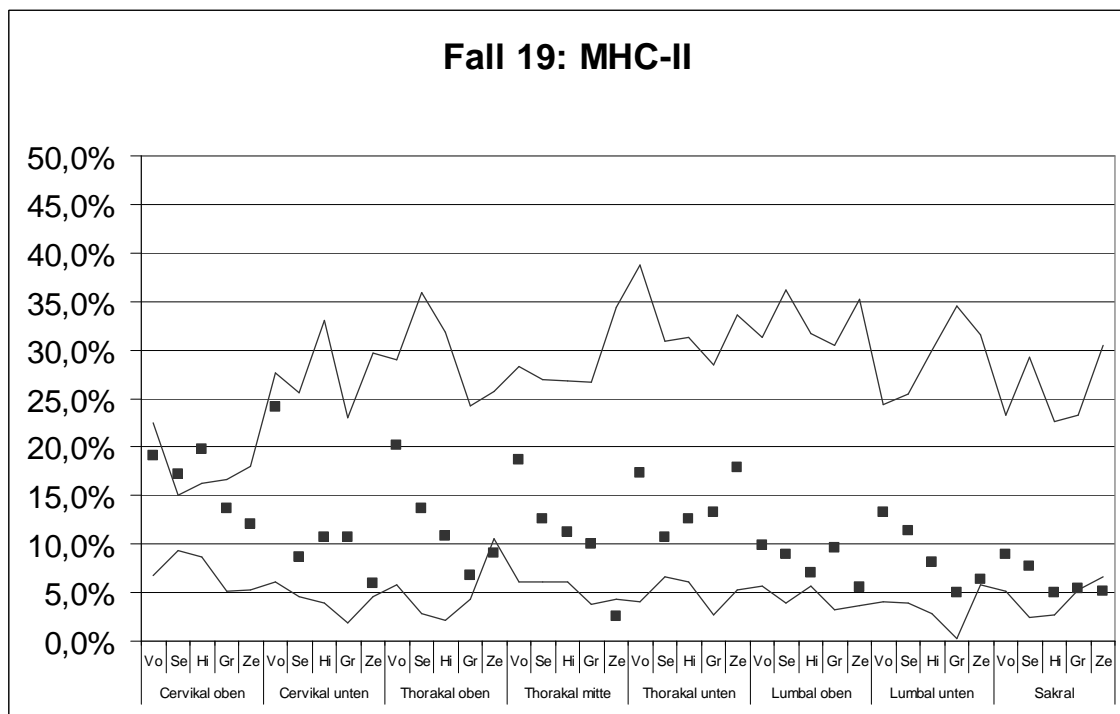


Diagramm 53

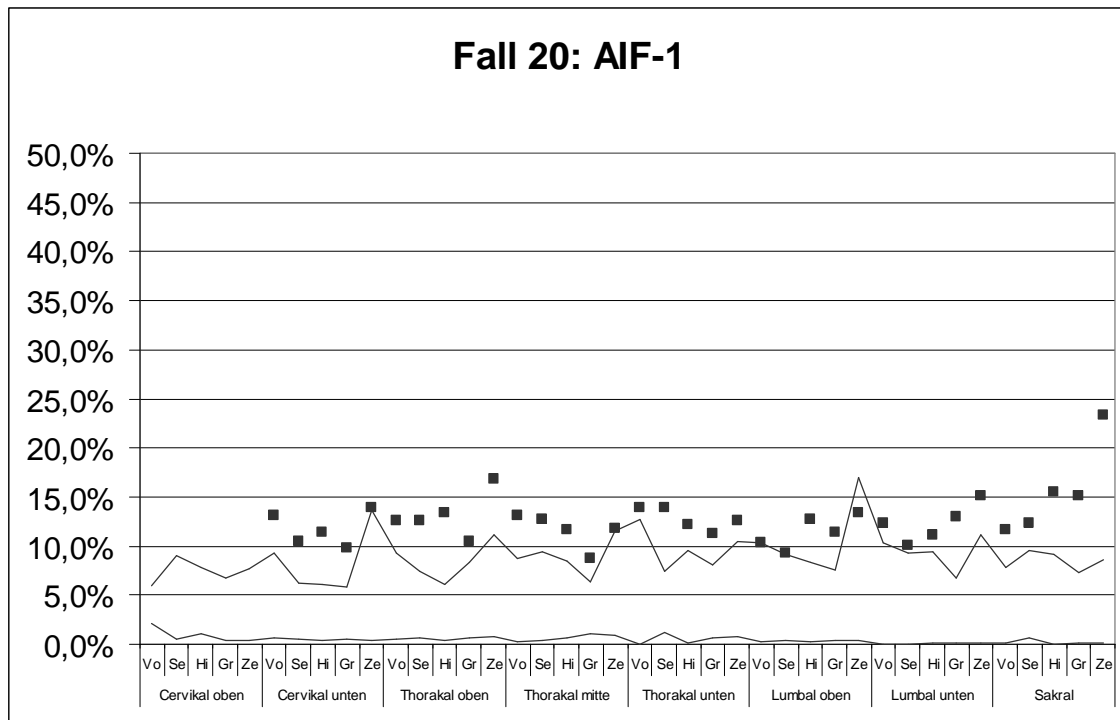


Diagramm 54

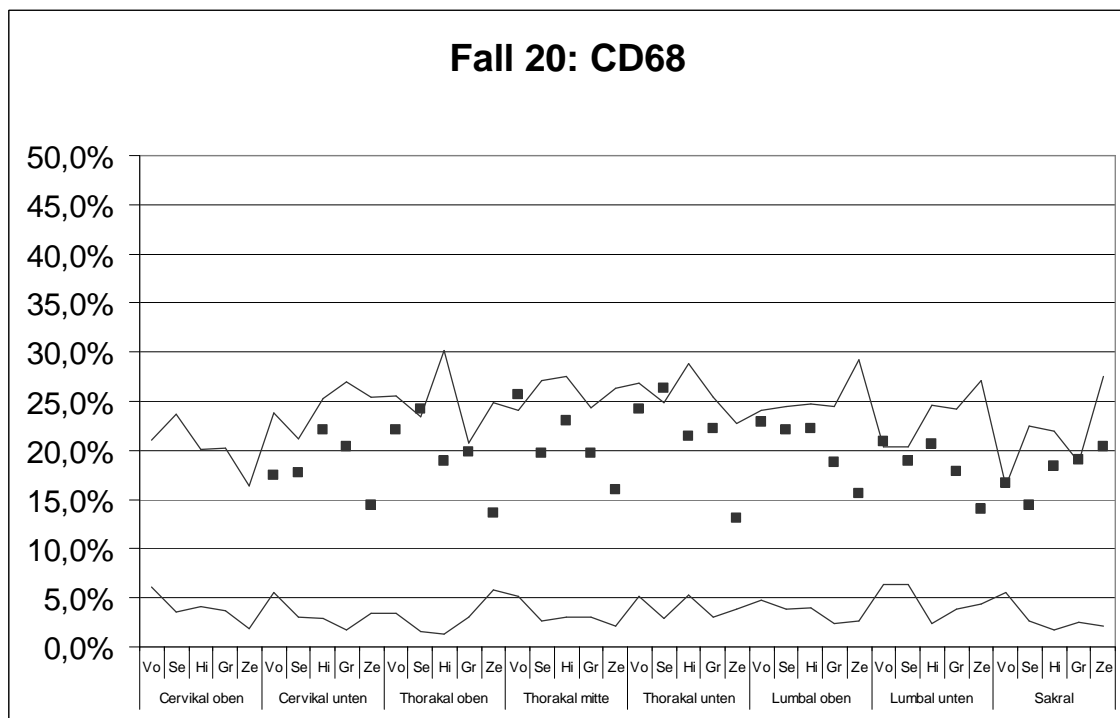


Diagramm 55

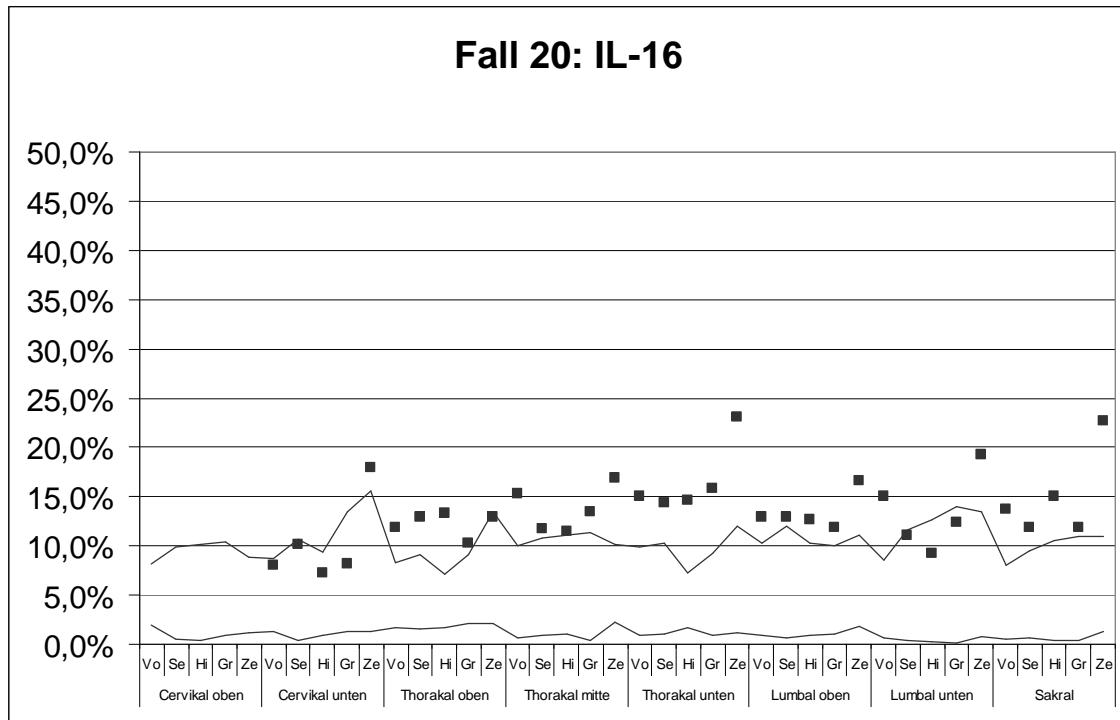


Diagramm 56

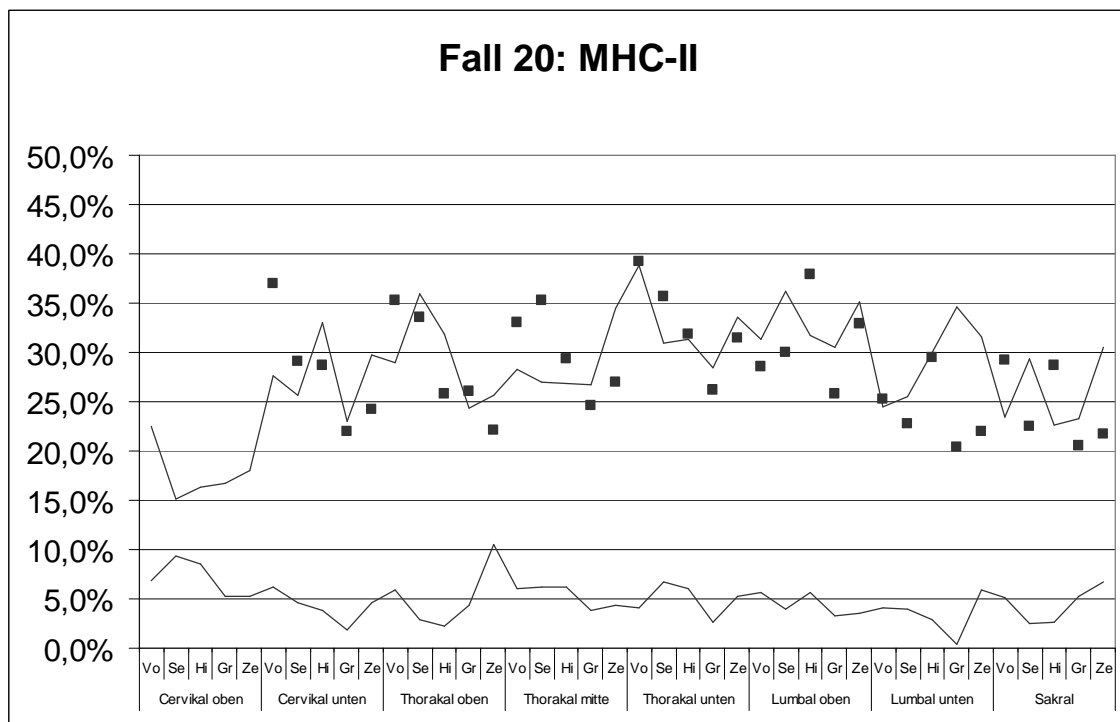


Diagramm 57

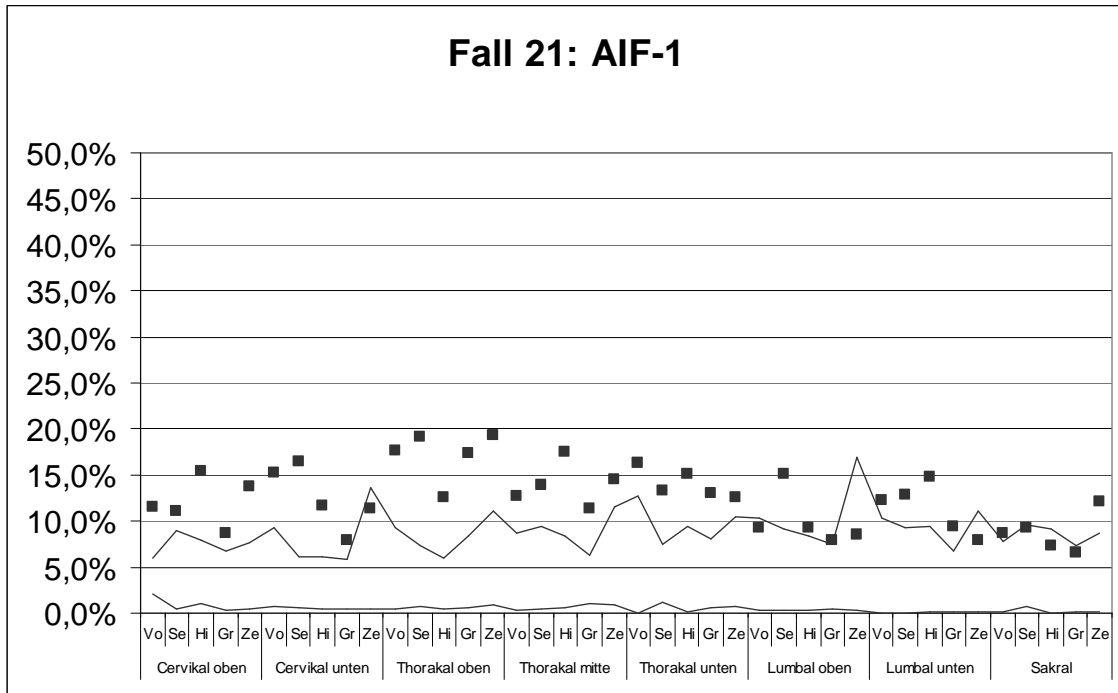


Diagramm 58

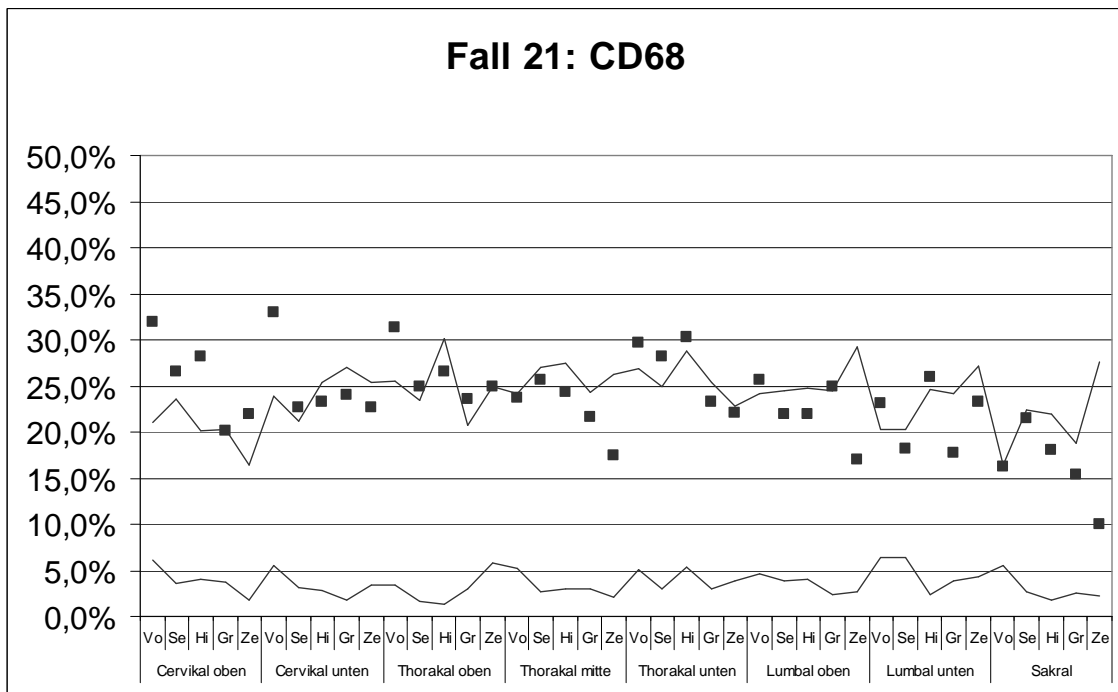


Diagramm 59

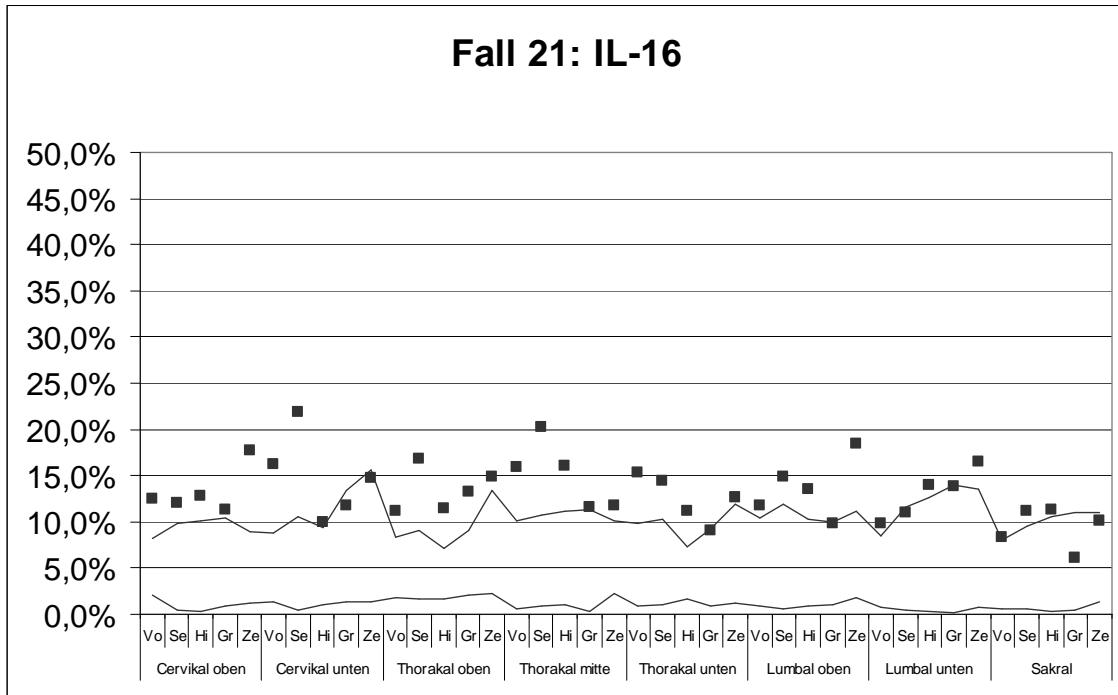


Diagramm 60

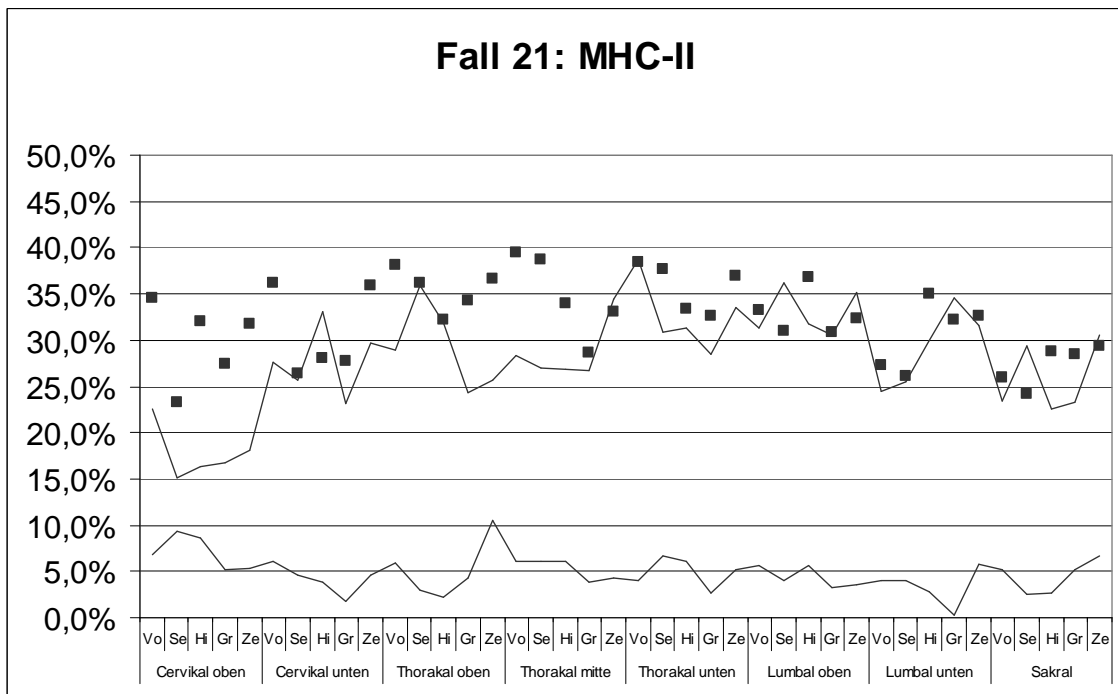


Diagramm 61



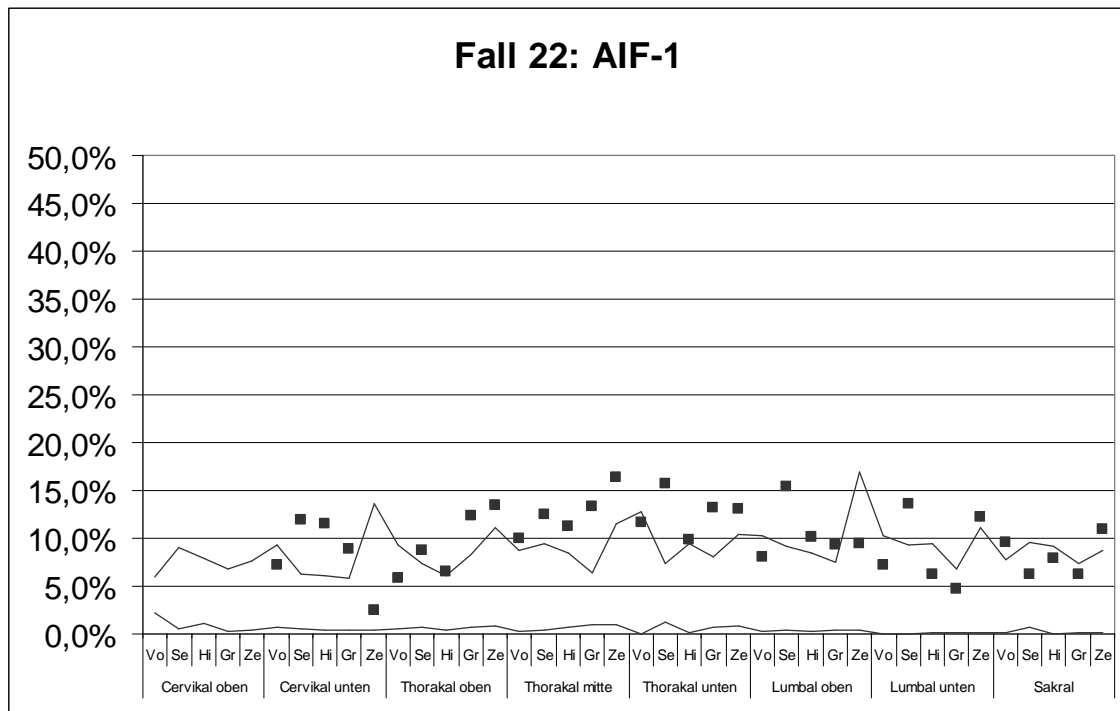


Diagramm 62

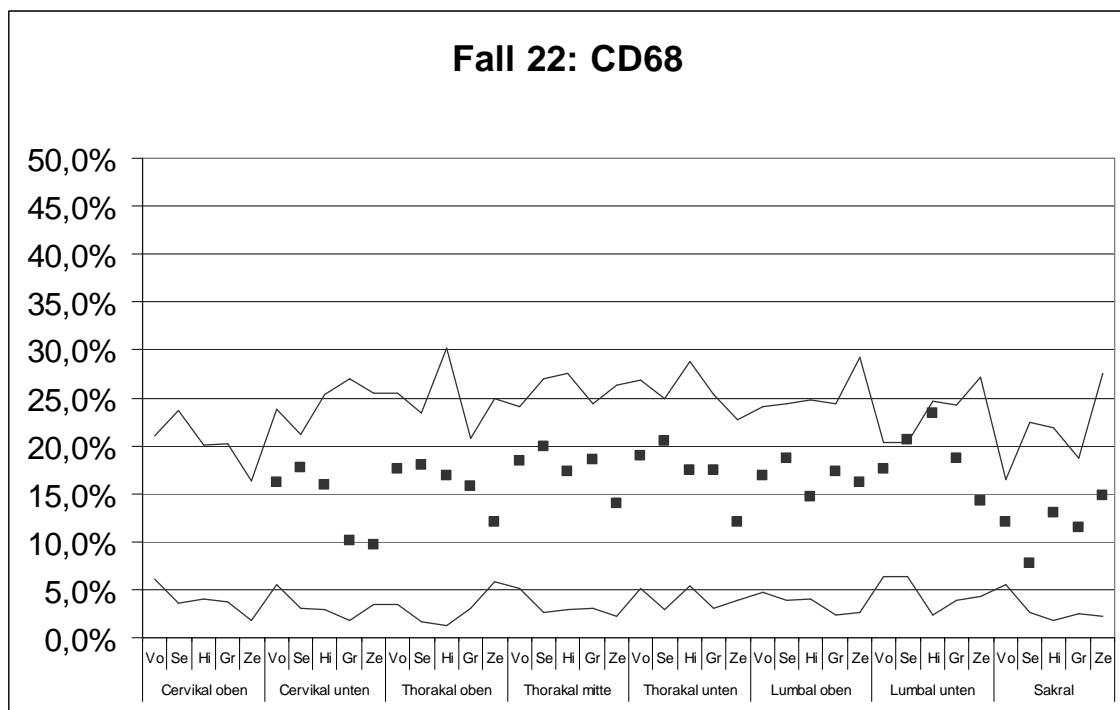


Diagramm 63

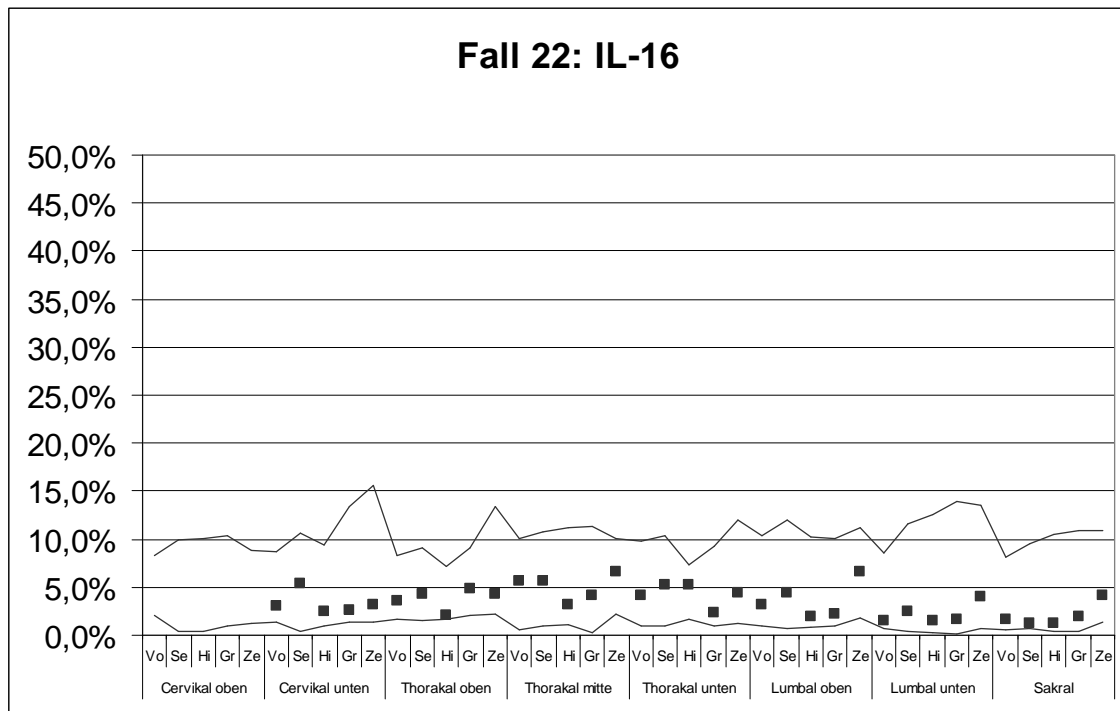


Diagramm 64

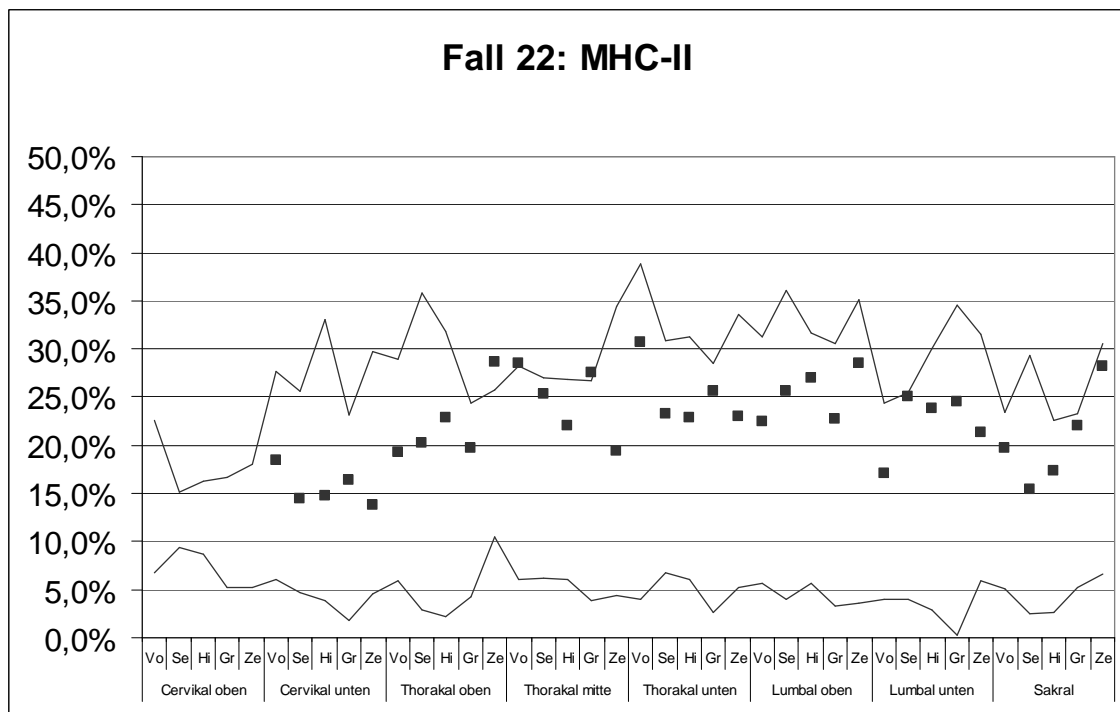


Diagramm 65

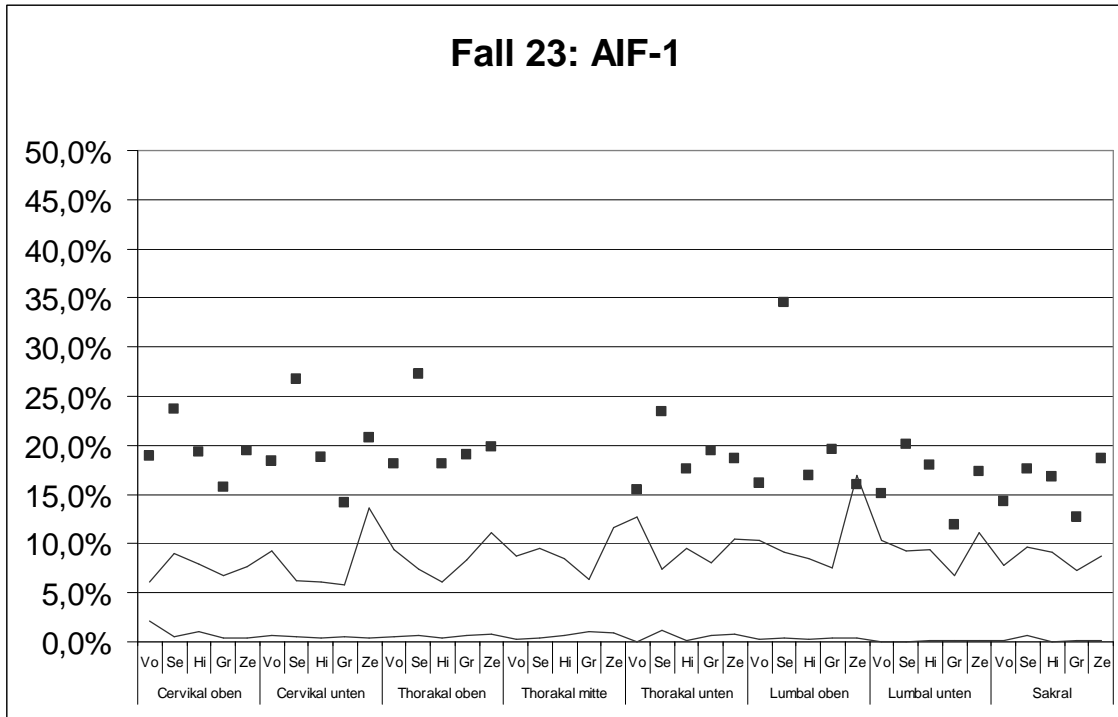


Diagramm 66

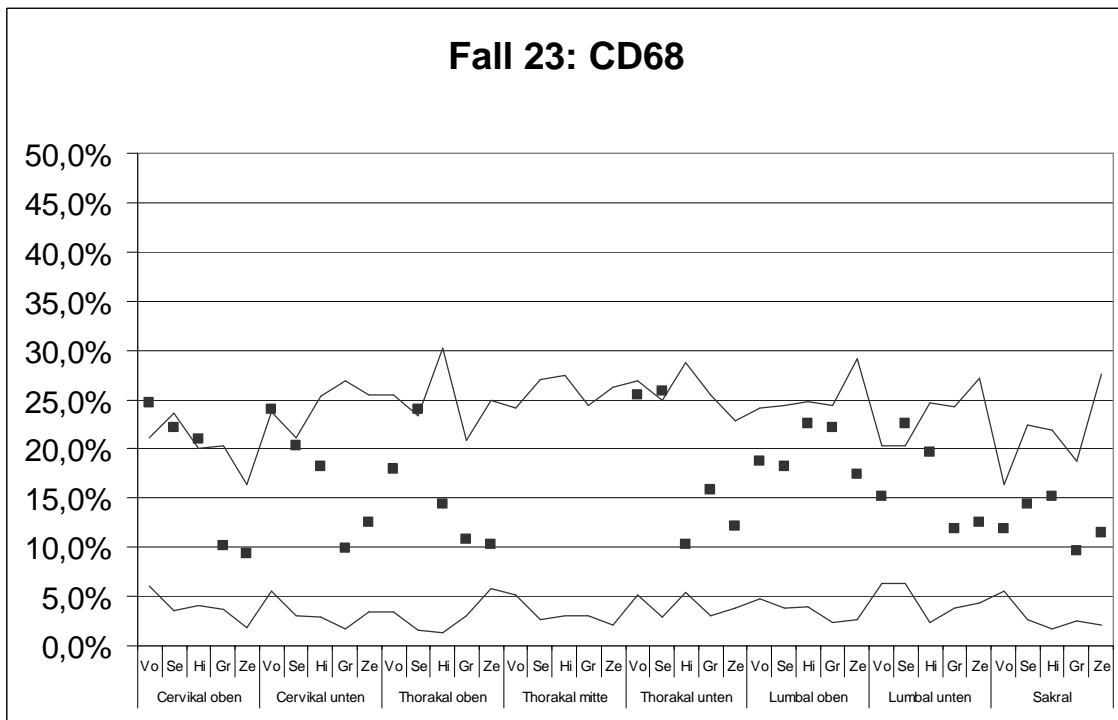


Diagramm 67

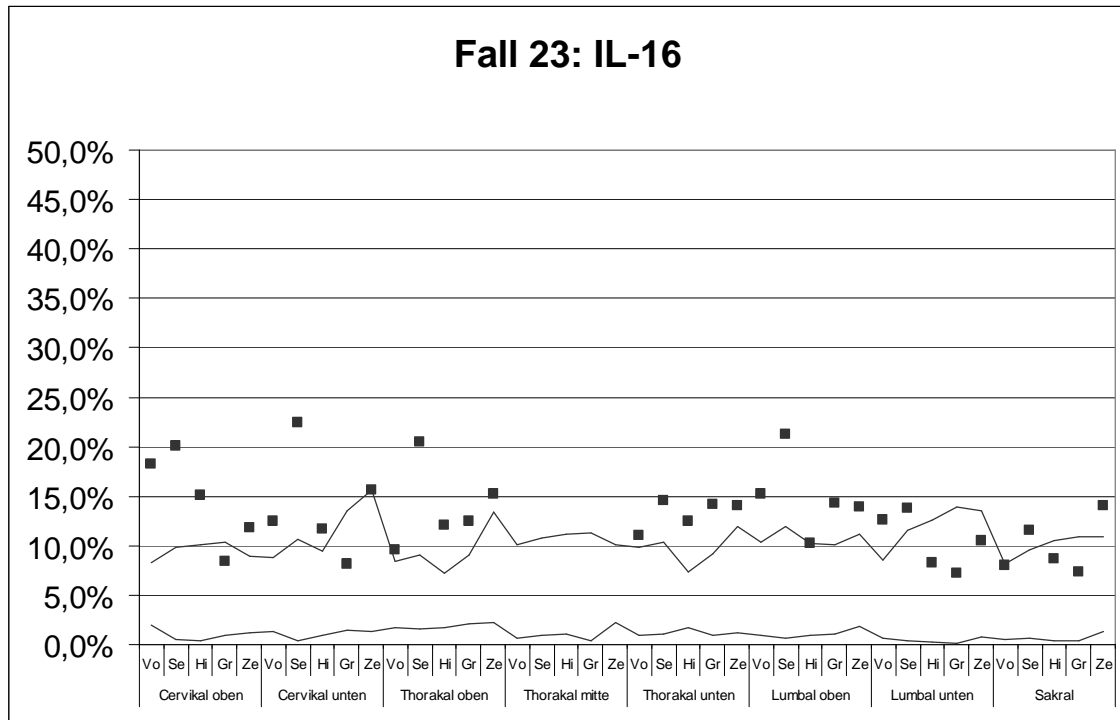


Diagramm 68

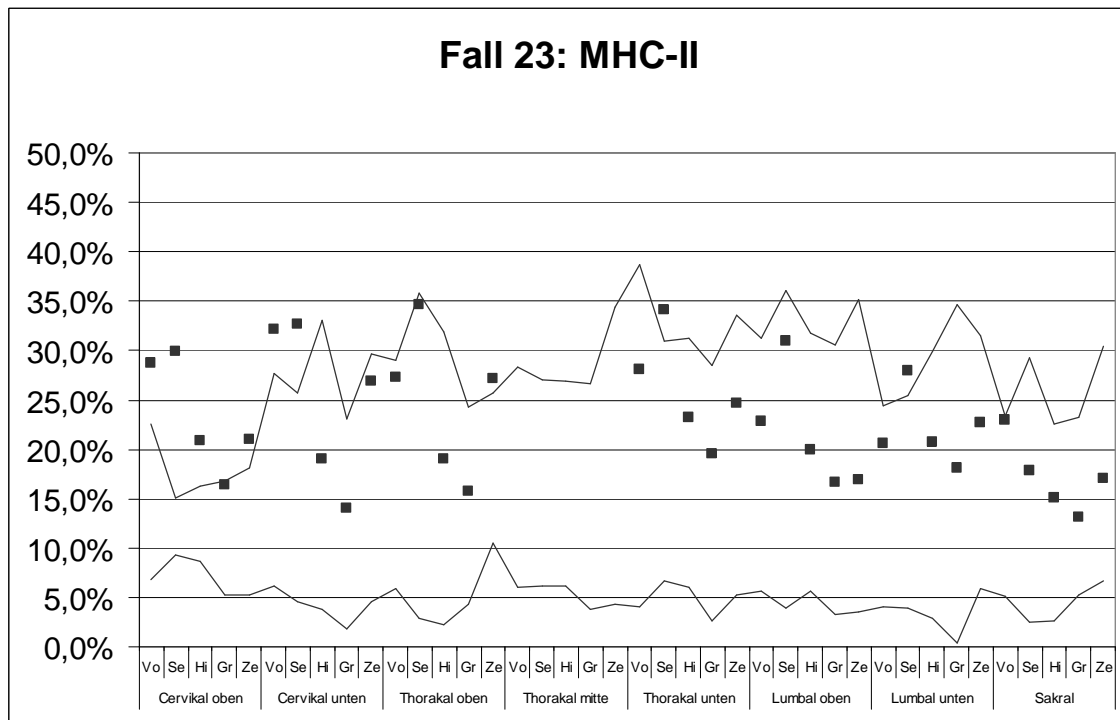


Diagramm 69

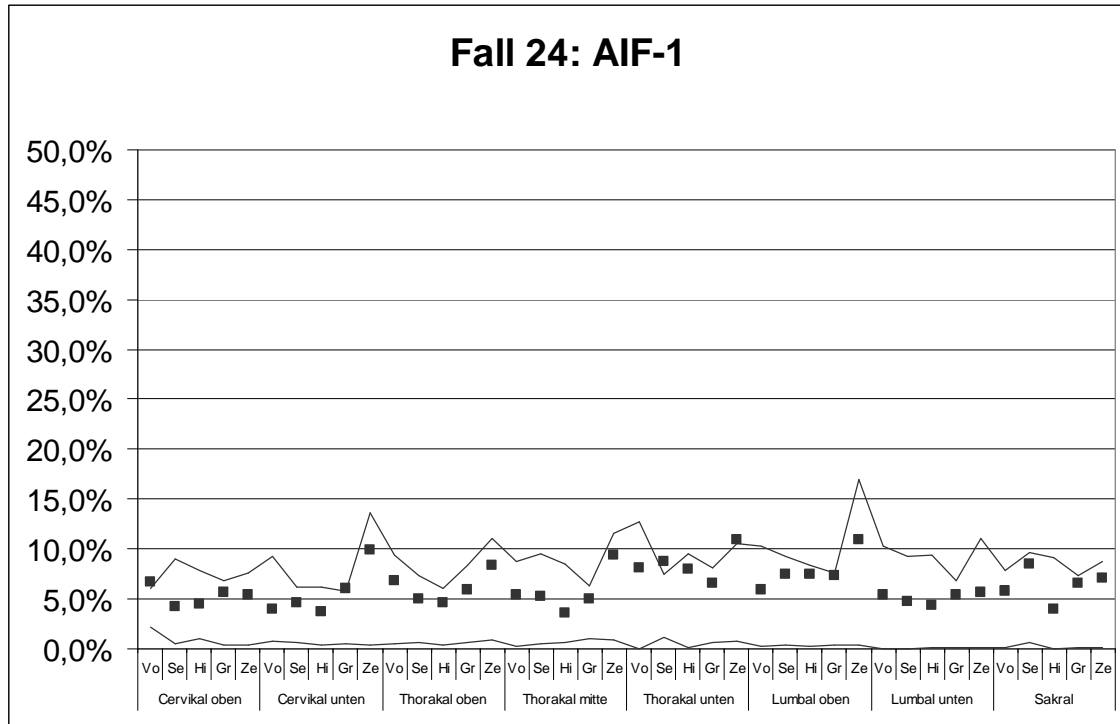


Diagramm 70

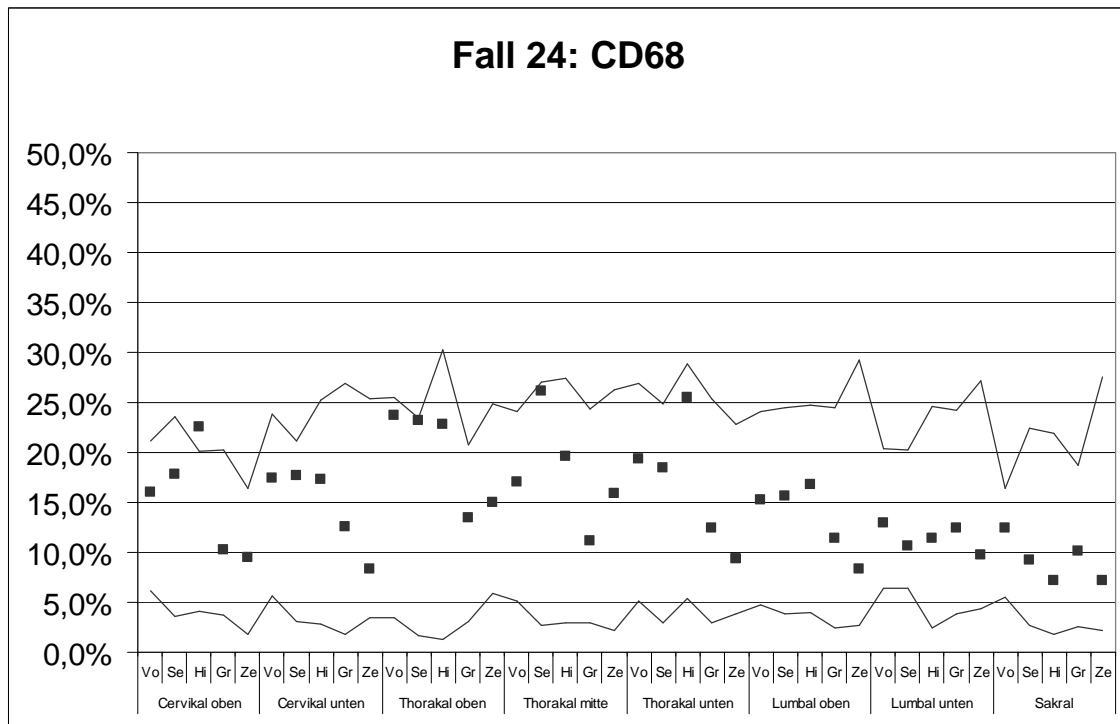


Diagramm 71

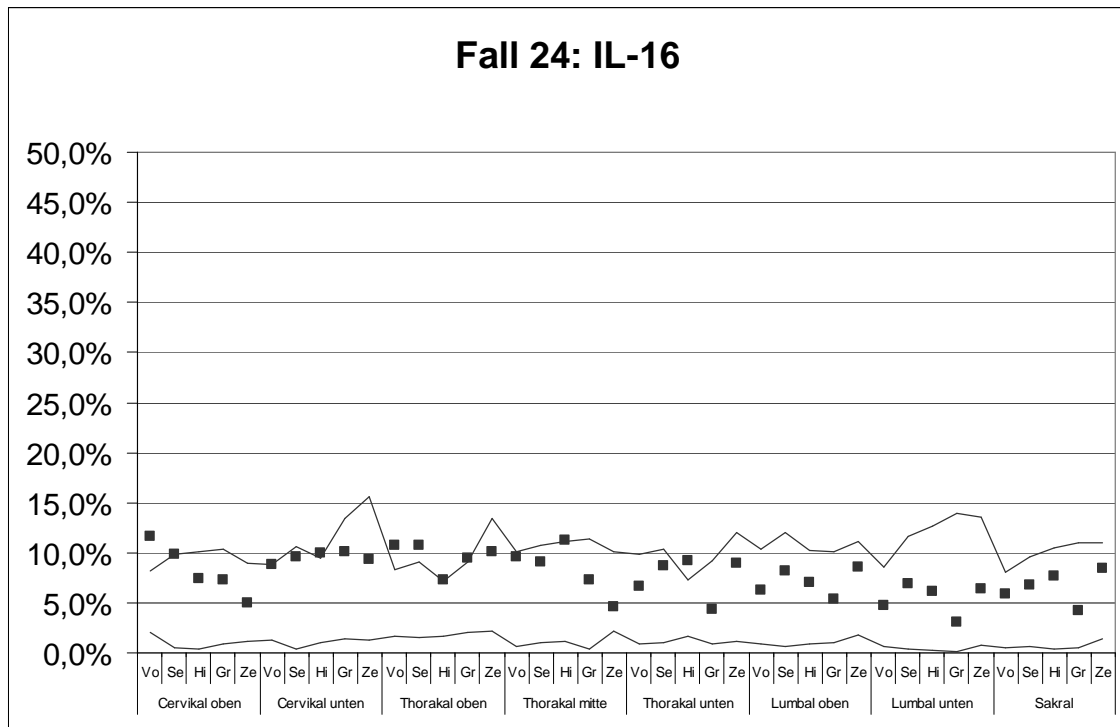


Diagramm 72

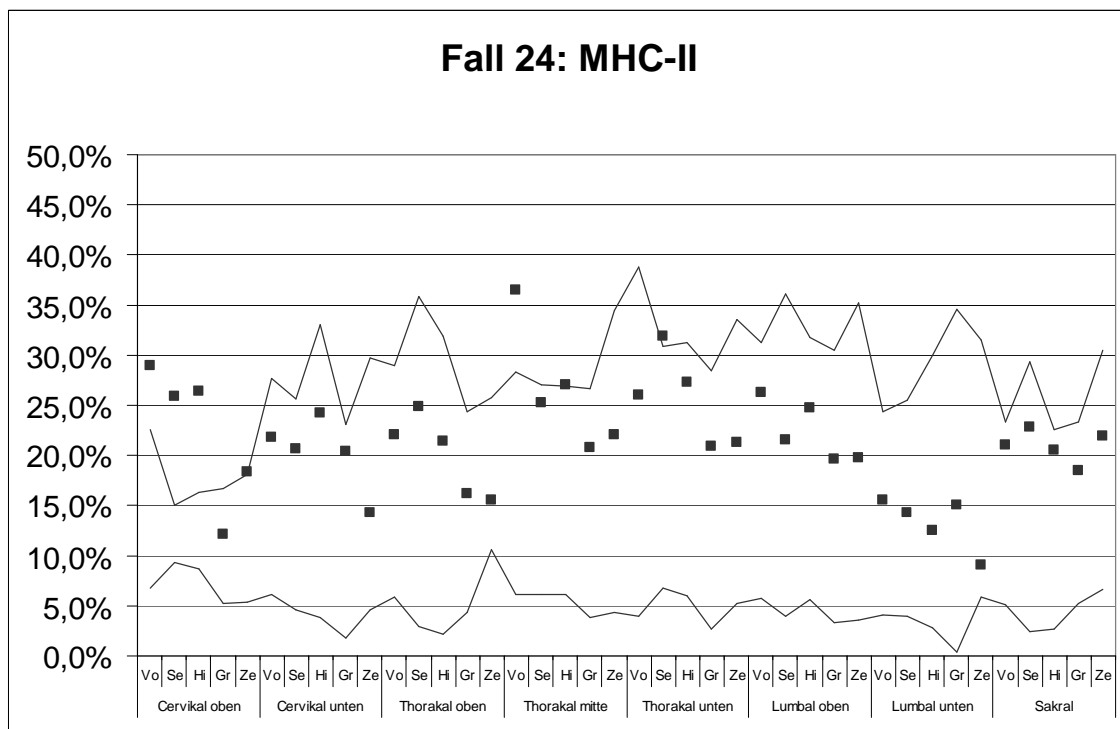


Diagramm 73

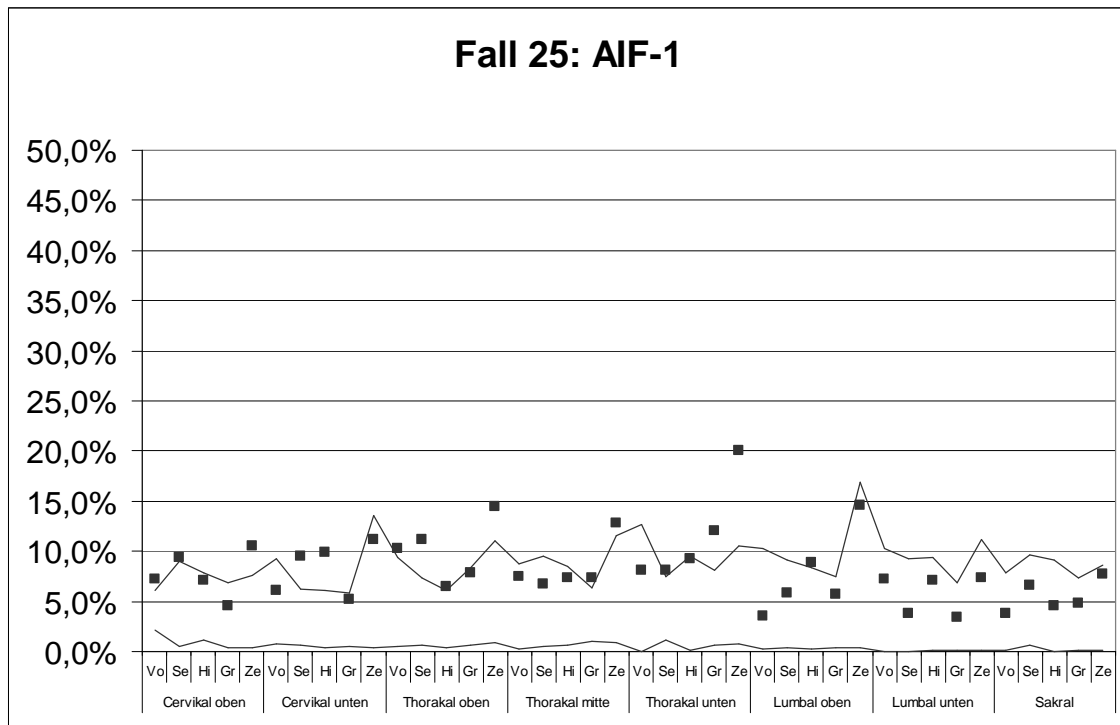


Diagramm 74

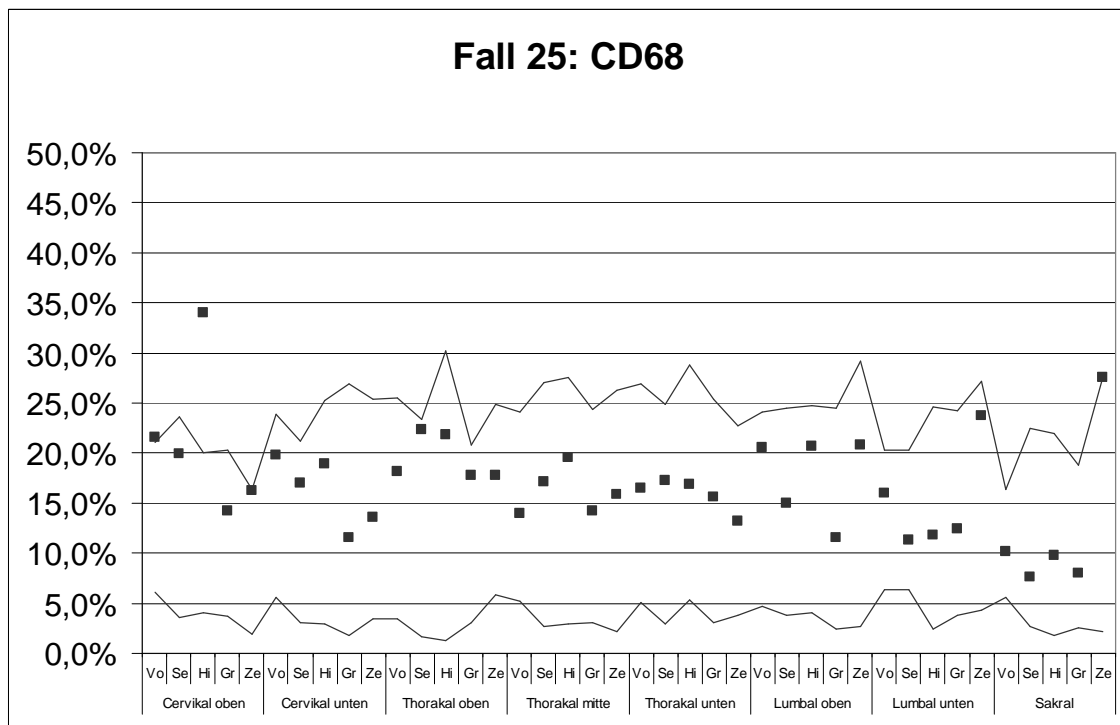


Diagramm 75

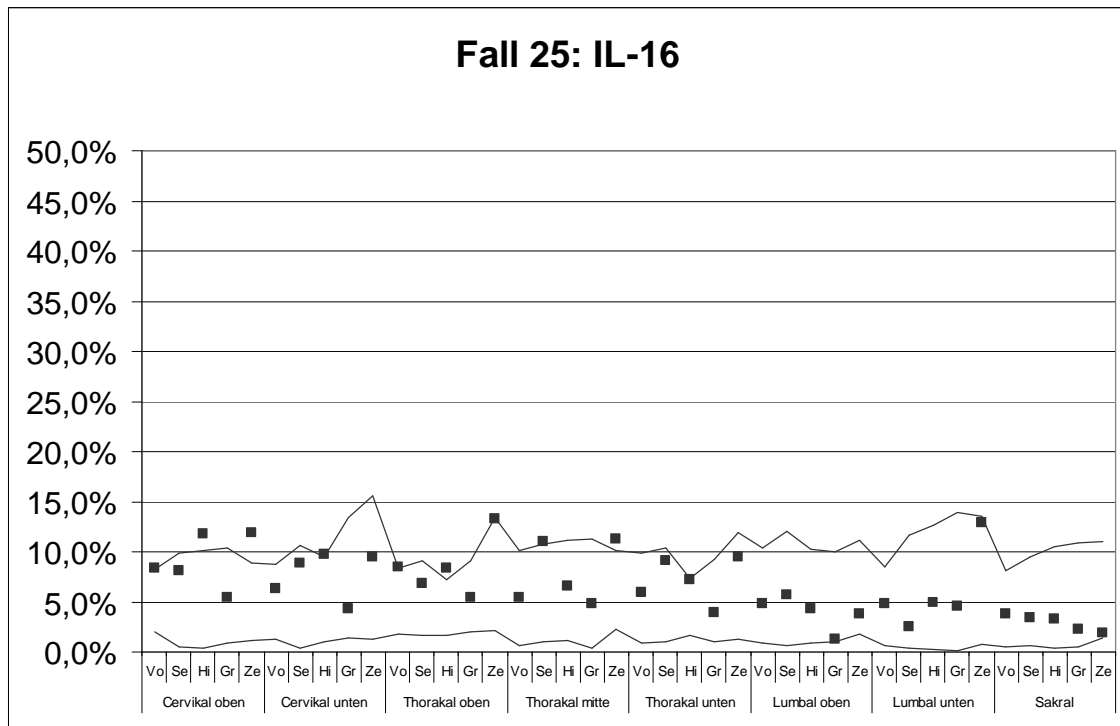


Diagramm 76

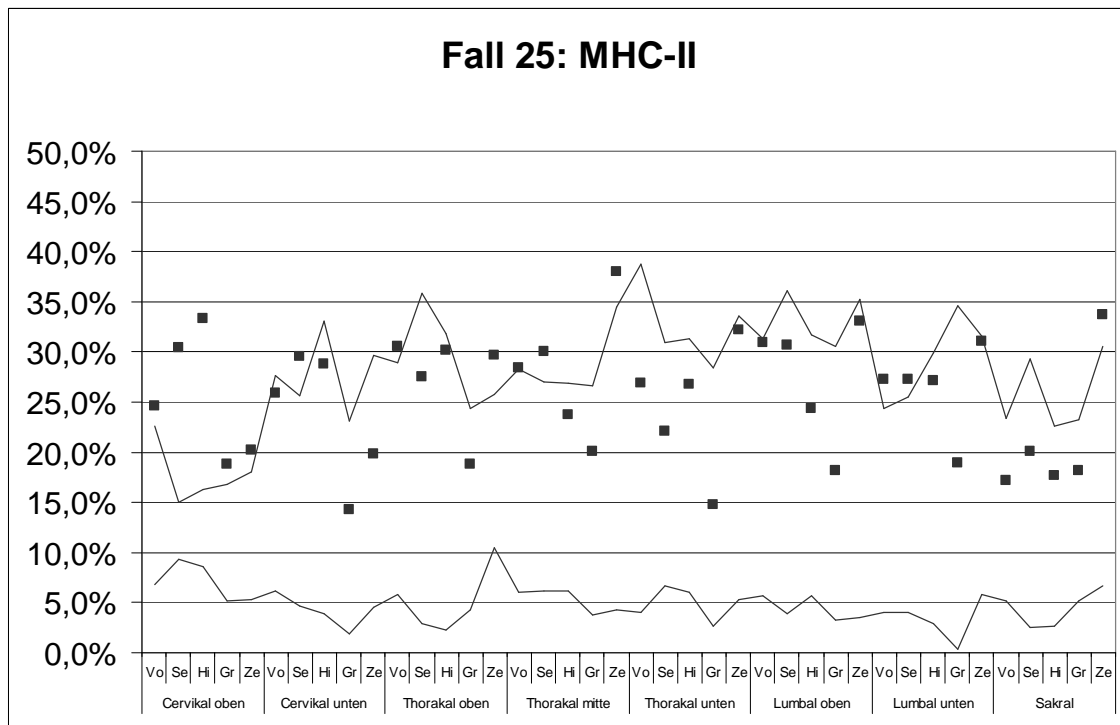


Diagramm 77



### 7.3 Publikationen

Teile dieser Inaugural-Dissertation wurden in nachfolgenden Arbeiten publiziert:

Stoll M, Schluesener HJ, Dietz K, Bekure K, Meyermann R, Mittelbronn M (2003) Microglial distribution and protein expression in normal and pathological human spinal cord. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy, Berlin, Germany, Poster.

Stoll M, Capper D, Dietz K, Schleich A, Schlaszus H, Meyermann R, Mittelbronn M (2006) Differential microglial regulation in the human spinal cord under normal and pathological conditions.  
Neuropathol Appl Neurobiol. 2006 Dec;32(6):650-61

## 7.4 Abkürzungen

5-D-4	ein gegen 5D4-Keratansulfat gerichteter Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance between groups
ABC	Avidin-Biotin Komplex
AIF-1	allograft inflammatory factor 1
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
β-APP	beta-amyloid-precursor-protein beta-Amyloid-Vorläuferprotein
bFGF	basic fibroblast growth factor basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	cluster of differentiation Leukozytendifferenzierungsantigen
CL-	Chlorid
COX	Cyclooxygenase
CR	Komplementrezeptor
DAB	Diaminobenzidin
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalitis
EMAP	endothelial monocyte-activating polypeptide
E-Selektin	auf Endothelzellen exprimiertes Adhäsionsmolekül
Fab	fragment antigen binding
GFAP	glial fibrillary acidic protein saures gliales Faserprotein
Gr	Graue Substanz
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
Hi	Hintersäule
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HTLV-1	humanes T-Zell-Leukämie-Virus-1
iba 1	ionized calcium binding adapter molecule-1

ICAM	intercellular cell adhesion molecules Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton
KI-67	Antikörperklassifikation der Universität Kiel, vgl. MIB-1
lamp	lysosomal-associated membrane glycoproteins
LCA	leukocyte common antigen allgemeines Leukozyten Antigen
LCF	lymphocyte chemoattractant factor
LDL	Low Density Lipoprotein
MHC	major histocompatibility complex Haupthistokompatibilitäts-Komplex
MIB-1	Mononukleärer Antikörper gegen KI-67, ein nukleäres Protein
mrf-1	microglial response factor-1
MRP	macrophage inhibitory factor related protein
Na <sup>+</sup>	Natrium
NF-H	Neurofilament heavy molecular weight (200 kDa) polypeptide
NF-L	Neurofilament low molecular weight (68 kDa) polypeptide
NF-M	Neurofilament medium molecular weight (160 kDa) polypeptide
NGF	Nerve growth factor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PG	Prostaglandin
pH	potentia hydrogenii
P-Selektin	auf Thrombozyten (platelets) exprimiertes Adhäsionsmolekül
RCA	Ricinus Communis Agglutinin
S100	Gruppe von Proteinen welche in 100% gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung löslich (soluble) bleiben

---

Se	Seitensäule
TBS	tris buffered saline
	TRIS-gepufferte Salzlösung
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tukey HSD	Tukey “Honestly Significantly Different”
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Vo	Vordersäule
Ze	Zentralkanal
ZNS	Zentralnervensystem

## 7.5 Danksagung

Bei Herrn Prof. Meyermann möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die engagierte wissenschaftliche Unterstützung, Anleitung und die anregenden Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Schluesener möchte ich ganz herzlich für so manche kritische Diskussion und für die freundliche Überlassung der Antikörper und Materialien danken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dietz aus dem Institut für Medizinische Biometrie für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Rudi Beschorner, Frau Prof. Dr. Antje Bornemann, Dr. Jan Schwab und Herrn Dr. Simon Perikles für die anregenden Diskussionen, freundliche Unterstützung und die geduldige Unterstützung und Anleitung bei meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung für die stete Hilfsbereitschaft, geduldige Einarbeitung und freundliche Unterstützung bei allen Fragen und Problemen bedanken.

Ganz besonderer Dank geht an Michel Mittelbronn. Ohne Deinen unermüdlichen Einsatz, Deine geduldige Einarbeitung und steten Ansporn wäre diese Arbeit wohl niemals zu Ende gebracht worden. Neben Deiner großartigen wissenschaftlichen Unterstützung möchte ich Dir aber besonders für die stetige Bereitschaft danken, auch bei privaten Sorgen immer mit Rat und Tat geholfen zu haben. Ich hoffe nur, ich kann die Zeit und die Nerven die ich Dich gekostet habe eines Tages ansatzweise wieder gut machen. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer für diese Arbeit wünschen können. Vielen Dank.

## 7.6 Lebenslauf

Manuel Dominik Stoll

- 08.12.1976 geboren in Tübingen
- 1983-1987 Grundschule in Albstadt
- 1987-1993 Realschule in Albstadt
- 1993-1996 Wirtschaftsgymnasium in Albstadt
- 1996 Allgemeine Hochschulreife
- 1996-1997 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz Kreisverband Zollernalb e.V.
- 1998-2006 Medizinstudium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 1998-2007 Promotion am Institut für Hirnforschung, Universität Tübingen  
Betreuer: Prof. Dr. R. Meyermann  
„Proteinexpression und Verteilung von Mikroglia im menschlichen Rückenmark“
- 2005-2006 Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg in Reutlingen
- a) Chirurgie  
Prof. Dr. T. Zimmermann
- b) Anästhesie  
Prof. Dr. F. K. Pühringer
- c) Innere Medizin  
Prof. Dr. B. Braun
- 10.05.2006 3. Staatsexamen
- 2006 Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum am Steinenberg in Reutlingen  
Chefarzt: Prof. Dr. F. K. Pühringer