Aus der Klinik für Kleintiere
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Molekularbiologische und funktionelle Studien zum Einfluss der Mikroglia auf die Pathogenese von Erkrankungen des Zentralen Nervensystems

Habilitationsschrift
zur Erlangung der *Venia legendi*
an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von
Dr. med. vet. Veronika M. Stein, PhD
Hannover 2010

Tag der nichtöffentlichen wissenschaftlichen Aussprache:

19.04.2011

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Publikationen 7

A Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund 9

B Konzeption und Fragestellung 13

C Ergebnisse 15

D Übergreifende Diskussion 25

E Zusammenfassung 35

F Summary 37

G Literaturverzeichnis 39

H Erklärung über den eigenen Anteil an den Publikationen 47

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CD	Cluster of differentiation
CDV	Canine distemper virus, Staupevirus
CNS	Central Nervous System
CT	Computed tomography
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
FACS	Fluorescence activated cell scanner
HIV	Human immunodeficiency virus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
mfi	Mean fluorescence intensity
MHC I/II	Major histocompatibility complex class I/II
MMP	Matrix metalloproteinases
MRI	Magnetic resonance imaging
MS	Multiple Sklerose
NPC	Niemann-Pick Disease Type C
PCR	Polymerase chain reaction
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs
SPF	Specific pathogen free
SRMA	Steroid responsive meningitis arteritis
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffmetaboliten
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

Liste der verwendeten Publikationen (chronologisch)

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Kreienbrock, L., Zurbriggen, A., Vandevelde, M., Tipold, A.: Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? *Vet Immunol Immunopathol, 113: 277-287, 2006*[#]

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Schröder, S., Zurbriggen, A., Vandevelde, M. Tipold, A.: Differential expression of CD45 on canine microglial cells. *J Vet Med Series A, 54: 314-320, 2007*[#]

Stein, V.M., Schreiner, N.M.S., Moore, P.F., Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Tipold, A.: Immunophenotypic characterization of monocytes in canine distemper virus infection. *Vet Microbiol 131: 237-246, 2008*[#]

Schwartz, M., Puff, C., Stein, V.M., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Marked MMP-2 transcriptional up-regulation in mononuclear leukocytes invading the subarachnoidal space in aseptic suppurative Steroid-responsive Meningitis-Arteritis in dogs. *Vet Immunol Immunopathol, 133 (2-4): 198-206, 2010*[§]

Ensinger, E.-M., Boekhoff, T.M., Carlson, R., Beineke, A., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.: Regional topographical differences of canine microglial immunophenotype and function in the healthy spinal cord. *J Neuroimmunol, 227(1-2): 144-152, 2010*[§]

Boekhoff, T.M., Ensinger, E.-M., Carlson, R., Bock, P., Baumgärtner, W., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.: Microglial contribution to secondary injury evaluated in a large animal model of human spinal cord trauma. *J Neurotrauma, 2011 May 20. [Epub ahead of print]*[§]

Stein, V.M., Puff, C., Genini, S., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Variations on brain microglial gene expression of MMPs, RECK, and TIMPs in inflammatory and non-inflammatory diseases in dogs. *Vet Immunol Immunpathol, 2011 Jun 24. [Epub ahead of print] a* [§]

Stein, V.M., Genini, S., Puff, C., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Enhanced TIMP-2 expression of microglia is associated with seizure activity. *submitted 2010a*[§]

Stein, V.M., Crooks, A., Ding, W., Prociuk, M., O'Donnell, P., Sikora, T., Bryan, C., Dingemanse, J., Morand, O., Walkley, S.U., Vanier, M.T., Vite, C.H.: Miglustat improves Purkinje cell survival and alters microglial phenotype in feline Niemann-Pick Disease Type C. *Manuskript in Ausarbeitung zur Einreichung bei J Neuropath Exp Neur 2010b**

[#] die Publikation ist Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekts (DFG TI 309/1-2)

[§] die Publikation ist Teil eines Projekts innerhalb einer von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Forschergruppe (DFG FOR 1103)

* die Publikation ist Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes für ein Auslandsstipendium (DFG STE 1069/2-1) an der University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Die Erklärung über den eigenen Anteil befindet sich auf den Seiten 47 bis 49.

A Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

Mikrogliazellen sind die Immuneffektorzellen des Zentralen Nervensystem (ZNS; (Giulian 1987, Streit 2002). Sie machen 5-20% der gesamten Gliazellpopulation des ZNS aus (Lawson et al. 1992), die Anzahl ist vergleichbar mit der von Neuronen (Streit 1996). Mikrogliazellen sind im gesamten ZNS und in der Retina verbreitet (Graeber und Streit 1990, Lawson et al. 1990, Dick et al. 1995), es bestehen jedoch regionale Unterschiede in ihrer Morphologie und Zelldichte (Perry et al. 1985, Lawson et al. 1990).

Mikroglia besitzt einen von ihrem Aktivierungsgrad abhängigen Phänotyp (Kreutzberg 1987, Davis et al. 1994, Streit 1995). Diese morphologische Wandlung, die an die Funktion angepasst ist, wird als „funktionelle Plastizität“ umschrieben (Lawson et al. 1992). Es können drei grundsätzliche Differenzierungsstadien unterschieden werden: unter physiologischen Bedingungen hat die Mikroglia eine ramifizierte Morphologie, infolge pathologischer Stimuli retrahiert sie ihre Fortsätze und wird zur aktivierten oder reaktiven nicht-phagozytierenden Mikroglia, welche sich bei Fortbestehen der Pathologie zur voll funktionsfähigen phagozytierenden Mikroglia mit amöboidem Phänotyp weiterentwickelt (Davis et al. 1994, Streit 1995, Ladeby et al. 2005).

Die unter physiologischen Bedingungen vorkommende ramifizierte Mikroglia wird auch als ruhende Mikroglia bezeichnet (Graeber und Streit 1990, Streit 1995). Diese Bezeichnung wird in der neueren Literatur deutlich in Frage gestellt, da Studien mit Fluoreszenzmikroskopie gezeigt haben, dass die sogenannte „ruhende Mikroglia“ keineswegs ruht, sondern ein hohes Migrationspotential besitzt und sehr aktiv in der Überwachung des ZNS und Aufrechterhaltung der Homöostase ist (Nimmerjahn et al. 2005, Raivich 2005).

Jegliche Art von pathologischem Stimulus führt zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen, die sich in einer geänderten Morphologie, Funktion und einem dementsprechend veränderten Immunphänotyp widerspiegelt (Gehrmann und Kreutzberg 1995). Oberflächenantigene (CDs = cluster of differentiation) können aufreguliert oder *de novo* exprimiert werden (Graeber et al. 1988, Kreutzberg 1996). Zudem können aktivierte Mikrogliazellen eine Vielzahl von

Mediatoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid (Chao et al. 1992), Zytokine (Hanisch 2002), reaktive Sauerstoffradikale (ROS; Banati et al. 1993, Ruuls et al. 1995), Matrix Metalloproteinasen (MMPs; Gottschall und Deb 1996; Miao et al. 2003) und verschiedene Enzyme, wie saure Phosphatase (Ulvestad et al. 1994) und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (Ding et al. 1997) synthetisieren, die sie als „first line of defense guardians“ auszeichnen, potentiell jedoch auch schädlich für das ZNS sind (Giulian 1987, Banati et al. 1993, Streit 2002,).

Angezogen durch endogene und exogene chemotaktische Faktoren entwickelt die Mikroglia im dritten Aktivierungsstadium ihre Fähigkeit zur Migration zum Ort der Zellalteration oder Infektion und zur Phagozytose von Debris oder apoptotischen Zellen (Streit et al. 1988, Kreutzberg 1996). Die Fähigkeit zur Phagozytose ist ein wichtiger Mechanismus bei der Pathogenese vieler neuropathologischer Erkrankungen. Die differenzierte Aktivierung der Mikroglia in Abhängigkeit vom Schweregrad der Läsion wird als „graded response“ bezeichnet (Kreutzberg 1996, Raivich et al. 1999).

Lange Zeit wurde vermutet, dass Mikrogliazellen einem uniformen und unspezifischen Reaktionsmuster der Aktivierung folgen, welcher unabhängig von der zugrunde liegenden Pathologie ist (Stoll und Jander 1999). Heute hat sich diese Sichtweise geändert und es wird vermutet, dass Mikroglia der am meisten unterschätzte Zelltyp des Immunsystems ist (Streit 2002, Tambuyzer et al. 2009).

Auch die ontogenetische Herkunft der Mikroglia war und ist Gegenstand kontroverser Diskussion (Ling und Wong 1993, Chan et al. 2007). Eine vorherrschende Meinung ist, dass Mikroglia von neuroektodermalen Matrixzellen abstammen, die sich lokal im ZNS zu Mikrogliazellen ausdifferenzieren (Skoff 1975, Kitamura et al. 1984, Fedoroff et al. 1997). Heutzutage vertreten die meisten Forscher die Hypothese, dass Mikrogliazellen von myeloischen-monozytären Zellen und/oder deren hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen (Ling und Wong 1993, Lassmann et al. 1993, Chan et al. 2007). Für diese Hypothese spricht auch das Vorhandensein gemeinsamer funktioneller Eigenschaften und die große Übereinstimmung in der Expression von Oberflächenantigenen (Perry und Gordon 1991, Flaris et al. 1993, Fedoroff 1995, Stoll und Jander 1999). Jedoch gibt es immunphänotypische Unterschiede in der Expression oder Expressionsintensität zwischen

Mikroglia und Monozyten/Makrophagen, die eine Unterscheidung bedingt ermöglichen (Flaris et al. 1993, Ulvestad et al. 1994, Dick et al. 1997, Stein et al. 2004a). Mikroglia weist einen charakteristischen Immunphänotyp von $CD45^{low}$ und $CD11b/c^{+}$ auf, der klassischerweise zu ihrer Identifikation genutzt wird, während Monozyten/Makrophagen einen Immunphänotyp von $CD45^{high}$ und $CD11b/c^{+}$ zeigen (Sedgwick et al. 1991, Ford et al. 1995). Bei Erkrankungen des ZNS werden Monozyten/Makrophagen rekrutiert, die den Blutkreislauf verlassen, das ZNS infiltrieren und dann einen Phänotyp annehmen, der sie von Mikroglia schwer differenzierbar macht (Dijkstra et al. 1985, Flaris et al. 1993, Ford et al. 1995). Da die aktivierte Mikroglia zudem eine Aufregulation oder *de novo*-Expression von im ramifizierten Zustand nicht exprimierter Oberflächenantigenen aufweist, ist es fraglich, ob diese beiden Zelltypen immunphänotypisch voneinander zu unterscheiden sind (Sedgwick et al. 1991, Ford et al. 1995). Die infiltrierenden Monozyten/Makrophagen können sich zu dem Pool der ursprünglichen Mikroglia hinzu addieren (Perry und Gordon 1991, Flaris et al. 1993). Es wird diskutiert, ob ein Unterschied in der Beeinflussung der Pathogenese von Erkrankungen durch ursprüngliche Mikroglia versus Phagozyten im ZNS, die aus infiltrierenden Monozyten/Makrophagen entstanden sind, besteht (Dijkstra et al. 1992, Bauer et al. 1995, Popovich et al. 1999, Popovich 2002, Rabchevsky 2002, Rivest 2009). Ein Ansatz, um einen Unterschied im Funktionsprofil dieser Zellpopulation zu evaluieren, stellt die Isolation und Charakterisierung der Monozyten/Makrophagen-Population aus dem Blut und dem Liquor cerebrospinalis dar. Mithilfe dieser Untersuchungen können Rückschlüsse auf deren Einfluss auf die Pathogenese von neuropathologischen Erkrankungen gezogen werden.

Bei Erkrankungen des ZNS hat die Aktivierung der Mikroglia eine Wiederherstellung der Homöostase zum Ziel (Streit 2002). Daher ist die aktivierte Mikroglia und die Entfaltung ihrer vielförmigen Funktionen als neurotroph und förderlich für die Regeneration zu sehen (Streit 2002). Dennoch ist die Aktivierung der Mikroglia auch als kritisch zu beurteilen, da sie bei anhaltender Aktivierung und/oder überschießender Reaktion neurotoxisch wirken kann, was als „bystander damage“ bezeichnet wird (Giulian et al. 1990, Banati et al. 1993, Lull und Bock 2010). Das ZNS ist eine besondere Mikroumgebung mit sehr limitierter Fähigkeit zur Regeneration und hat gleichzeitig eine sehr hohe Verletzlichkeit (Streit 2002, Griot et al. 1990). Da Mikrogliazellen bei jeglicher Art von Störung der Homöostase im ZNS aktiviert

werden und danach ihr immunologisches Potenzial offenbaren, wird eine Beeinflussung der Pathogenese vieler Neuropathologien, wie Alzheimer (McGeer et al. 1993, Giulian 1999) und Parkinson Krankheit (Zhang et al. 2005, Kim und Joh 2006), Multiple Sklerose (Carson 2002, Raivich und Banati 2004), Creutzfeld Jakob (Veerhuis et al. 2002, Ciesielski-Treska et al. 2004), Gehirntumore (Graeber et al. 2002), HIV-assoziierte Neuropathologie (Gartner und Liu 2002), Schlaganfall (Schäfer et al. 2002, Jin et al. 2010) und Trauma (Popovich 2002) vermutet.

Da die Mikroglia sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften haben kann, ist eine exakt ausbalancierte Funktion essentiell (Streit 2002, Tambuyzer et al. 2009). Die originäre Funktion der Mikroglia ist der Schutz der Glia und Neurone des ZNS, daher ist es wichtig herauszufinden, welche Signale vermitteln, dass die Mikrogliaaktivierung überschießt und eine negative Auswirkung auf ihre Umgebung hat (Streit 2002). Über die neugewonnenen Erkenntnisse der pathogenetischen Zusammenhänge und die Definition des Einflusses der Mikroglia könnte man einen wertvollen Schlüssel zum Verständnis neuropathologischer Erkrankungen gewinnen. Mit Hilfe dieses Wissens könnte es möglich werden, neue und/oder effizientere Therapiestrategien für neurodegenerative und neuroinflammatorische Erkrankungen zu entwickeln. Dies hat eine große Bedeutung in der Veterinärmedizin mit dem Tier als Patienten. Darüber hinaus haben Hund und Katze einen wichtigen Modellcharakter für die Translation der gewonnen Ergebnisse auf den Menschen, da weitgehende physiologische und pathophysiologische Homologien zwischen diesen Spezies bestehen. Zudem können bei Hund und Katze im Gegensatz zu Nagermodelllen natürlich vorkommende, spontane Erkrankungen untersuchen werden und die beiden Spezies teilen häufig die gleichen Umweltbedingungen mit uns Menschen.

B Konzeption und Fragestellung

Aktivierte Mikrogliazellen zeigen ein Vielzahl von Reaktionen: eine aufregulierte oder *de novo* Expression von Oberflächenantigenen, wie MHC I und II oder Komplementrezeptoren, die Expression und Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Matrix Metalloproteinasen, sowie Phagozytose und die Generation reaktiver Sauerstoffmetaboliten. Genauso mannigfaltig wie ihre Reaktionen können auch die Trigger sein, die zu ihrer Aktivierung führen. Sowohl die Ursachen als auch die Folgen der Aktivierung der Mikroglia haben wichtige Implikationen für die Pathogenese neuropathologischer Erkrankungen. Die Schlüsselfrage der vorliegenden Studien, welchen Einfluss die Mikroglia auf die Pathogenese neuropathologischer Erkrankungen im ZNS hat, sollte mithilfe molekularbiologischer und funktioneller Tests bearbeitet werden.
Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Wie unterscheidet sich das Reaktionsprofil der Mikroglia bei Pathologien des ZNS unterschiedlicher Genese im Hinblick auf Immunphänotyp, Genexpression und Funktion?

2. Welchen Einfluss hat die Mikroglia auf die Pathogenese einer neuropathologischen Erkrankung? Welche Rückschlüsse erlaubt die molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung?

3. Gibt es physiologische Unterschiede im Reaktionsprofil der Mikroglia in Abhängigkeit von der Topographie innerhalb des ZNS und welche biologische Bedeutung hat ein regional diverses Reaktionsprofil?

4. Gibt es pathophysiologische Unterschiede im Reaktionsprofil der Mikroglia in Abhängigkeit von der Topographie innerhalb des ZNS?

5. Welche Therapiestrategien eröffnen sich durch die Erkenntnisse über den Einfluss der Mikroglia an der Pathogenese neuropathologischer Erkrankungen?

Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden Mikrogliazellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und die Daten durchflusszytometrisch erhoben (Stein et al.

2004a). Die Charakterisierung der Mikroglia im Rahmen verschiedener neuropathologischer Paradigmen erfolgte vorwiegend *ex vivo*, weil davon ausgegangen wird, dass die gewonnenen Daten die Funktionen dieser Zellpopulation *in vivo* genauer widerspiegeln und somit Rückschlüsse auf den mikroglialen Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankungen zulassen und Zellkulturartefakte vermieden werden. Ein gewisser Grad der Triggerung der Mikroglia wird dabei durch einzelne Schritte des Isolationsprozesses hervorgerufen. Da die Mikrogliazellen jedoch unter konstanten Bedingungen isoliert werden, ist davon auszugehen, dass immunphänotypische und funktionelle Unterschiede aufgrund einer „Voraktivierung“ durch den Stimulus der zugrunde liegenden Erkrankung *in vivo* begründet sind. Bei den PCR-Studien wurde mit *ex vivo* isolierten Mikrogliazellen gearbeitet, die sofort nach der Isolation eingefroren wurden, so dass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene aufgrund eines unterschiedlichen Reaktionsprofils der Mikroglia mit Voraktivierung *in vivo* ausgegangen werden kann und diese nicht artifiziell durch die Protokolle hervorgerufen wurden.

Im Folgenden sollen die Resultate der einzelnen Studien und ihr Beitrag zur Bearbeitung der Fragestellungen dargestellt werden.

C Ergebnisse

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Kreienbrock, L., Zurbriggen, A., Vandevelde, M., Tipold, A.: Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? ***Vet Immunol Immunopathol, 113: 277-287, 2006***

Zentrale Fragestellung dieser Studie war, ob die Mikroglia einem uniformen und unspezifischen Reaktionsmuster folgt, welches unabhängig von der zugrunde liegenden Pathologie ist oder ob sie Unterschiede in Immunphänotyp und Funktion aufweist, die auf eine spezifische Antwort der Mikroglia schließen lässt. Insgesamt wurde Mikroglia von 47 Hunden *ex vivo* mittels Durchflusszytometrie untersucht (Stein et al. 2004a), die aufgrund der histopathologischen Befunde im ZNS in drei Gruppen klassifiziert wurden. Eine Gruppe umfasste Hunde ohne abweichende histopathologische Befunde im ZNS, eine weitere Gruppe enthielt Hunde mit natürlicher Staupevirusinfektion (CDV) oder im Rahmen einer Impfstoffstudie mit CDV infizierte Hunde (Stein et al. 2004b), während die dritte Gruppe weiter in Hunde mit intrakraniellen Tumoren, intrakraniellen Entzündungen, idiopathischer Epilepsie und anderen Erkrankungen im ZNS (Trauma, Degeneration, Malformation) differenziert wurde. Für den Immunphänotyp wurde eine Aufregulation von CD11b bei Hunden mit intrakraniellen Tumoren und von MHC I und MHC II bei Hunden mit CDV-Infektion gefunden, wenn ein Vergleich mit Hunden ohne abweichende Befunde im ZNS durchgeführt wurde. Bei dem Vergleich der verschiedenen Kategorien von intrakraniellen Erkrankungen untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Funktionell zeigte sich eine signifikant gesteigerte Phagozytose bei Hunden mit CDV-Infektion und bei Hunden mit intrakraniellen Entzündungen, jedoch auch hier lediglich im Vergleich mit Hunden ohne abweichende Befunde im ZNS. Für die Generation von ROS wurde bei Hunden mit CDV-Infektion eine signifikante Aufregulation im Vergleich mit allen anderen Erkrankungskategorien gefunden. Das Ergebnis einer relativ stereotypen Aufregulation im Immunphänotyp und einer spezifischen mikroglialen Generation von ROS bei CDV-Infektion unterstreicht die Resultate einer vorangegangenen Studie (Stein et al. 2004b). Der mikroglialen Generation von ROS wird daher eine besondere Rolle bei der Pathogenese der Demyelinisierung in der akuten Phase der Hundestaupe zugesprochen.

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Schröder, S., Zurbriggen, A., Vandevelde, M. Tipold, A.: Differential expression of CD45 on canine microglial cells. *J Vet Med Series A, 54: 314-320, 2007*

Diese Arbeit spiegelt gleichzeitig das interessante Resultat einer differentiellen Expression von CD45 auf Mikroglia in Abhängigkeit einer zugrunde liegenden neuropathologischen Erkrankung im ZNS und die Aufarbeitung einer ursprünglichen methodischen Schwierigkeit, canine Mikrogliazellen nach ihrer Isolation durchflusszytometrisch zu identifizieren, wider. Die Literatur beschreibt einen charakteristischen Immunphänotyp der Mikroglia von CD11b/c^{+} und CD45^{low}, der sie damit von Monozyten und anderen ZNS-Makrophagen mit einem Immunphänotyp von CD11b/c^{+} und CD45^{high}, differenziert (Sedgwick et al. 1991, Ford et al. 1995). Die canine Mikroglia wies jedoch eine Abweichung von dem beschriebenen Immunphänotyp auf, da sie nur eine sehr geringe oder keine nachweisbare Expression von CD45 aufwies. Daher wurden für die canine Mikroglia andere Kriterien zur Identifikation, wie Größe, Komplexität, Expression von CD18^{+}, CD11b/c^{+}, definiert (Stein et al. 2004a). In der oben genannten Arbeit wiesen Hunde ohne histopathologisch abweichende Befunde im ZNS (n = 22) nur eine sehr geringe Expression ($\bar{x}$ = 6,6%) und Expressionsintensität ($\bar{x}$ = 19,1) von CD45 auf. Die Gruppe der Hunde mit ZNS-Erkrankungen (n = 20) zeigte deutliche Unterschiede in Bezug auf die Expression von CD45: 13 Hunde wiesen, wie die ZNS-gesunden Hunde, eine geringe Expression ($\bar{x}$ = 7,5%) und Expressionsintensität ($\bar{x}$ = 21,1) von CD45 auf, während 7 Hunde eine deutlich aufregulierte Expression ($\bar{x}$ = 65,7%) zeigten. In Bezug auf die Expressionsintensität ließen sich durchflusszytometrisch zwei Subpopulationen von CD45^{+} voneinander unterscheiden: eine größere Subpopulation von Mikrogliazellen ($\bar{x}$ = 67,0%) mit CD45^{low} ($\bar{x}$ = 18,7) und eine kleinere Subpopulation ($\bar{x}$ = 10,0%) mit CD45^{high}, die also eine hohe Expressionsintensität ($\bar{x}$ = 131,7) aufwies, die vergleichbar mit der von Monozyten/ Makrophagen war (Stein et al. 2004a). Eine vergleichende Analyse ergab, dass kein Zusammenhang zwischen der aufregulierten Expression von CD45 mit dem Alter, der Art der ZNS-Erkrankung, der medikamentellen Vorbehandlung und der Expression anderer Oberflächenantigene bestand. Allerdings schien eine Korrelation zwischen langanhaltender chronischer ZNS-Erkrankung und dem Auftreten von Krampfanfällen mit einer aufregulierten Expression von CD45 auf Mikroglia zu bestehen.

Stein, V.M., Schreiner, N.M.S., Moore, P.F., Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Tipold, A.: Immunophenotypic characterization of monocytes in canine distemper virus infection. ***Vet Microbiol 131: 237-246, 2008***

Die Untersuchung der Monozyten/Makrophagen bei CDV-Infektion komplettiert das Verständnis über den Beitrag der Mikroglia an der Pathogenese der Demyelinisierung (Stein et al. 2004b), bzw. erlaubt eine differenzierte Sicht auf die Mikrogliapopulation, da sich Monozyten/Makrophagen nach Rekrutierung in das ZNS zum Mikroglia-Pool hinzuaddieren können. Monozyten von zwanzig 5-6 Monate alten, im Rahmen einer Impfstoffstudie experimentell-CDV-infizierten SPF-Beaglen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und ihr Immunphänotyp 1-2mal wöchentlich im Laufe der CDV-Infektion durchflusszytometrisch charakterisiert. Zusätzlich wurde über den Nachweis eines Nukleokapsid-Proteins eine CDV-Infektion der Monozyten gezeigt. Die Hunde wurden in drei Gruppen klassifiziert: Gruppe I umfasste Hunde ohne klinische Symptome und ohne histopathologisch abweichende Befunde im ZNS (n = 7), Hunde der Gruppe II zeigten milde klinische Symptome, eine geringgradig erhöhte Körpertemperatur und keine histopathologisch abweichenden Befunde im ZNS (n = 6) und in der Gruppe III befanden sich Hunde mit schwerwiegenden klinischen Symptomen, wie einer deutlich erhöhten Körper-temperatur und neurologischen Ausfallserscheinungen und zudem aktiven Läsionen mit Demyelinisierung im ZNS (n = 7). Während in den Monozyten der Hunde der Gruppen I und II CDV nur zeitnah zur experimentellen Infektion und nur zu einem geringen Prozentsatz (0-5,5%) nachgewiesen wurde, war dies bei Monozyten der Hunde der Gruppe III über den gesamten Zeitraum und zu einem höheren Prozentsatz (0-33%) möglich. Dabei entwickelten die Hunde mit dem höchsten Prozentsatz positiver Monozyten die deutlichsten histopathologischen Befunde im ZNS. Das Differentialblutbild zeigte keine Veränderungen in der Gesamtzahl der Monozyten im Verlauf der CDV-Infektion und auch die Expression von CD18, CD45, CD44 und CD14 blieb unverändert. Der Immunphänotyp der Monozyten zeigte jedoch eine deutliche Aufregulation von CD1c, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), MHC I und CD11b mit einem Peak in der 4.-5. Woche post infectionem. Mit wenigen Ausnahmen stimmten die aufregulierten Oberflächenantigene mit den auf der Mikroglia aufregulierten überein (Stein et al. 2004b). Die Resultate veranschaulichen die Monozyten-Aktivierung im Rahmen der CDV Infektion und gleichzeitig die große Übereinstimmung im Reaktionsprofil von Monozyten im Blut und Mikroglia im ZNS.

Schwartz, M., Puff, C., Stein, V.M., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Marked MMP-2 transcriptional up-regulation in mononuclear leukocytes invading the subarachnoidal space in aseptic suppurative Steroid-responsive Meningitis-Arteritis in dogs. ***Vet Immunol Immunopathol, 133 (2-4): 198-206, 2010***

Die Studie zur Untersuchung der MMP- und TIMP-Expression von Leukozyten im Liquor cerebrospinalis und peripheren Blut bei steroid-responsiver Meningitis-Arteritis (SRMA) bearbeitete zum einen die Fragestellung zur Rolle der mononukleären Leukozyten bei der Pathogenese der SRMA, zum anderen stellte sie die Vorarbeit zur methodischen Erweiterung der Mikroglia-Charakterisierung auf die Genexpression mithilfe der PCR dar (Stein et al. 2011, Stein et al. 2010a). Leukozyten aus Liquor cerebrospinalis und peripherem Blut von Hunden in der akuten Phase der SRMA (n = 16) wurde auf die Expression von MMP-2 und MMP-9 und die Inhibitoren TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) und TIMP-2 untersucht und mit der von Hunden mit SRMA ohne klinische Symptome unter Glukokortikosteroid-Therapie (n = 16) und anderen inflammatorischen (n = 9) und neoplastischen (n = 10) Erkrankungen des ZNS verglichen. Als Ergebnis konnten in der akuten Phase der SRMA mit klinischen Symptomen eine Expression von MMP-2 und MMP-9, sowie TIMP-1 und TIMP-2 in den Leukozyten im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden. Diese Expression war im Vergleich zu den Leukozyten der Hunde mit SRMA unter Glukokortikosteroid-Therapie und denen mit Entzündung oder Neoplasie im ZNS deutlich erhöht. Zudem war die MMP-2-Expression in den Leukozyten im Liquor cerebrospinalis im Vergleich zu den Leukozyten im peripheren Blut signifikant aufreguliert.

In Anlehnung an das hier verwendeten Protokoll wurde anschließend das asservierte Mikrogliapellet von Hunden mit unterschiedlichen ZNS-Erkrankungen, sowie einer Kontroll-gruppe mit extrakraniellen Erkrankungen, aufgearbeitet und auf die Expression der oben genannten und weiterer MMPs und RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) untersucht.

Ensinger, E.-M., Boekhoff, T.M., Carlson, R., Beineke, A., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.: Regional topographical differences of canine microglial immunophenotype and function in the healthy spinal cord. ***J Neuroimmunol, 227(1-2): 144-152, 2010***

Bei dieser Studie wurde die Fragestellung nach physiologischen topographischen Unterschieden in Immunphänotyp und Funktion der Mikroglia bearbeitet. Da es sich bei den untersuchten Tieren um gesunde Hunde handelte, wurde davon ausgegangen, dass ramifizierte bzw. ruhende Mikroglia untersucht wurde. Die Studie stellt zudem eine Ausweitung des Isolationsprotokolls auf weitere Bereiche des ZNS dar, so wurde erstmalig Mikroglia aus dem Rückenmark isoliert. Dazu musste zunächst das Protokoll der Mikroglia-isolation für das Rückenmark adaptiert werden. Um die regionsspezifischen Effekte zu evaluieren, wurde Parenchym aus drei verschiedenen Lokalisationen innerhalb des ZNS (zerebellopontiner Winkel des Gehirns, zervikales und thorakolumbales Rückenmark) von 30 gesunden 3-4 Monate alten SPF-Beaglen (Versuchsnummern 08A550, 08A556, 08A568, 08A580, 08A592) entnommen und die Mikroglia *ex vivo* mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Interessanterweise wurden Unterschiede gefunden: Mikroglia aus dem Gehirn zeigte eine signifikant niedrigere Expressionsintensität von CD18, CD11b, CD11c und B7-1 im Vergleich zum Rückenmark, während die von CD1c im Gehirn signifikant höher als im thorakolumbalen Rückenmark war. Für den Anteil CD14-exprimierender Mikroglia wurde ein signifikant niedrigeres Ergebnis im zervikalen Rückenmark gefunden, während der Anteil CD44 positiver Mikrogliazellen in dieser Lokalisation signifikant höher als im Gehirn und im thorakolumbalen Rückenmark war. Auch für die funktionellen Untersuchungen, Phagozytose und ROS-Generation wurden physiologische Unterschiede gefunden: Mikroglia im Gehirn zeigte jeweils eine signifikant niedrigere Aktivität als im Rückenmark. Doch auch innerhalb des Rückenmarks ergaben sich Unterschiede: die zervikale Mikroglia wies eine signifikant höhere Phagozytoseintensität als die thorakolumbale auf. Die Resultate geben Hinweise auf eine immunologische Diversität der Mikroglia, die vermutlich durch unterschiedliche regionale Erfordernisse hervorgerufen wird.

Neben den Erkenntnissen über physiologische Unterschiede im Reaktionsprofil der Mikroglia in Abhängigkeit von der ZNS-Lokalisation wurden zudem Referenzwerte für gesunde Hunde etabliert, die zu Vergleichen für weitere Studien mit neuropathologischen Erkrankungen, insbesondere Rückenmarkstraumata, herangezogen werden können.

Boekhoff, T.M., Ensinger, E.-M., Carlson, R., Bock, P., Baumgärtner, W., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.: Microglial contribution to secondary injury evaluated in a large animal model of human spinal cord trauma. ***J Neurotrauma, 2011 May 20. [Epub ahead of print]***

In dieser Arbeit steht die pathogenetische Rolle der Mikroglia insbesondere beim Sekundärschaden nach Rückenmarkstrauma im Vordergrund. Sie stellt zudem die Weiterführung der Studie zu immunphänotypischen und funktionellen Unterschieden der Mikroglia in Abhängigkeit von der Lokalisation im ZNS dar, da Mikroglia aus bestimmten Rückenmarksabschnitten charakterisiert und die Resultate mit denen bei gesunden Hunden (n = 30) verglichen wurden. Mikroglia von 15 Hunden mit spontanen Rückenmarkstraumen (vor allem Autounfälle und Bandscheibenvorfälle) wurde aus dem Bereich der zervikalen (n = 5) oder thorakolumbalen (n = 10) Rückenmarksläsion isoliert und *ex vivo* in der Durchfluss-zytometrie charakterisiert. Zudem erfolgte eine semiquantitative histopathologische Evaluierung des Gewebsschadens. Diese ergab, dass die Myelinophagie am Tag 5 nach Rückenmarkstrauma signifikant erhöht war. Bereits die Evaluierung der Mikrogliapopulation *ex vivo* nach Größe und Komplexität in der Durchflusszytometrie zeigte bei Hunden mit Rückenmarkstrauma eine deutliche Diversifizierung. Die immunphänotypische Untersuchung der Mikroglia ergab eine aufregulierte Expression von B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), MHC II, CD1c, ICAM-1 (CD54), CD14, CD44 und CD45 im Vergleich zu den regionsspezifischen Kontrollwerten. Auch die Phagozytose und ROS-Generation war bei der Mikroglia von Hunden mit Rückenmarkstrauma im Vergleich zu den regionsspezifischen Werten gesunder Kontrolltiere signifikant gesteigert. Dieses Expressionsprofil deutet auf eine verstärkte Funktion der Mikroglia bei der Co-stimulation von T-Zellen, bei der Leukozytenadhäsion und -aggregation und bei der Antigenpräsentation hin. Interessanterweise ergaben sich auch im traumatisierten Rückenmark regionale Unterschiede: Mikroglia aus dem traumatisierten zervikalen Rückenmark zeigte eine signifikant höhere Expressionsdichte von B7-1, MHC I und MHC II im Vergleich zum thorakolumbalen. Diese Resultate sprechen mit denen der Studie im gesunden Rückenmark (Ensinger et al. 2010) für einen bereits höheren Wachsamkeits-status der Mikroglia im gesunden Rückenmark, was im Falle einer neuropathologischen Störung zu einer stärkeren Aktivierung befähigt.

Rückenmarkstraumen sind häufige und schwerwiegende neuropathologische Erkrankungen beim Hund und beim Menschen. Daher hat diese Arbeit zusätzlich zu den Erkenntnissen für den Hund auch wichtigen Modellcharakter für die Translation auf den Menschen.

Stein, V.M., Puff, C., Genini, S., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Variations on brain microglial gene expression of MMPs, RECK, and TIMPs in inflammatory and non-inflammatory diseases in dogs. ***Vet Immunol Immunpathol, 2011 Jun 24. [Epub ahead of print]***

Diese Arbeit stellt die Ausdehnung der Untersuchung des Reaktionsprofils der Mikroglia bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen auf die Expression von MMPs, TIMPs und RECK dar, die an der Rekrutierung peripherer Entzündungszellen in das ZNS beteiligt sein können. Um den Einfluss der Mikroglia an der Vermittlung der Transmigration von Entzündungszellen durch die Blut-Hirn-Schranke zu evaluieren, wurde methodisch eine PCR an *ex vivo* asservierten Mikrogliazellpellets angewendet. Vorarbeit zu dieser Studie stellte die Untersuchung der Leukozyten bei SRMA (Schwartz et al. 2010) dar.

Ex vivo isolierte Mikrogliazellen von Hunden mit verschiedenen ZNS-Erkrankungen wurden direkt nach der Isolation bis zur PCR-Untersuchung tiefgefroren (-80°C) asserviert. Entsprechend der Befunde der histopathologischen Untersuchung wurden die Hunde (n = 24) in fünf Erkrankungskategorien unterteilt: Hunde mit intrakraniellen Tumoren (n = 5), Entzündungen (n = 7), idiopathischer Epilepsie (n = 2), anderen intrakraniellen Erkrankungen wie Missbildungen und Abiotrophien (n = 5) und extrakraniellen Erkrankungen (n = 5). Mittels quantitativer real-time PCR wurde ihre Expression von MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 und RECK ermittelt und verglichen. Es wurde eine signifikante Aufregulation der MMP-9-Expression bei Hunden mit intrakraniellen Entzündungen unabhängig von der Ätiologie gefunden. MMP-13 und MMP-14 zeigten zudem eine signifikante Abregulation bei Hunden mit intrakraniellen Tumoren im Vergleich zu denen mit anderen intrakraniellen Erkrankungen. Zusätzlich wurde eine Zymographie an ZNS-Gewebe ausgewählter Hunde durchgeführt, um die Unterschiede von MMP-2 und MMP-9 auf der Proteinebene zu untersuchen. Mithilfe dieser Technik wurden keine Unterschiede zwischen Hunden mit intrakraniellen Entzündungen und anderen intrakraniellen Erkrankungen gefunden. In der Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT; n = 11) wiesen Hunde ohne Kontrastmittelanreicherung eine signifikante Aufregulation von MMP-13 im Vergleich zu denen mit Kontrastmittelanreicherung auf. Da MMPs am Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix und an der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, könnte ihre Expression auf der Mikroglia einen entscheidenden Einfluss auf die Rekrutierung und Transmigration peripherer Entzündungszellen in das ZNS haben.

Stein, V.M., Genini, S., Puff, C., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Enhanced TIMP-2 expression of microglia is associated with seizure activity. ***submitted 2010***

In dieser Studie wurden die mikrogliale Expression von MMPs, TIMPs und RECK und ihr Zusammenhang mit dem Auftreten von Krampfgeschehen beim Hund untersucht. MMPs und TIMPs vermitteln den Abbau und Umbau der extrazellulären Matrix und können Proteine von Myelin und tight junctions spalten, die einen Teil der Blut-Hirn-Schranke bilden. Im Rahmen des Gewebsumbaus kann auch die synaptische Plastizität beeinflusst werden. Eine aberrante synaptische Plastizität wird mit der Epileptogenese in Zusammenhang gebracht. Um die Rolle der Mikroglia beim Krampfgeschehen mittels MMP-, TIMP- und RECK-Expression zu evaluieren, wurden die Hunde (n = 24) der vorher beschriebenen Studie in eine Gruppe mit wiederholten Krampfanfällen unterschiedlicher Genese (n = 11) und eine Gruppe ohne Krampfanfälle (n = 13) unterteilt. Mittels quantitativer real-time PCR wurde die Expression von MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 und RECK untersucht und die Resultate der beiden Gruppen verglichen. Interessanterweise zeigte sich eine signifikante Aufregulation der Expression von TIMP-2 bei Hunden mit Krampfanfällen. Für die MMPs, TIMP-1 und RECK wurde kein Unterschied in der Expression gefunden. Es ist fraglich, ob die Aufregulation von TIMP-2 bei Hunden mit Krampfanfällen eine Folge der Anfälle ist oder ob auch eine Beeinflussung der Epileptogenese durch die mikrogliale Expression von MMPs, TIMPS oder RECK möglich ist. Die Aufregulation der Expression eines MMP-Inhibitors durch die Mikroglia bei Hunden mit wiederholten Krampfanfällen könnte eine Gegenregulation zur Verhinderung von Krampfanfällen und einer aberranten synaptischen Plastizität darstellen.

Stein, V.M., Crooks, A., Ding, W., Prociuk, M., O'Donnell, P., Sikora, T., Bryan, C., Dingemanse, J., Morand, O., Walkley, S.U., Vanier, M.T., Vite, C.H.: Miglustat improves Purkinje cell survival and alters microglial phenotype in feline Niemann-Pick Disease Type C. ***Manuskript in Ausarbeitung zur Einreichung bei J Neuropath Exp Neur***

Diese Studie umfasste mehrere Besonderheiten: erstmalig wurde die Mikroglia *ex vivo* im Rahmen einer neurodegenerativen Erkrankung, der Niemann-Pick Krankheit Typ C (NP-C), charakterisiert. Innerhalb der vorgelegten Studien wurde zum ersten Mal die Mikroglia der Spezies Katze untersucht und außerdem wurde die Untersuchung in einem anderen Labor als bisher, im Department of Clinical Studies der University of Pennsylvania in Philadelphia, USA durchgeführt. Zwei Fragestellungen sollten mit dieser Studie bearbeitet werden: Mikroglia sollte immunphänotypisch und funktionell charakterisiert werden, um Rückschlüsse auf eine mögliche Beeinflussung der Pathogenese dieser lysosomalen Speicherkrankheit zu gewinnen. Zum anderen sollte im Rahmen eines Therapieversuchs mit Miglustat, einem Iminozucker, der das Enzym Glucosylceramidsynthase hemmt, ein möglicher Einfluss auf Mikroglia untersucht werden.

In der vorliegenden Studie wurden neun Katzen im Alter von 21-35 Wochen untersucht und die Daten der gesunden (n = 3) mit denen von NP-C erkrankten unbehandelten (n = 2) und NP-C erkrankten Miglustat behandelten Katzen (n = 4) verglichen. Die Mikroglia zeigte bei den NP-C erkrankten Katzen eine Aufregulation von MHC I, B7-1 (CD80) und CD14 und der Phagozytose. Eine signifikante Aufregulation von CD45, CD44 und ICAM-1 (CD54) konnte nur bei Mikroglia von Miglustat behandelten Katzen gefunden werden. Für CD1c wurde eine inverse Korrelation von Expression und Expressionsintensität gefunden: ein höherer Anteil CD1c exprimierender Mikroglia wurde bei gesunden Katzen demonstriert, während die Expressionsintensität bei erkrankten Katzen signifikant erhöht war. Für CD18, CD11b, CD11c und MHC II wurde kein Unterschied zwischen gesunden und NP-C erkrankten Katzen gefunden. Der Anteil ROS generierender Mikroglia war bei NP-C erkrankten unbehandelten signifikant niedriger als bei gesunden und Miglustat behandelten Katzen. Die Resultate verdeutlichen, dass feline Mikroglia bei NP-C eine deutliche Aktivierung zeigt und eine entzündliche Komponente auch für die Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Miglustat zeigte einen modulierenden Effekt auf Mikroglia, was ein Hinweis auf den nicht bekannten Wirkmechanismus für die neurologische Verbesserung der Katzen sein könnte.

D Übergreifende Diskussion

Mikrogliazellen stellen das lokale Immunsystem des ZNS dar (Giulian 1987, Streit 2002). Jegliche Art von pathologischem Stimulus führt zu ihrer Aktivierung, was morphologische und immunphänotypische Veränderungen, wie auch die Aktivierung ihrer vielfältigen Funktionen nach sich zieht (Kreutzberg 1987, Lawson et al. 1992, Gehrmann und Kreutzberg 1995, Streit 1995). Es wurde lange Zeit vermutet, dass diese Aktivierung einem uniformen und unspezifischen Muster folgt, welches unabhängig von der Art des zugrunde liegenden pathologischen Stimulus ausgeführt wird (Stoll und Jander 1999, Raivich et al. 1999, Graeber et al. 2002). Neuere Studien lieferten jedoch immer neue Daten, die auf eine spezifische Reaktion der Mikroglia bei verschiedenen Neuropathologien schließen ließen. Heutzutage ist die Annahme eines stereotypen und unspezifischen Reaktionsmusters der Mikroglia der Meinung gewichen, dass diese Sichtweise die Kompetenz der Mikrogliazellen deutlich unterschätzt (Streit 2002, Tambuyzer et al. 2009).

Da aktivierte Mikrogliazellen bei praktisch jeder neuropathologischen Erkrankung vorliegen, wird eine Beeinflussung der Pathogenese dieser Erkrankungen vermutet (Giulian 1999, Stoll und Jander 1999, Popovich 2002, Tambuyzer et al. 2009). In den vorliegenden Studien wurde das Reaktionsprofil der Mikroglia in acht verschiedenen neuropathologischen Paradigmen bei Hund und Katze untersucht. Die Ergebnisse wurden mit dem Alter und Geschlecht, aber auch mit klinischen Parametern, wie beispielsweise dem Vorhandensein von Krampfgeschehen, der jeweiligen medikamentellen Behandlung, Kontrastmittelanreicherung in CT oder MRT, der Dauer und dem Schweregrad der Erkrankung und dem Krankheitsverlauf korreliert. Zudem wurden physiologische Daten der Mikroglia in unterschiedlichen Lokalisationen im ZNS erhoben. Verschiedene Techniken der Untersuchung wurden angewendet, wie die Durchflusszytometrie, quantitative real-time PCR und Zymographie. Entstanden ist ein komplexes Bild über das Reaktionsprofil der Mikroglia bei Hund und Katze.

Im Vergleich der verschiedenen neuropathologischen Erkrankungen wies der Immunphänotyp der Mikroglia ein relativ gleichsinniges Muster auf: die Mikroglia zeigt nach ihrer Aktivierung eine Aufregulation der Expression oder Expressionsintensität verschiedener

Oberflächenantigene, wie der Integrine CD18, CD11b, CD11c, der Oberflächenmarker für die Antigenpräsentation MHC I und MHC II sowie CD1c, der co-stimulierenden Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) und ICAM-1 (CD54), das die Leukozytenadhäsion vermittelt (Stein et al. 2004b, Stein et al. 2006). Bei Rückenmarkstrauma wurde zudem eine Aufregulation von CD14, CD44 und CD45 gesehen, CD45 außerdem bei langanhaltenden chronischen Erkrankungen des ZNS und Krampfanfällen (Stein et al. 2007, Boekhoff et al. 2010, Stein et al. 2010b). Dieses Muster erweckt den Anschein eines relativ stereotypen Reaktionsprofils der Mikroglia, unabhängig davon, ob intrakranielle Tumore, intrakranielle Entzündungen, im speziellen Hundestaupe, idiopathische Epilepsie, andere intrakranielle Erkrankungen, Rückenmarkstrauma oder eine neurodegenerative Erkrankung vorlagen.

Für die Funktion der Mikroglia ergab sich ein anderes Bild. Die Phagozytoseaktivität war generell bei neuropathologischen Erkrankungen unterschiedlicher Genese gesteigert, aber für Hunde mit CDV-Infektion und intrakranielle Entzündungen anderer Ätiologie als CDV, sowie nach Rückenmarkstrauma wurden signifikante Unterschiede gefunden. Dies spricht für eine spezifische Adaptation der mikroglialen Reaktion an die zugrunde liegende Pathologie. Für die ROS-Generation war das Ergebnis noch deutlicher: eine Aufregulation sowohl des Anteils ROS-generierender Mikroglia, als auch der Intensität der ROS-Generation wurde bei Hunden mit akuter CDV-Infektion und Demyelinisierung im ZNS gefunden. Diese gesteigerte ROS-Bildung wies eine statistische Signifikanz im Vergleich mit allen anderen Erkrankungsgruppen auf (Stein et al. 2006). Eine gesteigerte ROS-Generation der Mikroglia wird auch bei anderen demyelinisierenden Erkrankungen, wie der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE, Ruuls et al. 1995) oder der Multiplen Sklerose beobachtet (Vladimirova et al. 1998) und scheint einen wichtigen Einfluss auf die Pathogenese dieser Erkrankungen zu haben. ROS führen zur Peroxidation von Proteinen, DNA, Lipiden und Glykolipiden, welche Bestandteile der Myelinscheide sind. Zudem zeigen Oligodendrozyten, die Myelinscheiden bildende Zellpopulation, eine selektive Verletzlichkeit gegenüber ROS (Griot et al. 1990). Die Daten der vergleichenden Studie bei unterschiedlichen ZNS-Erkrankungen (Stein et al. 2006) unterstreichen die Resultate einer vorhergehenden Studie über die Charakterisierung der Mikroglia bei akuter CDV-Infektion (Stein et al. 2004b) und deuten auf einen wesentlichen und spezifischen Einfluss der Mikroglia auf die Pathogenese der Demyelinisierung bei Hundestaupe hin.

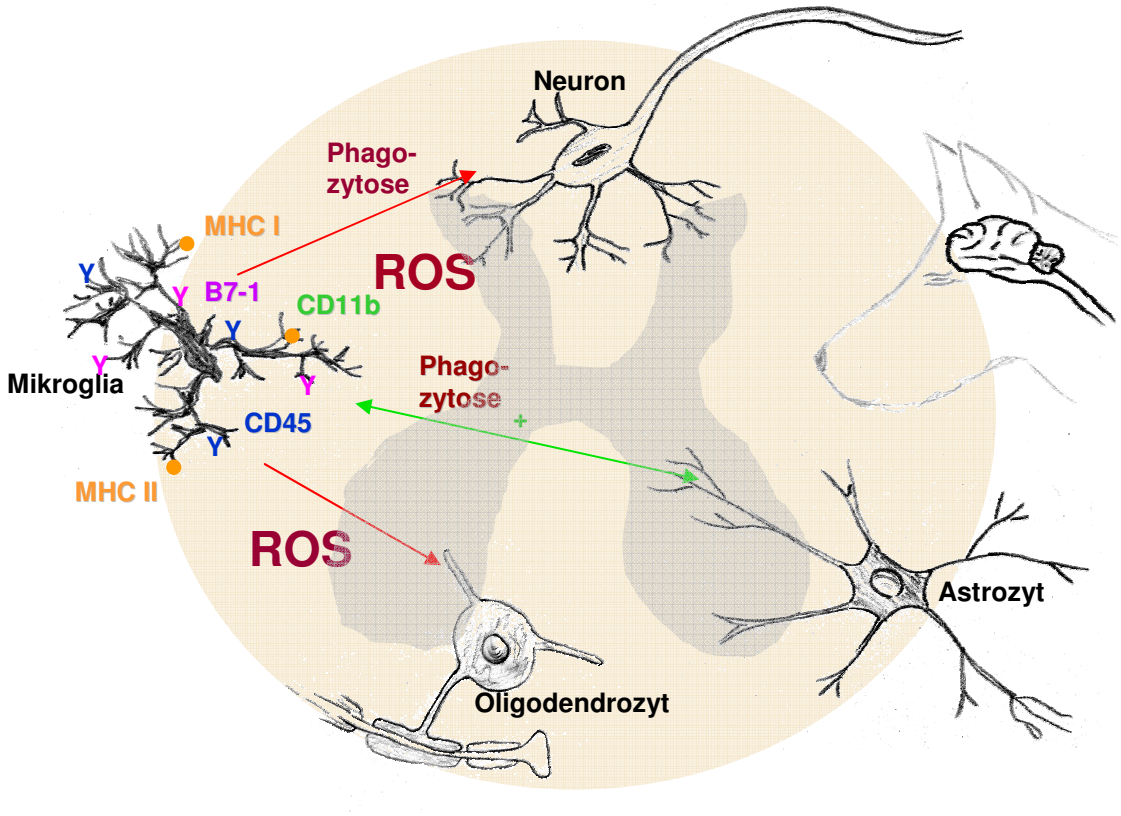
Die Charakterisierung der Mikroglia wurde im Weiteren um die Untersuchung der Expression von MMPs mittels quantitativer real-time PCR an *ex vivo* isolierten Mikrogliazellen erweitert. In einer vergleichenden Studie der mikroglialen Expression von MMPs, TIMPs und RECK (Stein et al. 2011) wurde eine signifikante Aufregulation von MMP-9 bei Hunden mit intrakraniellen Entzündungen gezeigt, während die Expression von MMP-13 und MMP-14 bei Hunden mit intrakraniellen Tumoren herunterreguliert war. Das Expressionsmuster von MMPs durch die Mikroglia scheint daher relativ spezifisch an die zugrunde liegende neuropathologische Erkrankung angepasst zu sein. Da die MMPs sehr potente proteolytische Enzyme sind, ist ihre Aktivität jedoch strikt und mittels mehrerer Mechanismen reguliert (Yong et al. 2001). Die anhand der quantitativen real-time PCR bestimmten Expressionen der MMPs, TIMPs und RECK muss demnach nicht die Situation auf der Proteinebene widerspiegeln. Dies wurde durch die Resultate der Zymographie bestätigt, die keinen Unterschied in der Expression von MMP-9 zeigte. Die aufregulierte mikrogliale Expression von MMP-9 bei Hunden mit intrakraniellen Entzündungen könnte jedoch eine wichtige Rolle für die Rekrutierung und Transmigration peripherer Entzündungszellen durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS spielen, da MMPs an Abbau- und Umbauprozessen der extrazellulären Matrix und der Proteine von Myelin und den tight junction-Komplexen, die einen Teil der Blut-Hirn-Schranke ausmachen, beteiligt sind (Matrisian et al. 1990, Gurney et al. 2006).

Neben den genannten Aufgaben sind MMPs, TIMPs und RECK auch an Umbauprozessen des Nervengewebes und der synaptischen Plastizität beteiligt (Ben-Ari 2001). Eine aberrante synaptische Plastizität wird mit der Formation epileptischer Foci in Zusammenhang gebracht (Pitkänen und Sutula 2002). Zur Untersuchung eines potentiellen Einflusses der mikroglialen Expression von MMPs, TIMPs oder RECK auf das Krampfgeschehen beim Hund wurden die Expressionsprofile zwischen einer Gruppe mit und einer ohne Krampfgeschehen verglichen (Stein et al. 2010a). Interessanterweise war die Expression eines MMP-Inhibitors, TIMP-2, bei Hunden mit Krampfanfällen signifikant erhöht. Es ist schwierig zu evaluieren, ob die Aufregulation von TIMP-2 eine Folge der Anfälle oder ob eine Beeinflussung der Epileptogenese durch die mikrogliale Expression von MMPs, TIMPs oder RECK möglich ist. Eine aufregulierte Expression von TIMP-2 könnte eine mikrogliale Gegenregulation zur Verhinderung von Krampfanfällen oder einer aberranten synaptischen Plastizität darstellen.

Studien an Mäusen zeigten, dass das mikrogliale Verteilungsmuster und die Expression immunregulatorischer Proteine im gesunden ZNS regionalen Unterschieden unterliegt (De Haas et al. 2008). In dieser Spezies ist es aufgrund der Größenverhältnisse jedoch nicht möglich, vergleichende Studien unterschiedlicher Lokalisationen des Rückenmarkes durchzuführen. Die Studie von Ensinger et al. (2010) mit 30 gesunden Beaglen (die für einen anderen Versuch euthanasiert wurden, 08A550, 08A556, 08A568, 08A580, 08A592) ist die erste, die vergleichende physiologische Daten der Mikroglia *ex vivo* aus verschiedenen Rückenmarkslokalisationen liefert. Warum das Gehirn eine überwiegend niedrigere Intensität der Expression von Oberflächenantigenen als das Rückenmark und innerhalb des Rückenmarks das zervikale eine höhere Phagozytoserate als das thorakolumbale aufweist, wirft zudem die Frage nach der biologischen Bedeutung differentiell exprimierter Proteine und Funktionen der Mikroglia in unterschiedlichen Lokalisationen im ZNS auf. Offensichtlich bestehen bereits im gesunden ZNS regional verschiedene Erfordernisse an die mikrogliale Wachsamkeit. Andererseits wird die Mikroglia via Neurotransmitter durch Neurone kontrolliert (Biber et al. 2007). Da die Level der Neurotransmitter räumlich begrenzt sehr stark reguliert sind, könnten diese Signale zu lokal unterschiedlichen ausgeprägten Mikrogliaphänotypen führen (De Haas et al. 2008). Zudem unterstreichen die Resultate, dass die Bezeichnung der ramifizierten als „ruhende“ Mikroglia eine offensichtliche Fehlbezeichnung ist, da sie keineswegs ruht, sondern sehr aktiv das ZNS mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der Homöostase überwacht. Der interessante Befund regionaler topographischer Unterschiede der ruhenden Mikroglia spiegelt die Existenz einer immunologischen Diversität der Mikroglia in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des ZNS wider und könnte wichtige Hinweise für das Verständnis von der Prädilektion mancher neuropathologischer Erkrankungen im ZNS liefern.

Neben diesen wichtigen Erkenntnissen über die regionale immunologische Diversität der Mikroglia dienten die Daten dieser Studie (Ensinger et al. 2010) zudem als Referenzwerte für die Untersuchung der Mikroglia nach Rückenmarkstrauma und ihren Einfluss auf die Pathogenese des Sekundärschadens, dem „secondary injury“ (Boekhoff et al. 2010). Nach Rückenmarkstrauma konnte sowohl eine Aufregulation von verschiedenen Oberflächenantigenen, wie auch der Phagozytose und der Generation von ROS im Vergleich zu den regionsspezifischen Kontrollen dargestellt werden. Dieses Reaktionsprofil deutet auf eine verstärkte Funktion der Mikroglia bei der Co-stimulation von T-Zellen, bei der

Leukozytenadhäsion und -aggregation und bei der Antigenpräsentation hin. Zusammen mit der gesteigerten Phagozytose kann dies als wichtiger Hinweis für die neuroprotektiven Eigenschaften der Mikroglia interpretiert werden (Rabchevsky 2002). Da ROS jedoch direkt neurotoxisch wirken können (Banati et al. 1993, Qin et al. 2004), ist die Facette der gesteigerten ROS-Generation nach Rückenmarkstrauma im mikroglialen Reaktionsprofil als kritisch für die Regeneration zu werten.



Die Abbildung illustriert den vermuteten Einfluss der Mikroglia auf die Pathogenese des Sekundärschadens nach Rückenmarkstrauma

Trotz der umfassenden Untersuchungen des Immunphänotyps und des Expressionsmusters von MMPs, TIMPs und RECK, die auf bestimmte Funktionen der Mikroglia schließen lassen, sowie der direkt gemessenen Phagozytose und ROS-Generation der Mikroglia in verschiedenen neuropathologischen Szenarien ist es dennoch schwierig, anhand der Ergebnisse zu beurteilen, ob die Mikroglia vermittelten Funktionen positiv und förderlich für die Immunabwehr und Regeneration im ZNS sind, oder eher negative und schädliche Auswirkungen auf das ZNS haben. So ist eine gesteigerte Phagozytose z.B. bei Rückenmarkstrauma notwendig, um die Menge an zerstörtem oder verletztem Gewebe zu entfernen und stellt eine wichtige

Vorraussetzung für die nachfolgende Regeneration im Rückenmark dar (Schwab et al. 1993, Popovich 2002, Rabchevsky 2002). Die gesteigerte Expression der co-stimulierenden Moleküle B7-1 und B7-2 und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, welche die Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen, T-Zellen und Endothelzellen vermitteln und somit die Transmigration von Entzündungszellen aus dem Blut in das ZNS ermöglichen, ist vermutlich unterstützend für die lokalen Aufräumprozesse (Boekhoff et al. 2010). Eine gesteigerte Generation von ROS kann in der Mikroumgebung des ZNS jedoch direkt zytotoxisch sein (Banati et al. 1993, Xu et al. 2005) und wesentlich zur Verschlechterung der neuropathologischen Erkrankung beitragen.
Da es zum einen evolutionsbiologisch keinen Sinn machen würde, potentielle „Killerzellen“ strategisch in unserem wichtigsten Kontrollzentrum, dem ZNS, verteilt zu haben und zum anderen viele Studien die neuroprotektive Wirkung der Mikroglia unterstreichen (Rabchevsky und Streit 1997, Rezaie und Male 1999, Streit 2002), ist davon auszugehen, dass Mikroglia nicht als „bad guys“ und die Auswirkungen ihrer Aktivierung nicht als pauschal negativ zu sehen sind. Daher ist die Herausforderung bei der Entwicklung innovativer Therapiestrategien eher die selektive Hemmung spezifischer mikroglialer Funktionen (Stein et al. 2010b), wie die Generation von ROS oder die Abpufferung überschießender Reaktionen, und nicht die umfassende Hemmung der Aktivierung dieser Zellpopulation.

Eine andere Sichtweise, die mehr an Bedeutung gewinnt, ist die Unterscheidung der Zellpopulationen, aus denen sich die Mikrogliazellpopulation zusammensetzt: ursprüngliche Mikroglia und im Rahmen einer Erkrankung eingewanderte Monozyten/Makrophagen aus dem Blut. Bereits in vorhergehenden Studien wurden die Immunphänotypen dieser zwei Zellpopulationen verglichen und Möglichkeiten zu deren Unterscheidung beim Nager (Sedgwick et al. 1991) und bei Hund und Katze (Stein et al. 2004a, Stein et al. 2010b) definiert. Die unterschiedliche Expressionsdichte von CD45 in Kombination mit der Expression von CD11b und CD11c wird als Charakteristikum zur Identifikation dieser beiden Zellpopulationen herangezogen, wobei Monozyten/Makrophagen einen charakteristischen Immunphänotyp von CD11b/c^{+} und CD45^{high} und Mikroglia von CD11b/c^{+} und CD45^{low} zeigen (Sedgwick et al. 1991, Dick et al. 1997). Beim Hund zeigte sich, dass Monozyten/ Makrophagen auch für weitere Oberflächenantigene wesentlich höhere Expressionsdichten

und auch eine höhere Intensität der Phagozytose und ROS-Generation zeigten (Stein et al. 2004a).

Problematisch wird die Unterscheidung dieser Zellpopulationen bei neuropathologischen Erkrankungen nach Rekrutierung der Monozyten/Makrophagen aus dem Blut in das ZNS, da zum einen die eingewanderten Makrophagen die Expression ihrer Oberflächenantigene an das Milieu im ZNS anpassen können und zum anderen die Mikroglia im Rahmen ihrer Aktivierung die Expression ihrer Oberflächenantigene aufreguliert haben kann (Stein et al. 2006 und 2007). Behalten die eingewanderten Monozyten/Makrophagen ihre wesentlich höheren Expressionsdichten und deutlich prominenteren Intensitäten der Phagozytose und ROS-Generation bei, kann dies schnell überschießend und schädlich für die Mikroumgebung im ZNS sein.

Studien mit Depletion der hämatogenen Makrophagen nach Rückenmarkstrauma zeigten eine verbesserte funktionelle Erholung und den Erhalt von myelinisierten Axonen im Bereich der Läsion (Popovich et al. 1999). Die Studie deutet auf einen negativen Einfluss dieser Zellpopulation der eingewanderten Makrophagen auf die Regeneration nach Rückenmarks-trauma hin. Andere Studien implizieren, dass die eingewanderten Makrophagen die zytotoxischen Eigenschaften der Mikroglia erst induzieren (Bauer et al. 1995, Dijkstra et al. 1992). Ganz im Gegensatz zu diesen Studien scheint bei einer anderen neuropathologischen Erkrankung, der Alzheimer Krankheit, der Einfluss der hämatogenen Makrophagen ein sehr positiver zu sein (Rivest 2009). Diese Zellen scheinen die toxischen Proteine, wie das Amyloid-β wesentlich aggressiver und effektiver entfernen zu können als die ursprünglich vorhandene Mikroglia, was zu neuen therapeutischen Ansätzen bei dieser Krankheit geführt hat (Rivest 2009).

Diese Studien verdeutlichen, dass wir einen wesentlich differenzierteren Blick auf die Mikrogliazellpopulation werfen müssen, um die pathogenetischen Zusammenhänge für verschiedene neuropathologische Erkrankungen verstehen zu können. Sie unterstreichen zudem die nicht nur philosophische Notwendigkeit, Möglichkeiten für die Differenzierung von ursprünglicher Mikroglia und hämatogenen Monozyten/Makrophagen zu definieren, um deren Einfluss auf die Pathogenese neuropathologischer Erkrankungen zu verstehen. Dieses Wissen könnte über die Modulation der Rekrutierung von Makrophagen aus dem Blut neue Möglichkeiten zur Therapie neuropathologischer Erkrankungen eröffnen.

In den hier vorgelegten Studien wurde Mikroglia bei verschiedenen zugrunde liegenden neuropathologischen Paradigmen *ex vivo* untersucht. Dabei wurden alle Tiere, deren Mikroglia untersucht wurde, auch histopathologisch aufgearbeitet. So wurde zum einen sichergestellt, dass die Klassifizierung der Tiere in Gruppen entsprechend der neuropathologischen Ätiologie exakt durchgeführt wurde, zum anderen war es möglich, die Resultate der Mikrogliacharakterisierung mit dem Schweregrad der Erkrankungen zu korrelieren. Dieser Korrelation kommt insbesondere bei der Überprüfung der Wirksamkeit neuer Medikamente in Therapiestudien besondere Bedeutung zu (Stein et al. 2010b). Hier kann Mikroglia zum einen als wichtiger Biomarker für die Effektivität herangezogen werden, zum anderen könnte die Modulation des Reaktionsprofils der Mikroglia selbst einen wichtigen Baustein in der Wirksamkeit eines neuen Medikamentes darstellen (Stein et al. 2010b).

Die in den vorgelegten Studien zumeist verwendete *ex vivo*-Untersuchung der Mikroglia nach Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation (Stein et al. 2004a) ist eine sehr zeit- und arbeitsintensive Methode. Jedoch ist sie auch eine einzigartige Methode, die vermutlich die exaktesten Hinweise auf die Funktionen dieser Zellen *in vivo* liefert. Unterschiede in den Resultaten der Mikrogliacharakterisierung sind auf eine unterschiedliche Aktivierung und Reaktivität der Mikroglia *in vivo* zurückzuführen, da die Behandlung der Zellen immer dem gleichen Protokoll folgt (Stein et al. 2004a). Zellkulturartefakte werden bei dieser Methodik vermieden, da die Kultivierung von Mikroglia per se zu ihrer Aktivierung führt (Streit 1993).

Im weiteren wurde in den vorliegenden Studien die vornehmlich verwendete Technik der Durchflusszytometrie um andere Methoden der Untersuchung erweitert, um die Fragestellungen zu bearbeiten und weitere Aspekte im Repertoire des Reaktionsprofils der Mikroglia erfassen zu können. So wurde eine quantitativer real-time PCR angewendet, um die mikrogliale Expression von MMPs, TIMPs und RECK zu messen.

Die Methodik der Mikrogliaisolation und Untersuchung *ex vivo* findet bei Nagermodellen Anwendung, jedoch mehren sich die Hinweise, dass deutliche Unterschiede in der Immunantwort zwischen Nager und Mensch bestehen (Wewetzer et al. 2010). Das Bewusstsein über den Bedarf an Großtiermodellen wird zunehmends größer. Über die Etablierung der Methodik der Mikrogliaisolierung beim Hund (Stein et al. 2004a) und die Modifizierung für die Spezies Katze (Stein et al. 2010b) haben die vorliegenden Studien

neben den direkten Erkenntnissen über das Reaktionsprofil der Mikroglia bei verschiedenen neuropathologischen Erkrankungen und deren Einfluss auf die Pathogenese zudem einen Beitrag zur Etablierung von Großtiermodellen geliefert. Diese könnten die Lücke zwischen den Erkenntnissen aus Nagermodellen und Therapiestudien am Menschen schließen. Daher kommt diesen Großtiermodellen zudem als translationale Modelle für neuropathologische Erkrankungen beim Menschen eine besondere Bedeutung zu.

Ausblick

In den vorliegenden Studien wurden die Funktionen der Mikroglia, wie die Phagozytose und die Generation von ROS direkt gemessen. Auf viele weitere Funktionen lässt sich durch den präsentierten Immunphänotyp und die Expression von MMPs, TIMPs und RECK schließen. Jedoch stellt dies nur einen geringen Anteil des mikroglialen Reaktionspotenitals dar. Zusätzlich zu den bisher veröffentlichten oder verfassten Studien wurde zudem die Expression von Zytokinen, wie Interleukin-1β (IL-1β), IL-6, IL-8, IL-10, Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interferon-γ (IFN-γ), bei den verschiedenen neuropathologischen Erkrankungen und deren Korrelation zu verschiedenen Parametern, wie z.B. Kontrastmittelanreicherung in CT oder MRT, dem Auftreten von Krampfgeschehen evaluiert (Daten bisher nicht publiziert). Viele weitere Fragestellungen in Bezug auf weitere Mediatoren und Produkte der Mikroglia eröffnen sich, insbesondere die Rolle der Toll-like Rezeptoren oder Stickstoffmonoxid (NO) in der Pathogenese von neuropathologischen Erkrankungen.

Wichtig scheint zudem die Unterscheidung zwischen ursprünglicher Mikroglia im ZNS von im Rahmen der Erkrankung rekrutierten und eingewanderten Makrophagen, die sich dann zu dem Mikroglia-Pool hinzuaddieren (Perry und Gordon 1991, Flaris et al. 1993). Studien deuten darauf hin, dass diese Zellen bei einigen neuropathologischen Erkrankungen, wie Rückenmarkstraumen eher negative (Popovich et al. 1999) und bei anderen, wie z.B. der Alzheimer Krankheit (Rivest 2009) positive Einflüsse haben. Daher wäre es interessant, Möglichkeiten der Unterscheidung zu etablieren, um den Einfluss der beiden Zellpopulationen von Mikroglia an der Pathogenese von neuropathologischen Erkrankungen zu definieren und ggf. an diesem Stellrad therapeutisch einzugreifen.

Eine besondere Herausforderung ist jedoch die Etablierung von Techniken, die es erlauben, Mikroglia und deren Aktivierungsstatus *in vivo* darzustellen. Die Darstellung der Mikroglia-aktivierung mittels bildgebender Techniken könnte mit dem Krankheitsverlauf korreliert werden und ermöglichen Vergleichsuntersuchungen mit den Resultaten der *ex vivo* isolierten Mikroglia. Somit würden sich innovative Möglichkeiten für das Monitoring neuer Therapiestrategien mit der Mikroglia als Biomarker im Behandlungsversuch eröffnen.

E Zusammenfassung

Die Mikroglia ist die Immuneffektorzelle des ZNS. Jegliche Art von pathologischer Störung führt zu ihrer Aktivierung. Aufgrund der potenten Eigenschaften der aktivierten Mikroglia wird sie eng mit der Pathogenese neuropathologischer Erkrankungen assoziiert.

In den vorliegenden Studien wurde das Reaktionsprofil der Mikroglia *ex vivo* in acht verschiedenen neuropathologischen Paradigmen bei Hund und Katze untersucht. Dabei wurden die Diversität dieser Zellpopulation bei gesunden Hunden studiert, Rückschlüsse auf die Pathogenese gezogen und neue Therapieansätze untersucht. Die Ergebnisse wurden jeweils mit dem Alter und Geschlecht, aber auch mit klinischen Parametern, wie beispielsweise dem Vorhandensein von Krampfgeschehen, der jeweiligen medikamentellen Behandlung, Kontrastmittelanreicherung in CT oder MRT, der Dauer und dem Schweregrad der Erkrankung und dem Krankheitsverlauf korreliert. Verschiedene Techniken der Untersuchung wurden angewendet, wie vor allem die Durchflusszytometrie und die quantitative real-time PCR. Entstanden ist ein komplexes Bild über das Reaktionsprofil der Mikroglia bei Hund und Katze, über welches Rückschlüsse auf den Einfluss der Mikroglia auf die Pathogenese neuropathologischer Erkrankungen gezogen werden können.

In einer vergleichenden Studie wurde bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen eine Aufregulation derselben Oberflächenantigenen gefunden, was für eine relativ unspezifische Reaktion der Mikroglia spricht. Bei der funktionellen Untersuchung wurde eine gesteigerte Phagozytose und ROS-Generation vor allem bei Entzündungen im ZNS gefunden. Entzündliche Erkrankungen waren auch mit einer Expression von MMPs, TIMPs und RECK verbunden, die Aufregulation der MMP-9-Expression auf Mikroglia zeigte eine statistische Signifikanz. Insbesondere für den Einfluss der Mikroglia auf die Pathogenese der Demyelinisierung bei akuter Hundestaupe haben sich deutliche Hinweise gefunden. Mikroglia von Hunden mit CDV-Infektion wies eine spezifisch und signifikant gesteigerte ROS-Generation auf, die zur Peroxidation von Proteinen, Lipiden und Glykolipiden in der Myelinscheide führen können.

Bei der Untersuchung der Mikroglia aus dem Rückenmark haben sich physiologische Unterschiede in Immunphänotyp und Funktion der Mikroglia in Abhängigkeit von der Lokalisation im ZNS ergeben, was auf eine immunologische Diversität der Mikroglia schließen lässt. Die erfassten Daten wurden als regionsspezifische Vergleichswerte für die

Untersuchung der Mikroglia von Hunden nach Rückenmarkstrauma herangezogen, um einen Einfluss der Mikroglia auf den Sekundärschaden zu evaluieren. Die Mikroglia wies auch bei Rückenmarkstrauma deutliche morphologische, immunphänotypische und funktionelle Anzeichen für ihre Aktivierung auf. Die Frage, ob die mikroglial vermittelten Reaktionen neuroprotektiv sind und die Regeneration unterstützen oder negative Auswirkungen haben, ist schwierig zu beurteilen. Eine gesteigerte Generation von ROS scheint aber aufgrund der direkt neurotoxischen Eigenschaft zum Sekundärschaden nach Rückenmarkstrauma beizutragen.

Im Rahmen einer felinen neurodegenerativen Erkrankung, der Niemann Pick Krankheit Typ C (NP-C), wurden ein geänderter Immunphänotyp und gesteigerte Funktionen der Mikroglia gefunden. In einer Therapiestudie bei NP-C mit dem Medikament Miglustat wurde ein verändertes Reaktionsprofil der Mikroglia gefunden. Die Modulation des Immunphänotyps und der Funktion der Mikroglia könnte einen möglichen Wirkmechanismus von Miglustat darstellen und gleichzeitig einen Erklärungsansatz für die neurologische Verbesserung im Vergleich zu unbehandelten Katzen darstellen.

Die Erkenntnisse über den Einfluss der Mikroglia auf die Pathogenese von ZNS-Erkrankungen könnten neue Ansätze für innovative Therapiestrategien, auch von bisher nicht behandelbaren neurodegenerativen Erkrankungen liefern. Neben den direkten Erkenntnissen über mikrogliale Reaktionsprofile für die untersuchten Spezies Hund und Katze kommt den Studien auch wichtiger translationaler Modellcharakter für den Menschen zu.

F Summary

Microglia are the immune effector cells of the central nervous system (CNS). Virtually, every kind of pathological stimulus leads to their activation. Due to their potential functions activated microglia is closely associated with the pathogenesis of neuropathological diseases.

In the presented studies the reaction profile of microglia was examined *ex vivo* in the context of eight different neuropathological disease paradigms in dogs and cats. A bridge was built between examinations of the physiological diversity of this cell type, the influence on the pathogenesis of CNS diseases and new treatment modalities in an example of a neurodegenerative disease. The results obtained in the different studies were correlated with age, gender, and clinical parameters such as the presence or absence of seizures, medical treatment, contrast enhancement in computed tomography or magnetic resonance imaging, the duration and severity of the underlying disease, and the course of the disease. Various techniques for microglial characterization were applied such as flow cytometry and quantitative real-time PCR. The results of the studies present a complex picture of the microglial reaction profile in dogs and cats. Some conclusions can be drawn on the potential influence of microglia on the pathogenesis of neuropathological diseases.

In a comparative study an upregulation of surface antigens was found in different CNS diseases suggesting a relatively unspecific reaction pattern of microglia. However, the functional analysis revealed an enhanced phagocytosis and ROS generation most notably in inflammatory diseases of the CNS. Inflammatory CNS diseases were also accompanied with MMPs, TIMPs, and RECK expression on microglia cells, expression of MMP-9 was significantly enhanced. In particular, findings in canine distemper virus (CDV) infection point to a crucial role of microglia in the pathogenesis of demyelination. Microglia of dogs with CDV infection showed a significantly and specifically enhanced generation of ROS which could lead to peroxidation of proteins, lipids, and glycolipids which are constituents of the myelin sheath.

The examination of microglia from the spinal cord revealed physiological differences of microglial immunophenotype and function depending on the topographical localization within the CNS indicating an immunological diversity of microglia. The data obtained were also used as region-specific reference values for the analysis of microglia in dogs with spinal cord injury (SCI) and the assessment of their impact on the “secondary injury”. Microglia of

dogs with SCI showed distinct morphological, immunophenotypical, and functional signs of activation. However, it is cumbersome to evaluate whether microglial reactions are neuroprotective and support neuronal regeneration or are harmful and exacerbate neurodegeneration. Due to direct neurotoxicity the enhanced ROS generation of microglia measured might significantly contribute to the secondary injury following SCI.

Furthermore, microglia was characterized in a feline neurodegenerative disorder, Niemann Pick disease type C (NP-C). Microglia of NP-C diseased cats showed immunophenotypical and functional changes associated with their activation. The microglial reaction profile differed in NP-C cats receiving miglustat in the course of a clinical therapy trial. The modulation of microglial immunophenotype and function might be one possible mode of action of miglustat and might similarly be an explanation for neurological improvement in comparison to untreated cats.

Increasing the knowledge about the impact of microglia on the pathogenesis of neuropathological diseases could give rise to the development of new treatment strategies including neurodegenerative diseases. Besides the direct gain of knowledge about microglial reaction profiles in the canine and feline species investigated the findings give important insights for translational studies.

G Literaturverzeichnis

Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* **7**, 111-118

Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD (1995) The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* **15**, 437-46

Ben-Ari Y (2001) Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* **42** Suppl 3, 5-7

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM (2007) Neuronal On and Off signals control microglia. *Trends Neurosci.* **30**, 596-602

Boekhoff TM, Ensinger E-M, Carlson R, Bock P, Baumgärtner W, Rohn K, Tipold A, Stein VM (2010) Microglial contribution to secondary injury evaluated in a large animal model of human spinal cord trauma. *J Neurotrauma, submitted*

Carson MJ (2002) Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis. *Glia* **40**, 218-231

Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007) The origin and cell lineage of microglia—new concepts. *Brain Res. Rev.* **53**, 344-354

Chao, CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* **149**, 2736-2741

Ciesielski-Treska J, Grant N J, Ulrich G, Corrotte M, Bailly Y, Haeberle AM, Chasserot-Golaz S, Bader MF (2004) Fibrillar prion peptide (106 –126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. *Glia* **46**, 101-115

Davis EJ, Foster TD, Thomas WE (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* **34**, 73-78

De Haas AH, Boddeke HWGM, Biber K (2008) Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* **56**, 888-894

Dick AD, Ford AL, Forrester JV, Sedgwick JD (1995) Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45lowCD11b/c+CD4low parenchymal microglia. *Br J Ophthalmol.* **79**, 834-840

Dick AD, Pell M, Brew BJ, Foulcher E, Sedgwick JD (1997) Direct ex vivo flow cytometric analysis of human microglial cell CD4 expression: examination of central nervous system biopsy specimens from HIV-seropositive patients and patients with other neurological disease. *AIDS* **11**, 1699-1708

Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G (1985) The heterogenity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophages subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED 1, ED 2 und ED 3. *Immunol.* **54**, 589-599

Dijkstra CD, De Groot CJ, Huitinga I (1992) The role of macrophages in demyelination. *J Neuroimmunol.* **40**,183-188

Ding M, St Pierre BA, Parkinson JF, Medberry P, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Merrill JE (1997) Inducibel nitric oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia: a kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **272**, 11327-11335

Ensinger E-M, Boekhoff TM, Carlson R, Beineke A, Rohn K, Tipold A, Stein VM (2010) Regional topographical differences of canine microglial immunophenotype and function in the healthy spinal cord. *J Neuroimmunol.* **227**,144-152

Fedoroff S (1995) Development of microglia. In: Kettenmann H u. BR Ransom (Eds.): Neuroglia. Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 162-181

Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* **50**, 477-486

Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC, Hickey WF (1993) Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and four models of parenchymal reaction. *Glia* **7**, 34-40

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD (1995) Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. *J. Immunol.* **154**, 4309-4321

Gartner S, Liu Y (2002) Insights into the role of immune activation in HIV neuropathogenesis. *J. Neurovirol.* **8**, 69-75

Gehrmann J, Kreutzberg GW (1995) Microglia in experimental neuropathology. In: Kettenmann H, Ransom BR (Eds.): Neuroglia. Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 883-904

Giulian D (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **18**, 155-171

Giulian D (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer's disease. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 13-18

Giulian D, Vaca K, Noonan C (1990) Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* **250**, 1593-1596

Gottschall PE, Deb S (1996) Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* **3**, 69-75

Graeber MB, Streit WJ (1990) Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol.* **1**, 2-5

Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR 3 complement receptor expression by activated microglia cells. *J. Neurosci. Res.* **21**, 18-24

Graeber MB, Blakemore WF, Kreutzberg GW (2002) Cellular pathology of the central nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (Eds.): Greenfield´s Neuropathology Arnold, London, pp. 158-191

Griot C, Vandevelde M, Richard A, Peterhans E, Stocker R (1990) Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species. *Free Radic. Res. Commun.* **11**, 181-193

Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg,GA (2006) Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol. Dis.* **23**, 87-96

Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140-155

Jin R, Yu S, Song Z, Quillin JW, Deasis DP, Penninger JM, Nanda A, Granger DN, Li G (2010) Phosphoinositide 3-kinase-gamma expression is upregulated in brain microglia and contributes to ischemia-induced microglial activation in acute experimental stroke. *Biochem Biophys Res Commun.* **399**, 458-64

Kim YS, Joh TH (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.* **38**, 333-347

Kitamura T, Miyake T, Fujita S (1984) Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **226**, 421-433

Kreutzberg GW (1987) Microglia. In: Adelman G (Edt.): Encyclopedia of Neuroscience. Birkhäuser, Boston, pp. 661-662

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 312-318

Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 196-206

Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* **7**, 19-24

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

Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48**, 405-415

Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7**, 9-18

Lull ME, Block ML (2010) Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* **7**, 354-365

Matrisian, L.M., 1990. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet*. **6**, 121-125

McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG (1993) Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* **7**, 82-92

Miao Q, Baumgärtner W, Failing K, Alldinger S (2003) Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol.* **106**, 486-494

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314-1318

Perry VH, Gordon S (1991) Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* **125**, 203-244

Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult a developing mouse brain. *Neurosci.* **15**, 313-326

Pitkänen A, Sutula TP (2002) Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* **1,**173-181

Popovich PG (2002) Role of microglia and macrophages in secondary injury of the traumatized spinal cord: troublemakers or scapegoats? In: Streit WJ (Edt.): Microglia in the Regenerating and Degenerating Central Nervous System. New York: Springer-Verlag, Inc. p 152-165

Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT (1999) Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol.* **158**, 351-365

Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS (2004) NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J. Biol. Chem.* **279**, 1415-1421

Rabchevsky AG, Streit WJ (1997) Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* **47**, 34-48

Rabchevsky AG (2002) Influences of activated microglia/brain macrophages on spinal cord injury and regeneration. In: Streit WJ (Edt.): Microglia in the Regenerating and Degenerating Central Nervous System. New York: Springer-Verlag, Inc. p 209-226

Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci.* **28**, 571-573

Raivich G, Banati R (2004) Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **46,** 261-281

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LJ, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* **30**, 77-105

Rezaie P, Male D (1999) Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc. Res. Tech.* **45**, 359-382

Rivest S (2009) Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* **9**, 429-439

Ruuls SR, Bauer J, Sontrop K, Huitinga I, Hart BA, Dijkstra CD (1995) Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* **56**, 201-217

Schäfer MK, Schwaeble WJ, Post C, Salvati P, Calabresi M, Sim RB, Petry F, Loos M, Weihe E (2000) Complement C1q is dramatically up-regulated in brain microglia in response to transient global cerebral ischemia. *J Immunol.***164**, 5446-52

Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci.* **16**, 565-595

Schwartz M, Puff C, Stein VM, Baumgärtner W, Tipold A (2010) Marked MMP-2 transcriptional up-regulation in mononuclear leukocytes invading the subarachnoidal space in aseptic suppurative Steroid-responsive Meningitis-Arteritis in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* **133,** 198-206

Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dörries R, Butcher GW, ter Meulen V (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 7438-7442

Skoff RP (1975) The fine structure of pulse labeled (3-H-thymidine cells) in degenerating rat optic nerve. *J. Comp. Neurol.* **161**, 595-611

Stein VM, Czub M, Hansen R, Leibold W, Moore PF, Zurbriggen A, Tipold A (2004a) Characterization of canine microglial cells isolated ex vivo. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **99**, 73-85

Stein VM, Czub M, Schreiner N, Moore PF, Vandevelde M, Zurbriggen A, Tipold A (2004b) Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions, *J. Neuroimmunol.* **153**, 122-131

Stein VM, Baumgärtner W, Kreienbrock L, Zurbriggen A, Vandevelde M, Tipold A (2006) Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? *Vet Immunol Immunopathol.* **113**, 277-287

Stein VM, Baumgärtner W, Schröder S, Zurbriggen A, Vandevelde M Tipold A (2007) Differential expression of CD45 on canine microglial cells. *J Vet Med Series A*, **54**, 314-320

Stein VM, Schreiner NMS, Moore PF, Vandevelde M, Zurbriggen A, Tipold A (2008) Immunophenotypic characterization of monocytes in canine distemper virus infection. *Vet Microbiol.* **131**, 237-246

Stein VM, Puff C, Genini S, Baumgärtner W, Tipold A (2010a) Microglial expression of MMP-9 and MMP-13 is strongly associated with neuroinflammation. *Vet Immunol Immunpathol. submitted*

Stein VM, Genini S, Puff C, Baumgärtner W, Tipold A (2010b) Enhanced TIMP-2 expression of microglia is associated with seizure activity. *Epilepsia, submitted*

Stein VM, Crooks A, Ding W, Prociuk M, O'Donnell P, Sikora T, Bryan C, Dingemanse J, Morand O, Walkley SU, Vanier MT, Vite CH (2010c) Miglustat improves neurological function, alters microglial phenotype, and extends lifespan in feline NPC Disease. *Manuskript in Ausarbeitung zur Einreichung bei J Neuropath Exp Neur*

Streit WJ (1993) Microglial-neuronal interactions. *J Chem Neuroanat.* **6**, 261-266

Streit WJ (1995) Microglial cells. In: Kettenmann H u. Ransom BR (Eds.): Neuroglia. Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 85-97

Streit WJ (1996) The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology* **17**, 671-678

Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**, 133-139

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* **1**, 301-307

Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.* **58**, 233-247

Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol.* **85**, 352-370

Ulvestad E, Williams K, Matre R, Nyland H, Oliver A, Antel J (1994) Fc receptors for IgG on cultured human microglia mediate cytotoxicity and phagocytosis of antibody-coated targets. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**, 27-36

Veerhuis R, Hoozemans JJ, Janssen I, Boshuizen RS, Langeveld JP, Eikelenboom P (2002) Adult human microglia secrete cytokines when exposed to neurotoxic prion protein peptide: no intermediary role for prostaglandin E2. *Brain Res.* **925**, 195-203

Vladimirova O, O´Connor J, Cahill A, Alder H, Butunoi C, Kalman B (1998) Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Mult. Scler.* **4**, 413-418

Wewetzer K, Radtke C, Kocsis J, Baumgärtner W (2010) Species-specific control of cellular proliferation and the impact of large animal models for the use of olfactory ensheathing cells and Schwann cells in spinal cord repair. *Exp Neurol.* Sep 15. [Epub ahead of print]

Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, Qiu M, Gozal D, Liu R (2005) Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord* **43**, 204-213

Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 502-511

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J (2005) Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* **19**, 533-542

H Erklärung über den eigenen Anteil an den Publikationen

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Kreienbrock, L., Zurbriggen, A., Vandevelde, M., Tipold, A.: Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? *Vet Immunol Immunopathol, 113: 277-287, 2006*

Idee, Studienplanung:	Stein, Tipold
Studiendurchführung:	Stein, Vandevelde, Zurbriggen, Baumgärtner
Auswertung, Diskussion:	Stein, Kreienbrock, Zurbriggen, Vandevelde, Tipold
Erstellen des Manuskripts:	Stein
Korrespondierender Autor:	Stein

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Schröder, S., Zurbriggen, A., Vandevelde, M. Tipold, A.: Differential expression of CD45 on canine microglial cells. *J Vet Med Series A, 54: 314-320, 2007*

Idee, Studienplanung:	Stein, Tipold
Studiendurchführung:	Stein, Schröder, Vandevelde, Zurbriggen, Baumgärtner
Auswertung, Diskussion:	Stein, Baumgärtner, Zurbriggen, Vandevelde, Tipold
Erstellen des Manuskripts:	Stein
Korrespondierender Autor:	Stein

Stein, V.M., Schreiner, N.M.S., Moore, P.F., Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Tipold, A.: Immunophenotypic characterization of monocytes in canine distemper virus infection. *Vet Microbiol 131: 237-246, 2008*

Idee, Studienplanung:	Stein, Vandevelde, Zurbriggen, Tipold
Studiendurchführung:	Stein, Schreiner, Vandevelde, Zurbriggen, Tipold
Auswertung, Diskussion:	Stein, Vandevelde, Zurbriggen, Tipold, Moore
Erstellen des Manuskripts:	Stein
Korrespondierender Autor:	Stein

Schwartz, M., Puff, C., Stein, V.M., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Marked MMP-2 transcriptional up-regulation in mononuclear leukocytes invading the subarachnoidal space in aseptic suppurative Steroid-responsive Meningitis-Arteritis in dogs. *Vet Immunol Immunopathol, 133 (2-4): 198-206, 2010*

Idee, Studienplanung:	Schwartz, Tipold, Stein
Studiendurchführung:	Schwartz, Stein
Auswertung, Diskussion:	Schwartz, Stein, Puff, Tipold, Baumgärtner
Erstellen des Manuskripts:	Schwartz, Tipold, Stein
Korrespondierender Autor:	Schwartz

Ensinger, E.-M., Boekhoff, T.M., Carlson, R., Beineke, A., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.: Regional topographical differences of canine microglial immunophenotype and function in the healthy spinal cord. *J Neuroimmunol, 227(1-2): 144-152, 2010*

Idee, Studienplanung:	Stein, Tipold
Studiendurchführung:	Ensinger, Boekhoff, Stein, Carlson, Beineke
Auswertung, Diskussion:	Stein, Tipold, Beineke, Rohn
Erstellen des Manuskripts:	Ensinger, Boekhoff, Stein
Korrespondierender Autor:	Stein

Boekhoff, T.M., Ensinger, E.-M., Carlson, R., Bock, P., Baumgärtner, W., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.: Microglial contribution to secondary injury evaluated in a large animal model of human spinal cord trauma. *J Neurotrauma, 2011 May 20. [Epub ahead of print]*

Idee, Studienplanung:	Stein, Tipold
Studiendurchführung:	Boekhoff, Ensinger, Stein, Carlson, Bock, Baumgärtner
Auswertung, Diskussion:	Stein, Baumgärtner, Tipold, Rohn
Erstellen des Manuskripts:	Stein, Boekhoff, Ensinger
Korrespondierender Autor:	Stein

Stein, V.M., Puff, C., Genini, S., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Variations on brain microglial gene expression of MMPs, RECK, and TIMPs in inflammatory and non-inflammatory diseases in dogs. *Vet Immunol Immunpathol, 2011 Jun 24. [Epub ahead of print]*

Idee, Studienplanung:	Stein, Tipold
Studiendurchführung:	Stein, Puff, Baumgärtner
Auswertung, Diskussion:	Stein, Puff, Genini, Baumgärtner, Tipold
Erstellen des Manuskripts:	Stein, Genini
Korrespondierender Autor:	Stein

Stein, V.M., Genini, S., Puff, C., Baumgärtner, W., Tipold, A.: Enhanced TIMP-2 expression of microglia is associated with seizure activity. *submitted 2010*

Idee, Studienplanung:	Stein, Tipold
Studiendurchführung:	Stein, Puff, Baumgärtner
Auswertung, Diskussion:	Stein, Genini, Baumgärtner, Tipold
Erstellen des Manuskripts:	Stein, Genini
Korrespondierender Autor:	Stein

Stein, V.M., Crooks, A., Ding, W., Prociuk, M., O'Donnell, P., Sikora, T., Bryan, C., Dingemanse, J., Morand, O., Walkley, S.U., Vanier, M.T., Vite, C.H.: Miglustat improves Purkinje cell survival and alters microglial phenotype in feline Niemann-Pick Disease Type C. *Manuskript in Ausarbeitung zur Einreichung bei J Neuropath Exp Neur*

Idee, Studienplanung:	Stein, Vite
Studiendurchführung:	Stein, Crooks, Vanier, Vite, O'Donnell, Walkley, Prociuk, Morand
Auswertung, Diskussion:	Stein, Vite
Erstellen des Manuskripts:	Stein, Vite
Korrespondierender Autor:	Vite

Publikation 1:

Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function ?

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Kreienbrock, L., Zurbriggen, A., Vandevelde, M., Tipold, A.

Vet Immunol Immunopathol, 113: 277-287, 2006

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.05.011

Abstract

Microglial cells represent the endogenous immune system of the central nervous system (CNS). Upon pathological insults they reveal their immunological potential aimed at regaining homeostasis. These reactions have long been believed to follow a uniform and unspecific pattern which is irrespective to the underlying disease entity. Evidence is growing that this view seriously underrates microglial competence as the defenders of the CNS. In the present study, microglial cells of 47 dogs were examined ex vivo by means of flow cytometry. Ex vivo examination included immunophenotypic characterization using eight different surface markers and functional studies such as phagocytosis assay and the reactive oxygen species (ROS) generation test. The dogs were classified according to their histopathological diagnoses in disease categories (controls, canine distemper virus (CDV) induced demyelination, other diseases of the CNS) and results of microglial reaction profiles were compared. Immunophenotypic characterization generally revealed relative high conformity in the microglial disease response among the different groups, however the functional response was shown to be more specific. Dogs with intracranial inflammation and dogs with demyelination showed an enhanced phagocytosis, whereas a significant up-regulation of ROS generation was found in dogs with demyelination due to CDV infection. This strongly suggests a specific response of microglia to infection with CDV in the settings of our study and underlines the pivotal role of microglial ROS generation in the pathogenesis of demyelinating diseases, such as canine distemper.

Publikation 2:

Differential expression of CD45 on canine microglial cells

Stein, V.M., Baumgärtner, W., Schröder, S., Zurbriggen, A., Vandevelde, M. Tipold, A.

J Vet Med Series A, 54: 314-320, 2007

http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0442.2007.00926.x/abstract

Abstract

CD45, also called leucocyte common antigen is a transmembrane protein tyrosine phosphatase on the surface of nearly all white blood cells and has a functional role in signal transduction. In the brain, the expression of CD45 can be used to distinguish microglial cells with a characteristic phenotype of CD11b/c+ and CD45(low) from other central nervous system (CNS) macrophages which show an expression of CD11b/c+ and CD45(high). In the course of pathological changes in the CNS, microglia in rodents is known to readily upregulate expression of various surface molecules, such as CD45. Understanding the mechanisms that regulate expression of surface molecules is essential to study the pathogenesis of CNS diseases. In the present study, the expression of CD45 on microglia of 42 dogs was examined ex vivo by means of flow cytometry. The dogs were classified in two groups according to the histopathological diagnosis in the CNS. All dogs without changes in the CNS (group I; n = 22) only showed low percentages of CD45+ microglial cells. In group II consisting of 20 dogs with different intracranial diseases varying results were obtained. Thirteen dogs showed a low percentage of CD45+ microglial cells whereas seven dogs exhibited high percentages of microglial cells expressing CD45. Evaluation of expression intensity in these seven dogs revealed two subpopulations of CD45+ microglial cells: a large subpopulation with CD45(low) and a small subpopulation with CD45(high). The expression intensity of CD45(high) was comparable with that of canine monocytes. It was attempted to correlate these findings to age of the animals, underlying disease, duration of clinical signs, medical treatment, occurrence of seizure activity and the expression of other surface molecules. It appeared that dogs with high percentages of CD45+ suffered from long-lasting CNS disease with seizures. In future studies, the reason and consequences for upregulated CD45 in long-lasting CNS diseases has to be further evaluated.

Publikation 3:

Immunophenotypic characterization of monocytes in canine distemper virus infection

Stein, V.M., Schreiner, N.M.S., Moore, P.F., Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Tipold, A.

Vet Microbiol 131: 237-246, 2008

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.03.009

Abstract

Canine distemper virus (CDV) infection induces multifocal demyelination in the central nervous system (CNS). It is thought that the resident macrophages of the CNS, the microglia, as well as invading monocytes associated with the inflammatory reaction may play a central role in the demyelinating process. To evaluate changes in peripheral monocytes in CDV infection their immunophenotype was characterized by flow cytometry during the course of an experimental CDV infection in dogs. The highest number of CDV-infected monocytes was found in dogs developing demyelinating lesions. In CD18, CD45, CD44, and CD14 neither up- nor down-regulation was observed. Marked up-regulation occurred in a number of surface molecules including CD1c, B7-1 and B7-2, MHC I, and CD11b. Peak expression was found at 4-5 weeks post-infection (PI), regardless of clinical outcome. All these molecules play an important role in the host's immune response, notably antigen presentation and cell adhesion. These results demonstrate that CDV infection in vivo may enhance several macrophage functions. This could lead to more effective clearance of the virus but may also increase demyelination through a bystander effect in animals that accumulated significant amounts of CDV in the CNS.

Publikation 4:

Marked MMP-2 transcriptional up-regulation in mononuclear leukocytes invading the subarachnoidal space in aseptic suppurative Steroid-responsive Meningitis-Arteritis in dogs

Schwartz, M., Puff, C., Stein, V.M., Baumgärtner, W., Tipold, A.

Vet Immunol Immunopathol, 133 (2-4): 198-206, 2010

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.08.007

Abstract

Canine Steroid-Responsive Meningitis-Arteritis (SRMA) is a suitable animal model for studies on the development of neutrophilic pleocytosis in aseptic meningitis. Samples of dogs in the acute phase of SRMA (n=16) were examined for gene expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. Results were compared to those of dogs under glucocorticosteroid treatment for SRMA (n=16) and dogs with other inflammatory and neoplastic diseases of the central nervous system (CNS) (n=19). Samples included mononuclear (PBMCs) and polymorphonuclear cells (PBPMNs) of peripheral blood and cerebrospinal fluid white blood cells (CSF WBCs). In the acute phase of SRMA CSF WBCs showed mRNA expression for MMP-2 and -9 and TIMP-1 and -2, highlighting a contribution of these cells to the overall content of MMPs and TIMPs in CSF. MMP-2 mRNA levels in CSF WBCs were significantly up-regulated in comparison to PBMC expression levels, suggesting that MMP-2 is relevant for PBMC invasion into the subarachnoidal space and that the expression is influenced by migratory activity through the blood-CSF-barrier.

Publikation 5:

Regional topographical differences of canine microglial immunophenotype and function in the healthy spinal cord

Ensinger, E.-M., Boekhoff, T.M., Carlson, R., Beineke, A., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.

J Neuroimmunol, 227(1-2): 144-152, 2010

http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.07.017

Abstract

Differences in the regulation of surface molecule expression and functional activity of microglia, the resident immune effector elements of the central nervous system (CNS), might give important insights into understanding the predilection sites of some diseases within the CNS. Therefore, canine microglial cells in relation to different topographical regions within the healthy CNS were evaluated ex vivo from the brain, cervical, and thoracolumbar spinal cord using density gradient centrifugation and flow cytometry in a homogenous dog population. Immunophenotypical characterization showed physiological regional differences for B7-1, CD14, CD44, CD1c, CD18, CD11b, and CD11c. Both, phagocytosis and ROS generation revealed differences between the brain, cervical, and thoracolumbar spinal cord. Our results emphasize that microglia displays physiological topographical regional differences within the CNS. The dog seems to be an ideal model to further investigate the role of microglia in focal pathological conditions of the spinal cord.

Publikation 6:

Microglial contribution to secondary injury evaluated in a large animal model of human spinal cord trauma

Boekhoff, T.M., Ensinger, E.-M., Carlson, R., Bock, P., Baumgärtner, W., Rohn, K., Tipold, A., Stein, V.M.

J Neurotrauma, 2011 May 20. [Epub ahead of print]

http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/neu.2011.1821

Abstract

Spinal cord trauma (SCT) in dogs is a well recognized animal model to study pathogenesis and treatment modalities of the debilitating human disease. To define the contributing role of microglial cell activation to the secondary wave following SCT microglia from 15 dogs with SCT confirmed by imaging, gross and histopathological examination was isolated and characterized in terms of morphology, immunophenotype, and function *ex vivo* by flow cytometry allowing single cell analysis. The results were compared to region-specific findings obtained from healthy control dogs.

Light microscopy revealed a significant enhancement of myelinophagia within the traumatized spinal cord of dogs suffering from SCT for 5 days or longer. Immunophenotypical characterization revealed increased expression of B7-1, B7-2, MHC II, CD1c, ICAM 1, CD14, CD44, and CD45 emphasizing the enhanced function of microglia as co-stimulator of T cells, in leukocyte adhesion and aggregation, and for lipid or glycolipid presentation. In addition, phagocytosis and ROS generation were significantly increased in dogs with spinal cord trauma. Regional differences within the spinal cord were observed by demonstrating disparities in microglial immunophenotypes in the traumatized cervical compared to thoracolumbar spinal cord. In contrast to histopathology microglia activation analysed on a single cell basis did not depend on the time span following SCT.

Publikation 7:

Variations on brain microglial gene expression of MMPs, RECK, and TIMPs in inflammatory and non-inflammatory diseases in dogs

Stein, V.M., Puff, C., Genini, S., Baumgärtner, W., Tipold, A.

Vet Immunol Immunpathol, 2011 Jun 24. [Epub ahead of print]

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242711002273

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs), MMP inhibitors (TIMPs, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases), and the membrane-anchored glycoprotein RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) contribute to the pathogenesis of many CNS diseases. To assess the potential pathogenetic roles of microglial MMP, TIMP, and RECK generation in extracellular matrix breakdown, opening of the blood brain barrier (BBB) and subsequent recruitment of leukocytes in the CNS, twenty-four dogs suffering from spontaneously occurring different intracranial and extracranial (control group) diseases were examined. Microglia cells were isolated *ex vivo* by density gradient centrifugation and their expressions of MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and RECK were examined via quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Zymography on CNS tissues in selected cases was performed to assess differences at the protein level. Dogs were grouped in different disease categories according to histopathological examinations, in groups with or without inflammatory reactions, and in groups with/without contrast enhancement in advanced diagnostic imaging as a function of BBB breakdown. The results showed a significant up-regulation of MMP-9 in dogs with inflammation in the CNS independent of their aetiology, which might lead to a facilitated invasion of white blood cells. Furthermore, down-regulation of MMP-13 was found in dogs with contrast enhancement. Zymographical data reflected MMP-2 qPCR data. In conclusion, differential expression of MMPs and their inhibitors, but not of RECK, which might crucially influence the pathogenesis of a given disease, could be demonstrated in canine microglia. This reflects a further pathway in the microglial repertoire to respond to various disease conditions in the CNS, a characteristic that might be of particular relevance as a target for specific treatments.

Publikation 8:

Enhanced TIMP-2 expression of microglia is associated with seizure activity

Stein, V.M., Genini, S., Puff, C., Baumgärtner, W., Tipold, A.

submitted 2010

Abstract

In the pathogenesis of epilepsy aberrant synaptic plasticity plays an important role. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) are responsible for nervous tissue remodelling resulting in synaptic plasticity in the central nervous system (CNS) and might therefore be crucially involved in epileptogenesis. To assess the potential pathogenetic role of microglial MMPs and TIMPs in seizure induction, twenty-four dogs suffering from different intracranial diseases with and without seizure activity were comparatively examined. Microglia cells were isolated by density gradient centrifugation and their expression profiles of MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) were examined via quantitative real-time PCR (qPCR). Interestingly, a significant up-regulation of TIMP-2 expression was found in dogs suffering from seizures. In conclusion, microglial TIMP expression might be involved in seizure generation.

Publikation 9:

Miglustat improves Purkinje cell survival and alters microglial phenotype in feline Niemann-Pick Disease Type C

Stein, V.M., Crooks, A., Ding, W., Prociuk, M., O'Donnell, P., Sikora, T., Bryan, C., Dingemanse, J., Morand, O., Walkley, S.U., Vanier, M.T., Vite, C.H.

Manuskript in Ausarbeitung zur Einreichung bei J Neuropath Exp Neur

Abstract

Niemann-Pick type C (NPC) disease is an incurable lysosomal storage disorder caused by a mutation in the *NPC1* or *NPC2* gene resulting in the accumulation of unesterified cholesterol and glycolipids in the endosomal/lysosomal system of cells in the CNS and visceral organs. Recent studies suggest that CNS inflammation may play an important role in the pathogenesis of these neurodegenerative storage disorders. Clinicals signs include progressive neurological dysfunction, hepatosplenomegaly, and early death. Anecdotal reports describe possible benefits of miglustat, a small iminosugar that can cross the blood-brain-barrier and reversibly inhibits the glucosylceramide synthase in children affected by NPC. However, no histological or biochemical data were included in these studies and the mechanism of action of the improvement of neurological outcome could not be determined. Eleven cats with a spontaneously occurring missense mutation in *NPC1* were evaluated over time of which 4 received miglustat beginning at 3 weeks of age in a clinical therapy trial. Data were compared to 38 healthy age-matched wild-type cats. NPC affected cats showed significantly lower body weights, increases in postrotatory nystagmus, and central conduction times in BAER. However, miglustat treated cats showed a delay in onset and slowed progression of neurological signs. *Ex vivo* examination of microglia revealed an upregulation of MHC I, B7-1, CD14 and phagocytotic activity. In contrast, CD45, CD44, and ICAM-1 expression were only upregulated in miglustat treated cats. ROS generation was significantly reduced only in untreated NPC cats whereas miglustat treated had values comparable to healthy cats. The results support a beneficial influence of miglustat on the pathogenesis of NPC. The modulation of microglial immunophenotype and function might be one possible mode of action and similarly be an explanation for neurological improvement in comparison to untreated cats.