

Aus dem Zentrum für Neurologie und Psychiatrie der der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

**Charakterisierung primärer Mikroglia auf
weichen, elastischen PDMS-basierten Substraten
in-vitro als Modell des intrinsischen zerebralen
Milieus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Seda Demir
aus Köln, Deutschland

promoviert am 28. Februar 2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Rüger
2. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. medic. K. P. Pfannkuche
3. Gutachter: Professor Dr. med. S. Kürten

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. Stefan J. Blaschke sowie Frau Anna König und Herrn Dr. Daniel N. Olschewski, die mikroskopische und statistische Auswertung wurden gemeinsam mit Herrn Dr. Stefan J. Blaschke durchgeführt. Das Manuskript der beiliegenden Publikation mit dem Titel „Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia“ veröffentlicht im *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Blaschke, Demir et al., 2020), die der vorliegenden Dissertationsschrift zugrunde liegt, wurde in Erstfassung durch mich verfasst und Korrekturversionen durch mich überarbeitet. Herr Dr. Stefan J. Blaschke, Frau Dr. Monika Rabenstein, Herr Dr. Bernd Hoffmann, Frau Dr. Sabine U. Vay, Herr Universitätsprofessor Dr. Michael Schroeter, Herr Universitätsprofessor Dr. G. R. Fink sowie Frau Professorin Dr. Dr. M. Adele Rüger waren an der Planung und Koordinierung der Studie beteiligt und haben das Manuskript zur Publikation kritisch überarbeitet.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 28.02.2023

Unterschrift: *S. Demir*

Danksagung

Zuallererst möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Rüger herzlich danken für die Möglichkeit, als Teil ihrer Arbeitsgruppe „Neurale Stammzellen“ in der Klinik und Poliklinik für Neurologie am Universitätsklinikum Köln zu promovieren. Ich danke Ihnen für Ihre Unterstützung, die Betreuung, Ratschläge und Ermutigung und ganz besonders für die Atmosphäre, die ich in Ihrem Labor erfahren durfte und dafür, dass ich an Ihrem Vorbild und Beispiel in Labor und Klinik wachsen darf.

Ich möchte Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Michael Schroeter danken. Dankeschön für Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie Ihre Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Stefan Blaschke, für die Perspektive, die ich durch Sie gewinnen durfte; mein Horizont ist durch Ihre Anleitung, Supervision und den Austausch, für den Sie sich unentwegt Zeit genommen haben, gewachsen. Ich danke Ihnen für Ihr offenes Ohr, Ihre Zeit, Ihr Vertrauen und Ihre Erfahrungen, die Sie mit mir teilten. Ich habe mich stets als glücklich empfunden, durch Sie betreut zu werden. Ihnen gebührt mein voller und besonders herauszustellender Dank.

Frau Dr. med Sabine U. Vay; ich bin Ihnen zu Dank verpflichtet für ihre Hilfe, konstruktive Kritik und Ratschläge während der gesamten Dauer meines Projektes. Die zahlreichen Gespräche mit Ihnen bleiben mir als bereichernder Austausch, den ich stets als Motivaton und Ermutigung empfunden habe, in Erinnerung.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. med. Daniel N. Olschewski, Frau Jella-Andrea Abraham, Frau Anna König und Frau Dr. med. Monika Rabenstein danken. Mein Dank gilt auch Frau Claudia Drapatz für ihre technische Unterstützung und Anleitung. Ich möchte mich für die Unterstützung durch das „Institute of Neuroscience and Medicine“ des „Department of Cognitive Neuroscience“ sowie dem „Institute of Biological Information Processing“ des „Department of Mechanobiology“ des Forschungszentrum Jülich bedanken.

Ich danke meinen Eltern, Hülya und Bülent Demir, sowie meiner Schwester Betül Demir und meinem Bruder Akin Demir, denen ich diese Arbeit widme. Ich bin dankbar für den Halt, die Ermutigung und die Liebe.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	13
2.1 Mikrogli	13
2.1.1 Einordnung in die Gruppe der Neuroglia	14
2.1.1.1 Überblick	14
2.1.1.2 Einteilung der Neuroglia	16
2.1.1.2.1 Neuroglia des peripheren Nervensystems	16
2.1.1.2.2 Neuroglia des zentralen Nervensystems	17
2.1.2 Einordnung in die Gruppe des Mononukleären Phagozyten-Systems	23
2.1.3 Herkunft und Abstammung	25
2.1.4 Historische Betrachtung	26
2.1.5 Funktion	29
2.1.5.1 Aufrechterhaltung der Homöostase	29
2.1.5.2 Synaptogenese: Stripping und Pruning	31
2.1.5.3 Neurogenese	32
2.1.5.4 Myelinogenese	33
2.1.5.5 Angiogenese	33
2.1.5.6 Schutz vor Exzitotoxizität	33
2.1.6 Aktivierung	34
2.1.6.1 Das M1/M2-Paradigma	36
2.1.6.2 Mechanismus der Aktivierung	37
2.1.6.2.1 Stimuli der klassischen Aktivierung	38
2.1.6.2.2 Stimuli der alternativen Aktivierung	39
2.1.6.3 Postaktivierte Mikrogli	41
2.1.6.4 Aktivierungsassoziierte Marker	42
2.1.6.4.1 Antigen-Präsentations-assoziierte Marker	42
2.1.6.4.2 Transmembran- und Oberflächen-Proteine	42
2.1.6.4.3 Intrazellulär- und Effektorproteine	44
2.1.6.4.4 Sezernierte Moleküle	46
2.1.6.4.5 Marker des pro-inflammatorischen Phänotyps	46
2.1.6.4.6 Marker des anti-inflammatorischen Phänotyps	48
2.1.6.4.7 Marker der Übergangs-Mikrogli-Phänotypen	50

2.2	Rheologie des Zentralnervensystems	50
2.2.1	Mechanische Eigenschaften des Gehirns	51
2.2.2	Elastizitätsmodulierende Faktoren	52
2.3	Ziele der Dissertationsschrift	53
3.	PUBLIKATION	55
4.	DISKUSSION	71
4.1	Legitimation für das Studienkonzept	71
4.2	Die Beeinflussung von Morphologie und Funktion	72
4.2.1	Verwendung von PDMS-basierten Substraten	72
4.2.2	Beeinflussung der Morphologie	73
4.2.3	Beeinflussung der Funktion	75
4.2.3.1	Einfluss der Elastizität auf die Mikroglia-Polarisierung	75
4.2.3.2	Einfluss der Elastizität auf die dynamische Mikroglia-Polarisierung	78
4.2.3.3	Einfluss der Elastizität auf die Expression von Vimentin	80
4.2.3.4	Einfluss spannungsaktivierter Chlorid-Kanäle	81
4.3	Anwendbarkeit der Studienergebnisse	83
4.3.1	Vergleichbarkeit von Mikroglia aus Mensch und Nagetier	83
4.3.2	Vergleichbarkeit von in-vivo- mit in-vitro-Studien	86
4.4	Perspektive - Mikroglia als therapeutisches Target	87
5.	LITERATURVERZEICHNIS	90

Abkürzungsverzeichnis

AP1	Aktivierungs-Protein 1	Activator Protein 1
APA	Amerikanische Psychologische Gesellschaft	American Psychological Association
APC	Antigen-präsentierende Zellen	Antigen-Presenting Cells
ARG1	Arginase 1	Arginase 1
Aβ	Amyloid Beta	Amyloid Beta
BBB	Blut-Hirn-Schranke	Blood Brain Barrier
BrdU	Bromdesoxyuridin	Bromodesoxyuridine
CAM	ZNS-assoziierte Makrophagen	CNS-Associated Macrophages
CDx	Unterscheidungsgruppe x	Cluster of Differentiation x
CSF1	Koloniestimulierender Faktor 1	Colony Stimulating Factor 1
CX3CL1	C-X3-C Ligand 1; auch: Fraktalkin	CX3C Motif Ligand 1
CX3CR1	C-X3-C Chemokin Rezeptor 1	C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonsäure	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic Acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Desoxyribonucleic Acid
dpc	Tage nach der Konzeption	Days Post Conceptionem
ECM	Extrazelluläre Matrix	Extracellular Matrix
ERK	Extrazellulär-signalregulierte Kinase	Extracellular-Signal Regulated Kinase
FCER1G	Hochaffiner Immunglobulin Epsilon Rezeptor Gamma	High-Affinity Immunoglobulin Epsilon Receptor Subunit Gamma
FIZZ1	Resistin-ähnliches Molekül 1	Found in Inflammatory Zone 1
GFAP	Saures Gliafaserprotein	Glial Fibrillary Acidic Protein

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Iba1	Ionisiertes-Calcium-bindenes Adaptermolekül 1	Ionized Calcium-Binding Adaptor Molecule 1
IFNγ	Interferon-Gamma	Interferon Gamma
IGF1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1	Insulin-like Growth Factor 1
ILx	Interleukin x	Interleukin x
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRFx	Interferon-regulatorischer Faktor x	Interferon Regulatory Factor x
JAK	Janus-Kinase	Janus Kinase
Ki67	Kiel-67	Kiel-67
LDH	Laktatdehydrogenase	Lactate Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid	Lipopolysaccharide
M1	Klassisch aktivierte Mikroglia, pro-inflammatorisch	Classically Activated Microglia
M2	Aternativ aktivierte Mikroglia, anti-inflammatorisch	Alternatively Activated Microglia
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrixmetalloproteinase	Matrix Metalloproteinase
MPS	Mononukleäres Phagozyten-System	Mononuclear Phagocyte System
MRE	Magnet-Resonanz-Elastographie	Magnetic Resonance Elastography
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	Messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie	Magnetic Resonance Imaging
MyD88	Primäre Antwort der myeloischen Differenzierung 88	Myeloid Differentiation Primary Response 88

NF-κB	Nukleärer Faktor-Kappa-Leichtketten-Enhancer	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer
NG2	Neural/Gliales Antigen 2	Neural/Glial Antigen 2
NO	Stickstoffmonoxid	Nitric Oxide
NSC	Neurale Stammzellen	Neural Stem Cells
ol	Oligomer	Oligomeric
OPC	Oligodendrogliale Progenitorzellen, auch: Oligodendrozyten-Vorläuferzellen oder Polydendrozyten	Oligodendrocyte Progenitor Cells
PAA	Polyacrylamid	Polyacrylamide
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster	Pathogen Associated Molecular Pattern
PDMS	Polymethylsiloxan	Polymethylsiloxane
PNS	Peripheres Nervensystem	Peripheral Nervous System
PRR	Mustererkennungsrezeptor	Pattern Recognition Receptor
RM	Rückenmark	Spinal Cord
RNA	Ribonukleinsäure	Ribonucleic Acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	Reactive Oxygen Species
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor Beta	Transforming Growth Factor Beta
Th	T-Helferzellen	Helper T Cells
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor	Toll-like Receptor
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha	Tumor Necrosis Factor Alpha
VEGFα	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor alpha	Vascular Endothelial Growth Factor Alpha

VIM-/-	Vimentin-Defizienz	Vimentin-Knockout
VIM+/+	Vimentin-Wildtyp	Vimentin-Wildtype
YS	Dottersack	Yolk Sac
ZNS	Zentrales Nervensystem	Central Nervous System

1. Zusammenfassung

Über streng regulierte entzündungshemmende und -fördernde Kaskaden sind Mikroglia, als residente Immunzellen des Zentralen Nervensystems (ZNS), an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Vorgängen beteiligt. Ihre Aktivierung kann in der Folge – in Abhängigkeit etwa von den Umständen ihrer Aktivierung sowie dem zeitlichen Verlauf – sowohl Regeneration fördern, aber auch Neurodegeneration beschleunigen¹⁻⁴. Aus diesem Grund erweist sich die Beeinflussung von Mikroglia im Rahmen der neurologischen Forschung als ein mögliches therapeutisches Konzept⁵⁻⁷. Ergebnisse neuer Studien legen nahe, dass verschiedenste Zellentitäten im Gehirn nicht nur durch etwa Zytokine und Chemokine beeinflusst werden, sondern auch stark auf mechanische Eigenschaften ihrer Mikroumgebung reagieren⁸. Die Auswirkungen der Elastizität ihrer Mikroumgebung auf Mikroglia blieben bisher jedoch unerforscht und sind Gegenstand dieser Arbeit (Blaschke, Demir et al., 2020).

Unter der Hypothese, dass die elastischen Eigenschaften der Mikroumgebung Merkmale und Funktionen mikroglialer Zellen beeinflussen⁸, wurden primäre Mikroglia aus der Ratte in einem Zellkultursystem auf Basis von Polydimethylsiloxan-(PDMS-) Elastomeren kultiviert. Auf diese Weise wurden physiologische Elastizitätsmodi im Gehirn imitiert und mit supraphysiologischen, demgemäß steiferen, konventionellen Zellkulturbedingungen verglichen. Wir untersuchten die funktionellen Parameter an Mikroglia unter "Ruhe"-Bedingungen, Mikroglia, die durch Lipopolysaccharid (LPS) zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp aktiviert wurden sowie Mikroglia, die durch Interleukin-4 (IL4) zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp polarisiert worden waren (Blaschke, Demir et al., 2020).

Die Überlebensfähigkeit der Mikroglia war auf weichen Substraten nicht beeinträchtigt. Es wurde dabei auf den weichen Substraten eine auf das Zweifache erhöhte Proliferation der Mikroglia beobachtet. Darüber hinaus förderten weiche Substrate die Expression des Aktivierungsmarkers Vimentin in Mikroglia. Ferner wurde auf weicheren Substraten der Marker alternativ aktivierter Mikroglia (M2-Marker) Cluster of Differentiation 206 (Unterscheidungsgruppe 206, CD206) hochreguliert sowie parallel vermehrt der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF1) sezerniert. Die Hochregulation von CD206

konnte durch Blockade dehnungsabhängiger Chloridkanäle aufgehoben werden (Blaschke, Demir et al., 2020)s

Zusammenfassend fördert die Kultivierung von Mikroglia auf Substraten mit hirnähnlicher Elastizität über dehnungsabhängige Chloridkanäle einen anti-inflammatorischen Aktivierungszustand. Die Daten heben die allgegenwärtigen, aber meist übersehenen, mechanobiologischen Effekte hervor, die auf alle Zellentitäten des Gehirns wirken, und bilden die Basis, um die komplexen Wechselwirkungen zwischen Mikroglia, neuronalen Stammzellen und Glia in Gesundheit und Krankheit zu erschließen (Blaschke, Demir et al., 2020).

2. Einleitung

2.1 Mikroglia

Neuroglia, eine heterogene Gruppe nicht-neuronaler Zellen, deren Elemente sich in Abstammung, Morphologie, physiologischer Eigenschaft und Funktion voneinander unterscheiden⁹, machen etwa die Hälfte aller Zellen des Säugerhirns aus^{10,11}. Im Gegensatz zu den Makroglia als Abkömmling neuraler Stammzellen (neural stem cells, NSC) mit Ursprung aus dem Neuroderm, entwickeln sich Mikroglia aus Zellen des Dottersacks (Yolk Sac, YS) und sind somit mesodermalen Ursprungs¹²⁻¹⁵. Mit einem Anteil von etwa 10% an den zentralen Gliazellen und somit ungefähr 5% an allen Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS), kommen Mikroglia als residente Immunzellen ubiquitär vor¹⁶. Die ordnungsgemäße Entwicklung und Funktion des ZNS von Säugetieren hängt von ihrer Anwesenheit und Aktivität ab¹⁰.

Zunächst als verzweigte, im Gehirn ansässige Phagozyten beschrieben, belegen mannigfaltige Studien des letzten Jahrhunderts, dass die dynamische Zellpopulation der Mikroglia eine der vielseitigsten des Körpers darstellt, die die Fähigkeit besitzt, sich dem ständig verändernden intrinsischem Milieu des ZNS in Morphologie und Funktion anzupassen^{3,4}. Derweise sichern selbst als ruhend bezeichnete Mikroglia mit sich in alle Richtung erstreckenden fein verzweigten, verästelten Zellfortsätzen - als für diesen Zustand charakteristische Zellform - die zerebrale Homöostase. Als „Sensoren der Pathologie“¹⁷ sind sie ständig auf der Suche nach biochemischen und -elektrischen Veränderungen ihrer Mikroumgebung, die Störungen in der Homöostase des ZNS signalisieren und Reaktion erfordern^{3,17-20}. Im fetalen sowie postnatalen Gehirn sind amöboide Mikroglia an der Eliminierung des anfallenden, überschüssigen Zellmaterials, sowie an Wachstumsvorgängen von Neuron und Gliazelle beteiligt²¹⁻²⁷. Entscheidende Rolle nehmen sie bei der neuronalen Entwicklung und Funktion sowie der funktionellen und strukturellen Plastizität von Synapsen ein; nicht nur im ausgereiften, sondern auch im unreifen, sich entwickelnden Gehirn^{19,20,28,29}. Das Konzept der Mikroglia^{30,31} entgegnet der Diskrepanz zwischen dem Fehlen von Leukozyten im ZNS und der Fähigkeit, sich gegen Infektionen, Verletzungen und Krankheiten zu verteidigen derweise, dass die potentiell destruktive Kraft des Immunsystems und die relative Anfälligkeit des ZNS für Krankheiten in einem funktionell hybriden Zelltyp mit Eigenschaften eines

neuroprotektiven Glia-Zelltyps mit Attributen von Makrophagen und Leukozyten zusammengeführt werden ^{2,11,32-35}.

Insbesondere in den letzten Jahren wird der Zusammenhang zwischen Mikroglia und verschiedenen Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems intensiv erforscht. Die Beeinflussung lokaler Mikroglia stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung neuroinflammatorischer, aber auch neurodegenerativer Erkrankungen dar ⁵⁻⁷.

2.1.1 Einordnung in die Gruppe der Neuroglia

2.1.1.1 Überblick

Mehr als 150 Milliarden Nervenzellen, so Neurone wie auch Neuroglia - Letztere eine heterogene, nicht-neuronale Klasse von Zellen, die im peripheren, zentralen enterischen sowie autonomen Nervensystem zu finden ist - bilden in einem begrenzten Volumen von durchschnittlich 1200 bis 1400 cm³ ³⁶ ein komplexes Netzwerk, das durch 15 bis 20 Billionen chemischer und elektrischer Synapsen miteinander verbunden ist ¹⁴.

Ursprünglich als nicht-funktionales „Nervenkitt“ ³⁷⁻³⁹ verstanden, machen Gliazellen einen erheblichen Teil des ZNS von Säugetieren aus ⁴⁰. So belegen Studien die Annahme, dass die Gesamtzahl der neuronalen und nicht-neuronalen Zellen im menschlichen Gehirn, anders als zuvor angenommen, ungefähr gleich groß ist ^{41,42}. So liegen die Zellzahlen für jede Klasse im Bereich von etwa 80 bis 100 Milliarden, sodass der Glia-Neuronen-Quotient, in verschiedenen Hirnregionen stark divergierend, über das gesamte Gehirn gemittelt etwa 1:1 misst ⁴³⁻⁴⁵.

Die Gesamtpopulation der Gliazellen des ZNS kann im Wesentlichen in vier Hauptgruppen unterteilt werden; in die der (1) Mikroglia, sowie die als Makroglia bezeichnete Zellpopulation, bestehend aus (2) Astrozyten und Zellen der Oligodendrozytenlinie, zu denen neben den (3) Oligodendrozyten auch (4) oligodendrogliale Progenitorzellen, die NG2-Glia (Neural/Glial Antigen 2)-Glia gehören ^{14,40,46}. Im Gegensatz zu Makroglia als Abkömmling NSC mit Ursprung aus dem Neuroektoderm, sind Mikroglia als aus dem YS abstammende Zelllinie mesodermalen Ursprungs ¹²⁻¹⁵. Gliazellen des peripheren Nervensystems (PNS)

umfassen (1) die Schwann-Zellen, (2) Satellitengliazellen, (3) Riechhüllenzellen sowie (4) enterische Glia, die allesamt ektodermalen Ursprungs sind ¹⁴.

Obgleich Neuroglia des ZNS sich in Abstammung, Morphologie und Physiologie voneinander unterscheiden, basiert ihre Definition auf der gemeinsamen und grundlegenden Funktion dieser, die in der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Verteidigung des Nervensystems liegt. Bei Versagen dieser Fähigkeiten verursachen Neuroglia letztlich eine ganze Reihe an Pathologien des Nervensystems ^{9,14}.

Die Evolution des Nervensystems spiegelt die bemerkenswerte Rolle der Neuroglia auf allen Organisationsebenen des Nervensystems kraft einer Arbeitsteilung unter den ansässigen Zellen wider. Dieserart bleibt die Informationsverarbeitung und die elektrische Erregbarkeit auf neuronale Netze, die homöostatische Unterstützung und die Verteidigung auf neurogliale Zellen beschränkt ^{14,47}.

So erfüllen Neuroglia Aufgaben, die auf

- (i) **molekularer Ebene** der Kontrolle der Homöostase von Ionen, Neurotransmittern, Protonen, reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) sowie Metaboliten dienen;
- (ii) auf **zellulärer Ebene** beteiligen Astrozyten sich an der Neurogenese, der Bildung von Nervenzellen aus Vorläufer- oder Stammzellen;
- (iii) auf **Netzwerkebene**, sowohl astroglial als auch mikroglial reguliert, an der Synaptogenese und der synaptischen Reifung und
- (iv) dienen mittels myelinisierender Oligodendroglia und Schwann-Zellen der Aufrechterhaltung der **Ebene des Konnektoms**.
- (v) Auf **Organebene** kontrollieren sie die Blut-Hirn-Schranke (Blood Brain Barrier, BBB), den glymphatischen Fluss und regulieren die funktionelle Hyperämie,
- (vi) auf **systemischer Ebene** treten Gliazellen als zentrale Chemorezeptoren auf und tragen auf diese Weise zur systemischen Kontrolle von Ventilation, Ionenhomöostase und Energiestoffwechsel bei ¹⁴.

Derweise erfordert das reibungslose Funktionieren des Gehirns von Säugetieren eine dynamische Interaktionen zwischen Neuron und Gliazelle ⁴⁸. Letztere ist anfällig

für morpho-funktionelle Veränderungen bei einer Vielzahl von pathologischen Zuständen des Gehirns, einschließlich Toxizität, neurodegenerativen und psychiatrischen Störungen, welche eine gliale homöostatische Reaktion auslösen. Diese stellt ein evolutionär konserviertes Programm der Gliazellen dar, das auf die Verteidigung des Nervengewebes abzielt und sich äußert in reaktiver Astroglieose⁴⁹⁻⁵⁶, Mikrogliaaktivierung und Wallerscher Degeneration^{48,57,58}.

2.1.1.2 Einteilung der Neuroglia

Grundsätzlich werden Neuroglia des Nervensystems von Säugetieren in Glia des peripheren und die des zentralen Nervensystems unterteilt.

2.1.1.2.1 Neuroglia des peripheren Nervensystems

Die Gliazellen des PNS können im Wesentlichen in vier Subgruppen unterteilt werden.

(i) Schwann-Zellen

Schwann-Zellen sind mit sensorisch, motorisch, sympathisch und parasymphatischen Axonen assoziiert^{14,59}.

(a) Myelinisierende Schwann-Zellen

Myelinisierende Schwann-Zellen werden über extrinsische Signale von Axon und extrazellulärer Matrix (Extracellular Matrix, ECM) dazu veranlasst, myelinisierende Eigenschaften anzunehmen. Die Myelinisierung reorganisiert das Axon für seine Rolle bei der Reizleitung durch die Sicherung einer schnellen Ausbreitung von Aktionspotentialen durch die saltatorische Erregungsleitung und ist für seine Integrität unerlässlich⁶⁰.

(b) Nicht-myelinisierende (Remak-)Schwann-Zellen

Remak-Schwann-Zellen produzieren kein Myelin, sind aber für die normale Entwicklung und Funktion des PNS erforderlich und wesentlich für die Erhaltung der Axone sowie das Überleben der Neurone^{14,59,61}.

(c) *Perisynaptische Schwann-Zellen (auch: terminale Schwann-Zellen)*

Perisynaptische Schwann-Zellen umhüllen als Teil der „Tripartite Synapse“ („dreiteilige Synapse“, bestehend aus der prä-, der postsynaptischen Nervenendigung und der nicht-myelinisierenden perisynaptischen Schwann-Zelle)⁶²⁻⁶⁶ periphere Synapsen und erhalten die perisynaptische Homöostase^{14,59}.

(ii) **Satellitengliazellen**

Satellitengliazellen umgeben neuronale Zellkörper in sensorischen, sympathischen und parasympathischen Ganglien; aufgrund ihrer einzigartigen Lage vermögen sie die nozizeptive Empfindung stark zu beeinflussen⁶⁷. Sie kontrollieren die lokale Homöostase und transformieren auf pathologische Zustände hin reaktiv^{14,68,69}.

(iii) **Riechhüllenzellen**

Riechhüllenzellen sind spezialisierte Gliazellen des Geruchssystems. Als solche befinden sie sich in der Riechschleimhaut, den Riechnerven und im Riechkolben und formen feinste Fortsätze, die eine große Anzahl an Riechaxonen nicht-myelinisierend umschließen⁷⁰.

(iv) **Enterische Glia**

Enterische Glia stellen die homöostatischen Gliazellen des enterischen Nervensystems dar und regulieren über vielfältige bidirektionale Wechselwirkungen mit Neuronen und anderen nicht-neuronalen Zelltypen der Darmwand (Enterozyten, enteroendokrinen Zellen und Immunzellen) eine Vielzahl gastrointestinaler Funktionen^{71,72}.

2.1.1.2.2 Neuroglia des zentralen Nervensystems

Aufgrund ihres Entwicklungsursprungs werden die Neuroglia (abgeleitet aus dem altgriechischen „γλία“/„glía“ für „Leim“⁷³) des ZNS in Makro- und Mikroglia klassifiziert^{14,40}.

Die Makroglia werden weiter unterteilt in folgende Subgruppen:

(i) **Astroglia (auch: Astrozyten)**

Astrozyten (aus dem Griechischen „άστρον“/„ástron“ für „Stern“⁷⁴ und „κύτος“/„kýtos“ für „Zelle“/„Wölbung“⁷⁵) stellen eine in ihrer Morphologie, ihrem Entwicklungsursprung, ihrem Genexpressionsprofil, ihren physiologischen Eigenschaften, ihrer Funktion und ihrer Reaktion auf Verletzungen und Krankheiten⁷⁶ heterogene Population homöostatischer Glia dar und besiedeln die graue wie die weiße Substanz des gesamten Gehirns und Rückenmarks (RM)^{9,47,77}. Die Reifung der Astrozyten in regional definierte Untergruppen mit einem hohen Grad an funktioneller Spezialisierung bildet die Basis für ihre vielfältigen Aufgaben im physiologischen wie auch im pathologisch veränderten Nervensystem⁷⁸⁻⁸⁰. So sind Astrozyten Gliazellen mit adaptiver Plastizität, die der funktionellen Aufrechterhaltung des ZNS während der Entwicklung und im Alter durch engste Integration in neuronale Netzwerke dienen und auf diese Weise auf allen Organisationsebenen die Homöostase des ZNS kontrollieren^{14,47,77}.

(a) *Protoplasmatische Astrozyten*

Protoplasmatische Astrozyten erscheinen in der kortikal-grauen Substanz relativ gleichmäßig verteilt. Mit ihren stark verzweigten Fortsätzen von etwa 50 µm Länge, mit denen sie die gliale Grenzmembran bildend Blutgefäße umhüllen, sichern sie die äußerste Wand der BBB und stehen in Kontakt mit Neuronen sowie über subpiale Endfüße mit der pialen Oberfläche⁸¹⁻⁸³.

(b) *Fibröse Astrozyten*

Fibröse Astrozyten sind entlang der Bahnen der weißen Substanz sowie in der retinalen Nervenfaserschicht von Säugetieren organisiert, in denen sie in der Ebene der Faserbündel longitudinal ausgerichtet sind. Mit ihren Fortsätzen, welche bis zu 300 µm messen, sind sie im Vergleich zu protoplasmatischen Astroglia weniger stark verzweigt und bilden perivaskuläre sowie subpiale Endfüße; über perinodale Fortsätze treten sie mit Axonen an den Ranvier-Schnürringen in Kontakt⁸¹⁻⁸³.

(c) *Oberflächenassoziierte Astrozyten*

Oberflächenassoziierte Astrozyten sind mit der Oberfläche im posterioren, präfrontalen und amygdaloiden Kortex assoziiert. Die

Somata dieser Zellen befinden sich an der kortikalen Oberfläche und senden zwei Fortsätze aus, von denen Einer in die Lamina molecularis absteigt und der Andere sich bis zur Umgebung der Pialgefäße erstreckt^{77,84}.

(d) *Velate Astrozyten*

Velate Astrozyten sind lokalisiert in den Teilen des Gehirns, die dicht mit kleinen Neuronen bepackt sind; so umgeben sie periglomeruläre Zellen im Riechkolben oder umhüllen Körnerzellen im Stratum granulosum der Kleinhirnrinde^{14,81,83,85}.

(e) *Radiale Glia*

Radiale Glia sind bereits in frühesten Stadien der ZNS-Entwicklung über die gesamte Ausdehnung des Neuralrohrs zu finden und galten lange Zeit als Endprodukte der neuronalen Differenzierung, als spezialisierte Stützzellen für die Zellmigration, deren Ursprung sich von dem der Neuronen stark unterscheidet. Jüngsten Studien zufolge dienen radiale Glia Neuronen sowie Glia in der Entwicklung als primäre Vorläuferzellen oder NSC; dies sowohl während der Entwicklung als auch als Reaktion auf Verletzungen, zur Steuerung des Wachstums von axonalen und dendritischen Prozessen und zur Regulierung der synaptischen Entwicklung und Funktion. Hinzukommend beteiligen sich radiale Glia an einer umfangreichen Signalübertragung sowohl mit Neuronen als auch untereinander^{14,77,86-89}.

(f) *Radiale Astrozyten (auch: adulte radiale Glia, radiale gliaähnliche Zellen)*

Das Vorkommen echter primärer radialer Gliazellen beschränkt sich auf das sich entwickelnde Gehirn. Zu den radialen Astrozyten zählen die Bergmann-Glia im Kleinhirn, Müller-Glia der Netzhaut, radiale gliaähnliche NSC der neurogenen Nischen, Tanyzyten des Hypothalamus, der Hypophyse und des Raphe-Teils des RMs, und die Pituizyten der Neurohypophyse^{14,81}.

(g) *Gomori-Astrozyten*

Gomori-Astrozyten sind Glia des Hypothalamus und Hippocampus; sie weisen einen hohen Eisengehalt mit positiver Gomori-Chrom-Alaun-

Hämatoxylin-Färbung auf. Vermutungen zufolge sind sie beteiligt an der Häm-Versorgung von Neuronen für die Synthese hämhaltiger Enzyme^{14,77,90}.

(h) Perivaskuläre und marginale Astrozyten

Perivaskuläre Astrozyten befinden sich in der Nähe zur Pia Mater, wo sie mit Blutgefäßen Endfüße bilden. Sie stellen in der Regel keine Kontakte zu Neuronen her; ihre Hauptfunktion besteht darin, piale und perivaskuläre Glia limitans-Schranken zu errichten^{14,77,91}.

(i) Ependymozyten, Zellen des Plexus choroideus und retinale Pigmentepithelzellen

Ependymozyten (aus dem Griechischen „ἐπένδυμα“/“epénduma“ für „Oberkleid“⁹²) kleiden das Ventrikelsystem des Gehirns und den zentralen Kanal des RMs aus. Mit ihren Mikrovilli und Kinozilien erzeugen sie durch rhythmische Bewegungen einen Strom durch Zellen des Plexus choroideus produzierter Zerebrospinalflüssigkeit^{77,93}. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Homöostase der Zerebrospinalflüssigkeit und der Beseitigung von Abfallstoffen aus dem ZNS^{14,77}. Retinale Pigmentepithelzellen säumen den subretinalen Raum^{83,94}.

(j) Spezialisierte Astrozyten

Darüber hinaus enthält das Gehirn höherer Primaten diverse Subklassen spezialisierter Astrozyten, zu denen neben den interlaminaeren Astrozyten, welche obere kortikale Schichten besiedeln und lange Fortsätze in tiefere Schichten des Kortex senden^{77,95}, auch die polarisierten Astrozyten, dessen Somata sich in den tiefen Kortikalschichten in unmittelbarer Nähe der weißen Substanz befinden und Fortsätze in die oberflächlichen Kortexschichten senden^{77,96} sowie die varikösen Projektionsastrozyten, welche sich durch sehr lange unverzweigte mit Varikositäten besetzten Fortsätzen in alle Richtungen durch die tiefen Kortikalschichten erstrecken, gehören^{77,96}. Die Funktion dieser hominoiden Astrozyten ist weitestgehend unbekannt^{14,77,82,97}.

(ii) Oligodendroglia (auch: Oligodendrozyten)

Oligodendroglia bilden die isolierende Myelinscheide, die eine schnelle elektrische Leitung axonaler Aktionspotentiale ermöglicht. Anders als ihr peripheres Pendant, die Schwann-Zelle, kann ein einziger Oligodendrozyt mehrere Myelinabschnitte auf mehreren Axonen bilden. Oligodendrozyten üben entscheidende Funktionen für die zelluläre Ionen- und Wasserhomöostase sowie den Stoffwechsel aus, die für die Aufrechterhaltung von Myelin- und Axonintegrität unerlässlich sind. So sind die Funktion der Oligodendrozyten und die Myelinisierung nicht nur für eine schnelle axonale Leitung von wesentlicher Bedeutung, sondern auch für das Lernen und die langfristige Integrität von Axon und Neuron ^{9,14,98,99}.

(a) Oligodendrozyten vom Typ I

Diese besetzen mit ihren kleinen Somata und feinen Verzweigungen, welche Axone mit kleinem Durchmesser in unterschiedlichen Ausrichtungen myelinisieren, die Hirnrinde sowie graue Substanz des RMs ^{9,14,100}.

(b) Oligodendrozyten vom Typ II

Diese Subgruppe ähnelt den Oligodendrozyten des Typ I; myelinisierte Segmente verlaufen jedoch parallel zueinander. Sie myelinisieren Internodien mittlerer Länge und finden sich vorrangig in der weißen Substanz ^{14,100}.

(c) Oligodendrozyten vom Typ III

Diese haben größere, unregelmäßige Zellkörper mit dicken Primärfortsätzen, die eine kleine Anzahl von Axonen mit großem Durchmesser myelinisieren. Sie sind im Kleinhirn, in der Medulla oblongata und in den Funiculi des RMs zu finden ^{14,100}.

(d) Oligodendrozyten des Typs IV

Typ IV-Oligodendrozyten ähneln den Schwann-Zellen sehr stark. Sie sind mit Axonen großen Durchmessers assoziiert, bilden eine einzelne lange internodale Myelinscheide und sind zu finden in der Nähe des Eintritts und Austritts von Nervenwurzeln in das ZNS ^{14,100}.

(iii) NG2-Glia (auch: Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, Oligodendrocyte Progenitor Cells (OPCs))

NG2-Glia stellen eine heterogene Population dar und besitzen das Potential in verschiedenen Hirnregionen, Entwicklungsstadien und unter pathologischen sowie physiologischen Bedingungen, neben Oligodendrozyten auch Astrozyten als Vorläufer dienen zu können¹⁰¹⁻¹⁰³ oder als selbsterneuernde NG2-Glia bestehen zu bleiben^{103,104}. Ein funktionell relevantes Charakteristikum der NG2-Glia ist ihr Vorkommen in sowohl in der grauen als auch der weißen Substanz während der gesamten postnatalen Entwicklung und bis in das Erwachsenenalter¹⁰⁵. NG2-Glia stellen im postnatalen und adulten Gehirn die größte Population endogen-ansässiger Vorläuferzellen dar, als solche sie in der Lage sind, auf multiple Arten von Verletzung mit dem Potential, läsionsgeschädigte Bereiche des ZNS neu zu besiedeln, zu reagieren^{103,104,106-108}. Einige Studien beschrieben auch Mikroglia-ähnliche Eigenschaften von NG2-Glia¹⁰⁹.

Die Mikroglia bilden die letzte Hauptgruppe der Gliazellen des ZNS. Sie entstehen aus fötalen Makrophagen, die schon sehr früh in der Embryonalentwicklung in das Neuralrohr einwandern; so sind sie wohl die ersten parenchymatösen Glia, die das Nervengewebe in der Entwicklung besiedeln¹²⁻¹⁴. Sie haben zahlreiche physiologische Funktionen, darunter die Gestaltung der neuronalen synaptischen Konnektivität, die Beseitigung von überflüssigen oder apoptotischen Neuronen in der Entwicklung und die Regulierung der synaptischen Übertragung^{28,110,111}. Mikroglia bilden das Hauptabwehrsystem des ZNS durch ein evolutionär konserviertes Aktivierungsprogramm, das zahlreiche neuroprotektive und neurotoxische Phänotypen hervorbringen kann^{11,19,32-35,112,113}. Eine weitere Charakterisierung mikroglialer Zellen erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln.

Die zahlenmäßig größte Gliapopulation stellt die Oligodendrozytenlinie mit einem Anteil von 40 bis 60 % dar. Astrozyten machen etwa 20 bis 40 % und Mikroglia etwa 10 % der Neuroglia-Population aus. Zu beachten ist, dass es eine beträchtliche Variabilität zwischen den Hirnregionen, Entwicklungsstadien und Spezies gibt^{10,11,14,43,44,114,115}.

2.1.2 Einordnung in die Gruppe des Mononukleären Phagozyten-Systems

1908 erhielten der russische Immunologe Ilya Iljitsch Metschnikow und der deutsche Mediziner Paul Ehrlich den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Arbeiten zur Phagozytose (aus dem Griechischen „φαγεῖν“/„phagein“ für „essen“¹¹⁶ und „κύτος“/„kýtos“ für „Zelle“/„Wölbung“⁷⁵)¹¹⁷. Metschnikow und Ehrlich unterteilten phagozytierende Zellen in (1) die Mikrophagen, kleine Zellen mit polymorphem Kern, die wir heute als Granulozyten bezeichnen, und (2) die Makrophagen, die großen Phagozyten, und verwiesen bereits auf ihre Bedeutung bei der Abwehr von Keimen. Schließlich fasste Meschnikow phagozytierende Zellen des Knochenmarks, der Milz und des Bindegewebes unter dem Begriff „Makrophagen-System“ zusammen¹¹⁸.

Durch den deutschen Pathologen Karl Albrecht Ludwig Asschoff erweitert zum „Retikulo-endothelialen System“ und daraufhin zum „Retikulo-histozytärem System“, umfasste dieses historisch neben retikulären Zellen der Milz und der Lymphknoten auch endotheliale Zellen, Monozyten und Histiozyten als mobile Makrophagen. Aschoff schloss alle Zellen ein, die sich mit einem Farbstoff, von dem man vermutete, dass er die phagozytische Aktivität misst, färben ließen; einige Zellen mit geringer Phagozytoseaktivität, wie z. B. Endothelzellen, ließen sich jedoch aufgrund ihrer Fähigkeit zur Pinozytose ebenfalls positiv färben und wurden daher falsch kategorisiert¹¹⁹.

Aus diesem Grund wurde 1969 eine neue Klassifikation eingeführt, die nur hochgradig phagozytisch-aktive Zellen sowie ihre Vorläufer einschloss und heute noch als „Mononukleäres Phagozyten-System“ (MPS) bezeichnet wird^{120,121}. Die Gruppe des MPS umfasst heute eine breite Gruppe mononukleärer Zellen; so zirkulierende Monozyten im Blutstrom, dendritische Zellen in sekundär-lymphatischen Organen und Gewebsmakrophagen¹²⁰, als solche sie ansässig sind in lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben, so als Mikroglia und ZNS-assoziierten Makrophagen und im Gehirn, als Kupffer-Zellen in der Leber, als Langerhans-Zellen in der Haut, als Alveolarmakrophagen in der Lunge, als Ostoklasten im Knochen sowie als Nierenmakrophage in der Niere¹²²⁻¹²⁵. Als an der Homöostase des Gewebes beteiligte Zellen beseitigen Makrophagen apoptotische Zellen und produzieren Wachstumsfaktoren. Daher sind Makrophagen mit einer breiten Palette von Rezeptoren zur Erkennung von Krankheitserregern ausgestattet,

die sie zur Phagozytose befähigen und die Produktion von entzündlichen Zytokinen anregen ^{125,126}. Die gemeinsamen Vorläufer stammen aus der myeloischen Reihe der Knochenmarkszellen: Aus einer gemeinsamen Stammzelle, dem Myeloblasten, heute als Koloniebildende Einheit - Granulozyten-Monozyten („colony forming unit - granulocyte-monocyte“) bezeichnet, entwickeln sich sowohl Granulozyten als auch die mononukleären Phagozyten ^{127,128}, nicht hingegen die Mikroglia (Siehe Kapitel 3.1.3. - „Herkunft und Abstammung“).

Für das ZNS wurde lange Zeit ein Immunprivileg angenommen, basierend auf dem Fehlen eines Lymphabflusssystems nach Beispiel der Peripherie und der Überlegung, dass die Kapazitäten zur Antigenpräsentation im ZNS der Peripherie unterlegen seien ¹²⁹. Tatsächlich verfügt das ZNS über eine immunologische Kapazität, die sich von den meisten peripheren Geweben unterscheidet, weiß man inzwischen doch, dass das Gewebe des ZNS durchaus bei Bedarf Immunreaktionen auslösen kann. So besitzt das ZNS zwei große, zueinander inkongruente ansässige Populationen aus der Gruppe des MPS; auf der einen Seite die Mikroglia, auf der anderen Seite die ZNS-assoziierten Makrophagen (CNS-Associated Macrophages, CAMs; auch: Grenzenassoziierte Makrophagen, Border-Associated Macrophages) ¹²²⁻¹²⁴, welche an den nicht-parenchymalen ZNS-Grenzflächen wie dem perivaskulären Raum, den Hirnhäuten und dem Plexus choroideus lokalisiert sind und aus der Peripherie in das ZNS einwandern ¹³⁰⁻¹³². Zwei bemerkenswerte Eigenschaften, die Mikroglia und CAMs gemeinsam haben, sind ihre Zugehörigkeit zum MPS sowie ihre Langlebigkeit. In der Tat hat sich für Mikroglia gezeigt, dass sie viele Merkmale in Expressionsmuster und Funktion mit klassisch-myeloischen Zellen im Körper teilen ^{133,134}; vor allem bewachen sie als Teil des MPS ihr Territorium, phagozytieren Krankheitserreger und produzieren eine Reihe von entzündungsfördernden und -hemmenden Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Das Expressionmuster hängt jeweils von dem Reiz ab, der zu ihrer Aktivierung geführt hat, weist aber auch spezifische ontogenetische, molekulare, funktionelle Unterschiede und Besonderheiten im Vergleich zu myeloischen, peripheren Makrophagen auf, so dass Mikroglia folglich nicht uneingeschränkt als Kongruent zu Zellpopulationen des MPS zu sehen sind ^{135,136}. Jüngste Studien erlauben eine klare Unterscheidung zwischen Mikroglia und CAM durch ihren unterschiedlichen transkriptomischen Charakter, wobei für jeden Zelltyp molekulare Marker festgelegt wurden, was auf distinkte Zellpopulationen mit zueinander differenten Transkriptionsprofilen und potenziell unterschiedlichen Funktionen in (Patho-)Physiologie hinweist ¹¹⁵.

2.1.3 Herkunft und Abstammung

Die Besiedlung des ZNS durch Mikrogliazellen findet noch vor der Bildung der aus dem Neuroektoderm stammenden Gliazelltypen statt ^{111,137-139} und ist evolutionär über alle Wirbeltierarten hinweg konserviert. So sind Schlüsselmerkmale der Mikroglia-Ontogenese bei Vertebraten erhalten geblieben und bei Mensch, Maus, Ratte, Huhn recht ähnlich ^{111,140-143}. In multiplen Studien, in denen Instrumente des genetischen Fate Mapping eingesetzt wurden, zeigte sich, dass Mikroglia hauptsächlich aus primitiven Makrophagen aus dem YS hervorgehen ^{10-13,15,57,136}, lebenslang im Gehirn verbleiben und ihre Anzahl durch einen Prozess der Selbsterneuerung aufrechterhalten ^{111,144,145}. Die mikrogliale Mitose im normalen ZNS erfolgt bei einem sehr geringen Umsatz und einer langen Lebensdauer der Zellen ¹⁴⁴; die menschliche Mikroglia-Population erneuert sich mit einer Rate von etwa 28 % pro Jahr, wonach eine Mikrogliazelle etwa 4,2 Jahre alt ist ¹⁴⁶, obgleich einige Zellen ein Alter über 20 Jahre erreichen können ¹⁴⁷.

Zellen, die am treffendsten als "fetale Makrophagen" ¹⁴⁸ beschrieben werden können, besiedeln das sich entwickelnde Neuroektoderm bei Nagetieren bereits acht Tage nach der Konzeption (days post conceptionem, dpc); beim Menschen spät im ersten Trimester ^{12,15,149}. Bereits vor der Vaskularisierung ¹⁵⁰ und vor der Entstehung der hämatopoetischen Stammzellen um zehneinhalb dpc aus den ventralen aortalen hämatogenen Endothelzellen im Aorten-Gonaden-Mesonephros ^{151,152}, können fetale Makrophagen im primitiven Neuroektoderm nachgewiesen werden, was die Möglichkeit ausschließt, dass hämatopoetische Stammzellen aus der Leber oder dem Knochenmark als direkte Mikroglia-Vorläufer dienen ^{125,149,153}. Wahrscheinlich hingegen scheint, dass die aus dem YS stammenden fetalen Makrophagen direkte Vorläufer der Mikroglia sind, während die peripheren Blutmonozyten aus dem Knochenmark stammen ¹⁵⁴. Von den im Mausembryo an achteinhalb dpc nur in sehr weniger Anzahl vorhandenen fetalen Makrophagen, befinden sich die meisten dieser im Mesenchym des Kopfes und des Halses. Es wird angenommen, dass diese Mikrogliazellen durch die Basalmembran der pialen Oberfläche der Hirnhaut in das Mesenchym eindringen und anschließend vom Mesenchym durch die Basalmembran des Neuroepithels in Richtung Ventrikel wandern. Im Neuroepithel angekommen, proliferieren sie schnell und kolonisieren das Gehirn von dorsal nach ventral und von rostral nach kaudal ¹⁴². Innerhalb der folgenden Stunden dringen die

Mikroglia tiefer in das sich entwickelnde Parenchym ein und beginnen sich zu differenzieren und zu verzweigen. Schließlich exprimieren sie Marker reifer Mikroglia, wodurch sie Merkmale der unreifen Makrophagen verlieren ¹⁴¹. Im Embryonalstadium dreizehneinhalb dpc können mikrogliale Vorläufer in signifikanter Anzahl in der Ventrikelauskleidung des zu diesem Zeitpunkt bestehenden fünften Ventrikels nachgewiesen werden ¹⁵³. Obwohl Mikroglia überall im Gehirn zu finden sind, sind sie während der Entwicklung nicht gleichmäßig verteilt, sondern neigen dazu, sich bevorzugt an bestimmten Stellen aufzuhalten; sie finden sich daher bevorzugt (1) in Bereichen mit erhöhter neuronaler Apoptose, (2) in der Nähe sprossender Gefäße, (3) in enger Beziehung zu radialen Glia und schließlich (4) in der Randschicht, die sich entwickelnde Axonbündel enthält ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Im perinatalen Stadium durchlaufen fetale Makrophagen, ebenso wie die neuronalen Zellreihen, die Zellreifung und -differenzierung. Sie verlassen den rundlich-amöboiden Zellhabitus und nehmen ein Zwischenstadium der Differenzierung ein, welche charakterisiert ist durch noch nicht zu vollständig verzweigter Morphologie gereifter Mikroglia ^{110,125}.

Im postnatalen ZNS durchlaufen diese Mikroglia innerhalb prominenter supraventrikulärer Cluster, sogenannter "Mikroglia-Fontänen" („Fountains of Microglia“) die Mitose ¹¹⁰. Die in den ersten beiden postnatalen Wochen persistierenden Mikroglia-Vorläuferzellen wandern in die überliegende Großhirnrinde ein und differenzieren zu vollständig verzweigten, reifen Mikroglia. Nach der dritten postnatalen Woche sind Vorläuferzellen nicht mehr nachweisbar; zu diesem Zeitpunkt ist die Differenzierung der amöboiden Zellen in verzweigte Mikroglia abgeschlossen ¹²⁵. Nach der Reifung bieten exogene Quellen, wie etwa das Knochenmark, ein allenfalls spärliches Reservoir für den Ersatz von Mikroglia ¹⁵⁸.

2.1.4 Historische Betrachtung

Das Konzept der Neuroglia als bindegewebige „Zwischenmasse“ ³⁷ des Nervensystems entstand im neunzehnten Jahrhundert ^{159,160} und wurde zunächst durch den deutschen Arzt und pathologischen Anatom, Rudolf Virchow, formalisiert, der den Begriff „Glia“ in seinem eigenen Kommentar zu seiner früheren Arbeit „Ueber das granuli(e)nte Ansehen der Wandungen der Gehirnentrikel“ 1856 prägt ³⁷. In

diesem beschreibt er Neuroglia als die „Bindesubstanz“, welche „in dem Gehirn, dem Rückenmark und den höheren Sinnesnerven eine Art von Kitt (Neuroglia), in welche die nervösen Elemente eingesenkt sind...“ bildeten³⁷⁻³⁹, erkennt er doch „...dass sie in ihrer ganzen Erscheinung eine von den übrigen Bindegewebsbildungen verschiedene Masse repräsentiert...“ in „Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre“³⁸, der Veröffentlichung von nahezu unbearbeiteter Stenographien seiner 20 Vorlesungen an der Charité in Berlin, welche zu den einflussreichsten pathophysiologischen Abhandlungen des 19. Jahrhunderts gehört. Auf dieser fußen im späten neunzehnten Jahrhundert die intensive Auseinandersetzung mit der Charakterisierung der Glia unter Beachtung ihrer zellulären Natur mit zahlreichen Theorien zur ihrer funktionellen Rolle im physiologischen Gehirn, so etwa bei der Homöostase, der Nahrungsversorgung, der Regulierung des Blutflusses, des Schlafs und Bewusstseins sowie ihrer neuropathologischen Bedeutung^{95,159,161-164}.

Angeregt durch den ungarisch-österreichischen Anatom, Mihály von Lenhossék, führte die Bezeichnung einer Unterpopulation der parenchymatösen Glia als Astrozyten in der Folge zu einer weiteren Unterteilung dieser in den Astrocytus protoplasmaticus (auch protoplasmatischer Astrozyt oder zytoplasmareicher „Kurzstrahler“) mit Vorkommen überwiegend in der grauen und den Astrocytus fibrosus (auch Faserglia, fibröser Astrozyt oder nach ihren langen Fibrillen benannt auch „Langstrahler“) in der weißen Substanz^{95,165-167}.

Myelinisierende Zellen des ZNS, erstmals beobachtet und zeichnerisch dokumentiert durch den schottischen Pathologen William Ford Robertson¹⁶⁸⁻¹⁷⁰, wurden später durch Pío del Río-Hortega, dessen Beiträge, nach der Formulierung der „Neuron Doctrine“ („Neuronenlehre“ oder „Neuronendoktrin“) 1888 durch Ramón y Cajal¹⁷¹, maßgeblich zu unserem Verständnis der mikroskopischen Anatomie des Nervensystems beitrug, als Oligodendrozyten bezeichnet und ihnen ihre myelinisierende Eigenschaft zugewiesen^{172,173}. Deren Progenitorzellen, die NG2-Glia, wurden schließlich 1981 durch William Stallcup, Joel Levine und Akiko Nishiyama entdeckt, nachdem diese einen Antikörper gegen ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan, ein Marker für verschiedene Arten von unvollständig ausdifferenzierten Vorläuferzellen, mit der Bezeichnung NG2 entwickelt hatten^{46,174}.

In den ersten Jahrzehnten des zwanzigsten Jahrhunderts war Nicolás Achúcarro, Schüler Ramón y Cajals, einer der ersten Forscher, der die Gehirnzellen, die wir heute als Mikroglia kennen, sichtbar machte. Später konnte wiederum sein Schüler, Pío del Río-Hortega, Modifikationen von Achúcarros Methoden zur Beobachtung morphologischer Feinheiten der Mikroglia einsetzen ¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Die Erkenntnisse widersprachen Cajals Ansichten über Zellen, die er der gleichen Klasse wie die Oligodendroglia zuordnete, dem „el tercer elemento“ („das dritte Element“; nach Neuronen und Astrozyten) ^{175,179-181}, was zu einer lang anhaltenden Debatte führte ¹⁷⁸. Erst 1924, und damit 75 Jahre nach Formalisierung der Neuroglia durch Virchow ^{37,38}, setzten sich die Beobachtungen von Río-Hortega weltweit durch, so dass die Mikroglia, sich dinstinkt von Oligodendrozyten unterscheidend, als eigener Zelltyp anerkannt wurden ^{178,182}. So war es Del Río-Hortega, der eine erste systematische Untersuchung der Mikroglia lieferte, die zu den Annahmen führten, dass mikrogliale Zellen nicht-neuroektodermalen Ursprungs sind, als amöboide Zellen während der frühen Entwicklung unter Nutzung von Leitstrukturen, wie Gefäßen und Bahnen der weißen Substanz, in das Gehirn einwandern, um sich im reifen Gehirn in ramifizierte, ruhende Mikroglia zu verwandeln und als solche das gesamte zentrale Nervensystem besiedelten, wobei jede Zelle ein definiertes Areal besetzt. Er erkannte, dass diese als Verteidigungselement des ZNS auf pathologische Ereignisse mit einer Transformation zu Zellen amöboider Morphologie reagierten, mit dem Potential zur Migration, Proliferation und Phagozytose ¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Auch der deutsche Histologe und Anatom, Carl Frommann, beschrieb die Wandlung der Zellmorphologie im Prozess der Transformation in „Untersuchungen über die Gewebsveränderung bei der Multiplen Sklerose des Gehirns und Rückenmarks“ 1878 ¹⁸³ und dokumentierte, dass die Zellsomata transformierter Mikroglia an Größe gewannen, ihre Zellfortsätze sich verkürzten und weniger zahlreich wurden, diese gleichzeitig in den „Epizentren von Läsionen“ ¹⁸³, in der sogenannten „Heerdsubstanz“ ^{110,183}, an Dichte gewannen und einige der Gliazellen in diesen Epizentren granulierte Somata mit Einschlüssen aufwiesen ¹¹⁰. Trotz komparativ begrenzter Mikroskopietechniken gelang es Del Río-Hortega, Achúcarro sowie Frommann, aus der Beobachtung fixierter Gewebe wichtige Postulate über die Natur, die strukturelle Plastizität sowie Motilität der Mikroglia und über ihr Potential zur Phagozytose neuronaler Trümmer zu publizieren, die auch heute noch gültig sind ^{110,178}.

2.1.5 Funktion

Daten aus Transkriptions- und Epigenomstudien zufolge, können Mikroglia in drei Stadien mit unterschiedlichen Genexpressions- und Funktionsprofilen eingeteilt werden: (1) früh, (2) prä-adult und (3) adult¹⁸⁴. Im adulten, reifen ZNS wiederum können Mikroglia mindestens vier zueinander abgrenzbare Zustände einnehmen. (1) „Ruhende“, ramifizierte Mikroglia lassen sich durch ubiquitäres Vorkommen im physiologischen ZNS charakterisieren. Wie auch (2) phagozytäre Mikroglia, die als abgerundete Hirnmakrophagen imponieren, sind (3) aktivierte (auch „reaktive“) Mikroglia, in pathologischem Geschehen anzutreffen, aber nicht obligat phagozytär aktiv. Von diesen sind die (4) dystrophen, seneszenten Mikroglia abzugrenzen^{2,185-187}.

Da Mikroglia vom embryonalen Gehirn bis ins Erwachsenenalter fortbestehen, treffen sie im Laufe ihres Lebens wahrscheinlich auf sehr unterschiedliche Umgebungen und sind mit unterschiedlichen funktionellen Anforderungen konfrontiert, mit einem sich entwickelnden gegenüber einem erwachsenen "ruhenden" Gewebe^{124,188}.

2.1.5.1 Aufrechterhaltung der Homöostase

Eine Beobachtung der Position mikroglialer Somata in-vivo belegt, dass die Zellkörper in der Regel stationär verbleiben, nur etwa 5% aller mikroglialen Zellen ändern ihre Soma-Position minimal um ein bis zwei Mikrometer pro Stunde^{3,189}. Im Gegensatz zu den Somata erscheinen mikrogliale Prozesse jedoch durch Wachstum und Retraktion der Zellfortsätze sowie den filopodienartigen Membranaustülpungen entlang der Prozesse, sich auf einer Zeitskala von Minuten ereignend, beweglich. Obwohl die morphologischen Veränderungen aleatorisch erscheinen, ist die Gesamtbeweglichkeit so rapide und fortwährend, dass jeder Punkt im Umfeld einer einzelnen Mikrogliazelle etwa drei- bis viermal während eines Tages abgetastet wird ohne die jeweils benachbarten Grenzzonen zu überschreiten²⁵. Die auf dieser Weise agierenden, residenten Mikroglia des gesunden, ungestörten Gehirns werden als "ruhend" bezeichnet, sind sie doch die dynamischsten Zellen des ZNS und erfüllen durch die rege, anhaltende Motilität Housekeeping-Funktionen wie die Beseitigung von Zelltrümmern oder toxischen Stoffwechselprodukten. Ausgestattet mit

zahlreichen Transmittern, Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptoren sind Mikrogliazellen befähigt, die Aktivitäten benachbarter Zellen kontinuierlich zu überwachen und die Mikroumgebung effektiv zu kontrollieren ^{1,2}.

Ferner sind Mikroglia als phagozytisch-aktive Zellentität in der Lage, das Parenchym durch Aufnahme von akkumulierten Stoffwechselprodukten und geschädigten Gewebebestandteilen in ihre Membranausstülpungen, die im mikroglialen Zellkörper weiterverarbeitet werden, zu bereinigen ¹⁹⁰. Studien belegen, dass das Eintreffen der Mikroglia im Gehirn während der Entwicklung mit dem Vorhandensein apoptotischer Zellen korreliert ¹⁹¹⁻¹⁹³. So scheint eine Assoziation zu bestehen zwischen Mikroglia und Neuronen, die den Entwicklungstod - gemeint ist der Zelltod im Rahmen der Entwicklung des ZNS - in verschiedenen Hirnregionen, wie dem Hippocampus ^{193,194}, dem Kleinhirn ¹⁹⁵, dem RM ^{153,157,196} der Retina ^{197,198} durchlaufen. Etwa 50% aller unreifen Neuronen unterliegen dem Entwicklungstod während der Gehirnreifung, führend durch den programmierten Zelltod. Das Ausmaß des Zelltods erfordert ein aktiv-agiles und effizientes Reinigungssystem, um die entstehenden Zelltrümmer zu entfernen, dem responsiv mikrogliale Zellen nachkommen. Interessanterweise kann die phagozytische Aktivierung von Mikroglia erfolgen ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen ^{24,195,199,200}. Obgleich der Grund für den umfangreichen programmierten Zelltod noch nicht vollständig geklärt ist, ist anzunehmen, dass der Überschuss an durch fehlerhafte Differenzierung und Migration resultierend funktionell insuffizienter Neuronen sowie solcher, die keine zweckmäßig adäquaten neuronalen Schaltkreise bilden oder nur vorübergehende Funktionen erfüllen, beseitigt werden muss. So folgt die mikrogliale Aufgabe der Beseitigung entstandener Zelltrümmer der Einleitung des neuronalen Zelltodes durch neuronal ausgesandte oder durch zelleigene, mikrogliale Faktoren, wie bereits im embryonalen Küken sowie für Zellen der Retina, des neonatalen Kleinhirns und Hippocampus der Maus belegt ist. Derweise können nicht nur Neurone, sondern durchaus auch neuronale Vorläuferzellen durch die Produktion von Nervenwachstumsfaktor oder die Induktion eines oxidativen Bursts zur Apoptose angeleitet werden, wie zuletzt an reifenden Gehirnen von Nagetieren gezeigt werden konnte ^{193,195,196,201,202}. Diese Aktivitäten erstrecken sich nachweislich auch auf Entwicklungsprozesse im jungen reifen Gehirn der Maus, wo Mikroglia apoptotische, überzählige Neuronen im Hippocampus der Maus beseitigen ²⁴. Folglich können Mikroglia nicht als passive und akzessorische Zellen mit ausschließlich reaktiver Beteiligung am neuronalen Zelltod, sondern zumindest in bestimmten Hirnregionen

als vielmehr aktive Promotoren dieses Prozesses angesehen werden. Diese phagozytische Aktivität ist nicht nur im sich entwickelnden ZNS wichtig, sondern auch für die Aufrechterhaltung gesunder neuronaler Netzwerke im erwachsenen, reifen Gehirn entscheidend ^{24,193,195,196,201,202}.

2.1.5.2 Synaptogenese: Stripping und Pruning

Seit dem Aufkommen der Intravitalmikroskopie und der hochauflösenden Elektronenmikroskopie ^{3,18,25} sind die Interaktionen der Mikroglia mit Synapsen als Kernelement neuronaler Schaltkreise, insbesondere in den ersten zwei Wochen der postnatalen Entwicklung, weit erforscht. Kraft des Umstandes der Beeinflussung gebildeter Kontakte durch neuronale Aktivität wurde vermutet, dass Mikroglia nebst der Entfernung nicht-funktionaler Synapsen eine aktive Rolle bei der Umgestaltung synaptischer Schaltkreise spielen könnten ^{25,203}. So werden Mikroglia durchweg in enger Assoziation mit den sich entwickelnden Axonfaszikeln gefunden und beeinflussen den Aufbau von Axonbahnen, den Axon-Umbau und die Synaptogenese ²⁵. Im Rahmen der synaptischen Plastizität während und außerhalb der frühen Entwicklung des ZNS tragen Mikroglia zur Bildung von Synapsen bei und bestimmen deren Effizienz. So erlauben neue ultrastrukturelle Beobachtungen die Definition von Mikroglia, nebst den Astrozyten, als ein zweites gliales Element mit bedeutsamem Einfluss auf Synaptogenese und Neurotransmission ²⁰⁴.

Neben interneuronaler Mechanismen sind Mikroglia bei der Beseitigung insuffizienter, störender oder dysfunktioneller Synapsen entscheidend; im gesunden, sich entwickelnden Gehirn spüren sie in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität prä- und postsynaptische Elemente auf und phagozytieren diese auf entscheidenden Reiz hin. Dieser Prozess wurde erstmals im Modell der Nervus-Fazialis-Verletzung erkannt und als „synaptisches Stripping“ bezeichnet ²⁰⁵ - erst viele Jahre später wurde der direkte Beweis erbracht, dass das "synaptische Pruning" durch Mikroglia für eine normale Gehirnentwicklung notwendig ist ²⁶. Während der postnatalen Entwicklung wiesen Paolicelli und Kollegen die Aufnahme spezifischer Proteine aus präsynaptischen und postsynaptischen Elementen innerhalb mikroglialer Prozesse nach synaptischem Kontakt nach ²⁶. Folglich führen eine Fehlfunktion ²⁰⁶ oder ein Mangel an Mikroglia ²⁰⁷ während der Neuroentwicklung zu Beeinträchtigungen der Synaptogenese und des synaptischen Pruning und folgend zu kognitiven Störungen

²⁰⁸. Unabhängig vom Mechanismus zeigen sich in solch einem Fall Anzahl, Morphologie und Funktion der synaptischen Kontakte im sich entwickelnden Gehirn tiefgreifend verändert ²⁰⁹.

Von bedeutender Erkenntnis ist, dass das synaptische Pruning bis ins Jugend- und Erwachsenenalter andauert; beispielsweise kann im Erwachsenenalter die mikrogliale Synapsenverfeinerung zur Eliminierung schwacher Synapsen während der Schlafphase beitragen. Die aktivitätsabhängige Reduzierung von Derselben wird als Erklärung für die positiven Auswirkungen des Schlafs auf den Erwerb, die Konsolidierung und die Integration von Gedächtnisinhalten angesehen ²¹⁰.

2.1.5.3 Neurogenese

Nebst der Bildung, Verstärkung und Verlagerung von Synapsen, spielen Mikroglia eine entscheidende Rolle bei der fundamentalen Form der strukturellen Plastizität, nämlich der Bildung neuer Neuronen, der Neurogenese ²¹¹. Die adulte Neurogenese ist ein komplexes Phänomen, das in praktisch allen taxonomischen Gruppen vorkommt ²¹². Das Hinzufügen neuer Neuronen zu den Schaltkreisen ist ein langdauernder und komplexer Prozess, der die Generierung, Migration, Differenzierung und Reifung dieser Zellen umfasst ²¹³. Zweifelsfrei liegt die funktionelle Bedeutung der adulten Neurogenese in der Beeinflussung der Gehirnfunktion, vor allem der kognitiven Funktion und der Gedächtnisprozesse ²¹⁴. Bei Nagetieren wird die adulte Neurogenese durch Bewegung ²¹⁵ und Umweltsanreicherung („Environmental Enrichment“) ²¹⁶ hochreguliert und durch Alterung und Krankheit herunterreguliert ^{217,218}. Demzufolge lenken Bedingungen, die sich auf die adulte Neurogenese auswirken, kognitive Prozesse in dieselbe Richtung ²¹⁹.

Die Betrachtung neuroglialer Zellen im Kontext der Neurogenese führte jüngst nebst der Beschreibung der Rolle astrozytärer Glia ²²⁰ zu Untersuchungen zur Beteiligung mikroglialer Zellen. So konnte eine in-vitro-Studie zur Untersuchung der Rolle von Mikroglia bei der Neurogenese Erwachsener belegen, dass die Depletion von Mikroglia mit dem Verlust der induzierbaren Neurogenese korreliert und dass die von den Mikroglia freigesetzten löslichen Faktoren diese wiederherstellen kann. Interessanterweise war ein direkter Mikroglia-Kontakt für die Beeinflussung der

Neurogenese nicht unbedingt erforderlich. Die Verwendung von Mikroglia-konditioniertem Medium reichte aus, um die Neurogenese wiederherzustellen, was auf die Bedeutung der von Mikroglia freigesetzten löslichen Faktoren hinweist ²²¹.

2.1.5.4 Myelinogenese

Neben ihrer Interaktion mit Nervenzellen unterstützen Mikroglia nachweislich auch andere Zellen des ZNS, so insbesondere die Oligodendrozytenlinie mit den Oligodendroglia sowie ihre Vorläuferzellen, die OPC. Es hat sich gezeigt, dass Mikroglia-Cluster in der sich entwickelnden weißen Substanz für eine normale Myelinogenese von entscheidender Bedeutung sind (Hagemeyer et al., 2017; Wlodarczyk et al., 2017). Ferner wurde ein Crosstalk der Mikroglia mit OPC in der frühen postnatalen Phase (Hagemeyer et al., 2017) sowie für De- und Remyelinisierungsreaktionen im Zusammenhang mit Pathologien berichtet (Arnett et al., 2001; Lloyd et al., 2019).

2.1.5.5 Angiogenese

Jüngste in-vivo-Studien zeigen, dass Mikroglia die Fusion von endothelialen Tip Cells erleichtern und damit eine Gefäßanastomose induzieren ^{222,223}. Die Kontrolle der Neovaskularisierung durch Mikroglia, offenbar in chaperon-ähnlicher Weise, wurde in der Netzhaut von Zebrafischen und der Maus nachgewiesen. Insbesondere scheinen die Zellen eine noch zu definierende, vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor alpha- (Vascular Endothelial Growth Factor alpha, VEGF α -) unabhängige Aktivität zur Förderung der Gefäßfusion während der Entwicklungsangiogenese zu bieten ²²².

2.1.5.6 Schutz vor Exzitotoxizität

Exzitotoxizität ist eine Folge übermäßiger Neurotransmitterfreisetzung mit einem potentiell neurodestruktiven Ergebnis. So konnte an organotypischen Hippocampus-Scheibenkulturen gezeigt werden, dass Mikroglia für den Schutz vor N-Methy-D-Asparat- (ein Glutamat-Agonist) induzierter Toxizität entscheidend sind ²²⁴.

Mikroglia sind in der Lage, Signale geschädigter Neuronen über Oberflächenrezeptoren wahrzunehmen und die N-Methy-D-Asparat-induzierte Toxizität abzuschwächen. Ferner kann über die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren auf Mikroglia das Wachstum von Mikrogliafortsätzen gefördert werden; diese umschlingen geschwollenen Axone, induzieren eine Membranrepolarisierung und verhindern derweise die für das ZNS schädliche Exzitotoxizität ^{10,225}.

2.1.6 Aktivierung

Die reaktive Transformation als Antwort auf die pathologische Reize im ZNS ³ ist eines der charakteristischen Merkmale mikroglialer Zellen, das bereits in den frühesten Studien durch Pío Del Río-Hortega beschrieben wurde. Auch gegenwärtig wird die Bedeutung der Mikroglia in Physiologie und Pathologie unweigerlich mit dem Prozess der Aktivierung verknüpft. Selbst der Begriff "Aktivierung" spiegelt möglicherweise nicht angemessen die Veränderungen wider, die sich zwischen dem Zustand im gesunden ZNS und dem Verhalten bei einem Insult zutragen, weil er Nichtaktivität unter normalen Bedingungen impliziert und die Vielfalt der reaktiven Phänotypen nicht anerkennt, ist die mikrogliale Aktivierung jedoch hinsichtlich ihrer Stimuli, des Verlaufs und der Folgen sehr komplex ^{17,81,110,226-233}.

Als erste Verteidigungslinie stellt die Aktivierung von Mikroglia die Hauptkomponente der Neuroinflammation im ZNS dar ^{34,234}. Als die residenten Immunzellen des ZNS reagieren Mikroglia somit auf nahezu jede Art von pathologischem Ereignis ²³⁵. Mikroorganismen, tote Zellen, Proteinaggregate und andere lösliche oder partikuläre Antigene, die potenziell schädlich für das ZNS sind, sind in der Lage Mikroglia zu aktivieren und somit Neuroinflammation anzuregen, zu modulieren und zu regulieren ³. Eine streng kontrollierte Regulierung sowohl der Initiierung als auch der Beendigung der mikroglialen Aktivierung ist für eine gesunde Entwicklung und Homöostase des ZNS von entscheidender Bedeutung ²³⁶. Kommt es im Rahmen des pathologischen Geschehens jedoch zu einer unkontrollierten Initiierung oder insuffizienten Beendigung der Immunantwort, treten neurodestruktive Folgen ein, die in hohem Maße mit dem Zellverlust oder der Zelldysfunktion im Rahmen der Entzündungsprozesse zusammenhängt ²³⁷. So kann die Neuroinflammation als zweischneidiges Schwert betrachtet werden, das sowohl destruktive als auch

protektive Auswirkungen auf die Neuronen haben kann^{32,33}. Neben der potentiell neurotoxischen, wohlmöglich fehlerterminierten Natur der Mikroglia, bietet die Neuroinflammation den Boden für Stimulation der Reparatur des Myelins, die Entfernung toxischer, aggregierter Proteine und Zelltrümmer aus dem ZNS sowie die Sezernierung neurotropher Faktoren, um neuronale Schäden zu verhindern^{11,19,32-35,112,113}.

Vor dem Aufkommen immunologischer und molekularer Techniken galt die morphologische Veränderung der Mikroglia als primäres Merkmal ihrer Aktivierung¹²⁴. Inzwischen ist anerkannt, dass diese Transformation mit Zwischenstufen, die Veränderungen der Genexpression, der Morphologie, der Motilität, der Migration, des Stoffwechsels, des Sensoms, der Phagozytose, der Proliferation und des Todes beinhalten, als Kontinuum erfolgt^{124,228}. So umfasst der Aktivierungsprozess einen Umbau des Zytoskeletts sowie der Membranorganisation, die Induktion von Gegensätzen und die Freisetzung direkter und indirekter Genprodukte sowie die Entfaltung von Funktionsportfolios, die von Migration und Phagozytose bis zur Kommunikation mit der adaptiven Immunität reichen²³³. Derweil ist das Konzept der reaktiven Phänotypvielfalt akzeptiert und Studienansätze weiter verfeinert worden^{228,238}.

Für phagozytäre sowie reaktive Mikroglia wurde, dem Konzept folgend, eine erste Kategorisierung parallel zur Unterteilung der Aktivierungszustände von Makrophagen in peripheren Organen in einen pro-inflammatorischen M1- und einen anti-inflammatorischen M2- Phänotyp propagiert²³⁷ mit Übergangszuständen dazwischen²²⁸. In den letzten Jahren wurde das M1/M2-Paradigma der Mikroglia-Aktivität zunehmend untersucht, um die Mechanismen der Immunpathogenese aufzudecken²³⁷. In letzter Zeit wird das Konzept der Dichotomisierung zunehmend in Frage gestellt beziehungsweise wieder verlassen, da diese simple Einteilung unter anderem die Realität von Mikroglia-Aktivierung als Kontinuum²²⁸ nur unzureichend darstellt^{10,239,240}. Im Folgenden soll das dichotome M1/M2-Paradigma dennoch als wesentlicher historischer und für das heutige Verständnis relevanter Zwischenschritt näher beleuchtet werden.

2.1.6.1 Das M1/M2-Paradigma

Einen globalen Einfluss auf das Verständnis der Mikroglia-Funktionen hatte die Erforschung der Makrophagen-Phänotypen ^{118,241-243}. Es ist belegt, dass die Art und Natur des aktivierenden Reizes von entscheidender Bedeutung und letztlich verantwortlich für die unterschiedliche Aktivierung der Mikroglia ist. Dies ermöglichte in Folge die Unterscheidung zwischen dem klassischen M1-Phänotyp, der hauptsächlich durch Pathogene und pro-inflammatorische Faktoren aktiviert wird und die angeborene Immunreaktion zur Unterstützung der adaptiven Immunantwort vom Typ 1 T-Helferzellen (Helper T Cells, Th) darstellt, und dem alternativen M2-Phänotypen. Letzter wird aktiviert durch pro-inflammatorische Faktoren ²⁴⁴ und stellt ein eher entzündungshemmendes und -auflösendes Profil dar, das endozytotische, parasitenabtötende und gewebereparierende Funktion aufweist und die Th2-Immunantwort fördert ^{123,243}.

Die Benennung der mikroglialen Phänotypen entstanden in Analogie zu den Zellen des peripheren Immunsystems, deren Polarisationsphänotypen als Th bezeichnet wurden (klassischer Th1- und alternativer Th2-Phänotyp) ^{231,245}. Für Zellen der peripheren Monozyten-Makrophagen-Linie konnte gezeigt werden, dass sie unter denselben Bedingungen eine Polarisierung in die Phänotypen M1 und M2 durchlaufen ²⁴⁶. Letztlich wurde das Phänotypisierungssystem mitsamt ihren Aktivierungswegen auch an Mikroglia angewandt ^{247,248}.

Bei entsprechender Stimulierung dienen klassisch aktivierte, pro-inflammatorische Mikroglia der ersten Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems, die oft innerhalb der ersten Stunden und Tage auftritt – behalten die im verletzten Gewebe existierenden Mikroglia verschiedenster Aktivierungszustände doch bemerkenswerterweise ihre Fähigkeit bei, ihren funktionellen Phänotyp während der Entzündungsreaktion noch zu verändern und anzupassen ^{249,250}. So polarisieren Mikroglia sowie die aus der Zirkulation infiltrierenden Makrophagen auf einen M1-Reiz hin in einen pro-inflammatorischen Phänotypen und produzieren in Folge entzündungsfördernde Zytokine, präsentieren Antigene und exprimieren hohe Mengen an ROS ^{118,251} mit dem Ziel der Abtötung des fremden Erregers, der Th-Zellpolarisation und der Einleitung der adaptiven Immunantwort. Während im experimentiellen Setting zur Untersuchung klassisch-polarisierter Mikroglia M1-Stimuli bakterieller Produkte, wie dem Lipopolysaccharid (LPS) oder mit Infektion

verbundenen Signalen wie Interferon-Gamma (IFN γ), gearbeitet wird, kann es bei Abwesenheit von Mikroorganismen hingegen zu ähnlichen, aber sterilen Entzündungsreaktionen, oft posttraumatisch, bei Schädigungen im Rahmen der Reperfusion nach ischämischem Insult oder bei chemischer Belastung, kommen^{252,253}.

Das Konzept der alternativen Makrophagenaktivierung wurde indes in den frühen 1990er Jahren vor allem auf der Grundlage von Arbeiten entwickelt, die eine Rolle anti-inflammatorischer Faktoren bei der Induktion eines alternativen Aktivierungszustands zeigten²⁵⁴. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Umstellung des Aktivierungsphänotyps auf den alternativen Typus einen Silencing-Effekt hat, der zur Wiederherstellung der ökologischen Homöostase führt und die Genesung fördert^{243,248}. Die alternative Aktivierung der Mikroglia hat die Freisetzung von entzündungshemmenden Zytokinen, Wachstumsfaktoren, neurotrophen Faktoren und dem Pro-Survival-Faktor Progranulin zufolge¹²³.

Der M1-Phänotyp kann, exagiert betrachtet, als dem M2-Phänotypen direkt entgegengesetzt gewertet werden. Eine solche strikte Klassifizierung nach dem Konzept des M1/M2-Paradigmas kann auf in-vitro-Bedingungen mit ausgewählter Stimulation angewandt werden, ist aber in der in-vivo-Gewebeumgebung – wie oben bereits ausgeführt – nicht (mehr) als solches Grundkonzept zu vertreten²³¹. Der Entzündungsprozess als streng regulierte Kaskade, beginnend mit der robusten Aktivierung und endend mit seiner Auflösung und der Gewebereparatur, bietet daher Subtypen des Mikroglia-Phänotyps, die nahtlos ineinander übergehen und vielmehr einen Gradienten von Phänotypen im Gewebe bilden^{123,228}; im Gewebe existieren derweise viele Zwischenzustände²²⁸.

2.1.6.2 Mechanismus der Aktivierung

Das Zusammentreffen multipler Signale unter physiologischen wie auch pathologischen Zuständen im ZNS geht mit einer Reihe von Faktoren einher, die darüber entscheiden, ob Mikroglia grundsätzlich reaktiv transformieren und welche Merkmale dabei zum Ausdruck kommen²³³. Mikroglia können durch verschiedene Faktoren aktiviert werden, die in ihrer Umgebung vorhanden sind und während des Überwachungsprozesses aufgespürt werden. Bei diesen kann es sich um exogene

Faktoren handeln, exemplarisch den pathogenassoziierten molekularen Mustern (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) wie bakteriellem LPS, oder genetischem Material von Pathogenen oder jedoch Signale endogener Natur, die von gestressten umgebenden Zellen präsentiert werden, beispielsweise gefährdungsassoziierte molekulare Muster (Damage-associated Molecular Patterns) wie Adenosintriphosphat und Proteinaggregate wie Amyloid β (A β) sowie senile Plaques (Kreutzberg, 1996; Stence et al., 2001).

2.1.6.2.1 Stimuli der klassischen Aktivierung

Die pro-inflammatorischen („M1-artigen“) Stimuli werden nach ihrer Fähigkeit gruppiert, prototypische Entzündungsreaktionen auszulösen, aber ihre Quelle, Rolle, Rezeptoren und Signalwege unterscheiden sich erheblich²³¹. Im Folgenden werden beispielhaft drei der wichtigsten heute bekannten pro-inflammatorischen Stimuli vorgestellt.

- (i) IFN γ ist ein Zytokin, das mit der M1-Aktivierung in Verbindung gebracht wird, und ein Produkt der Th1-Zellen ist. Die Ketten IFN γ -Rezeptor 1 und 2 bilden den IFN γ -Rezeptor. IFN γ steuert über Janus-Kinase (JAK)-1- und -2-Adaptoren, welche intrazelluläre Tyrosinkinasen sind, die Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription 1 (STAT-1; Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf Immunologie, Proliferation und Zellwachstum) und Interferon-regulatorische Faktoren (IRF; Regulatoren der Transkription von Interferonen) wie IRF1 und IRF8,²⁵⁵ welche spezifische Genexpressionsprogramme, die Zytokinrezeptoren, Zellaktivierungsmarker und eine Reihe von -adhäsionsmolekülen aktivieren^{231,241,256}.
- (ii) LPS, ein Molekül der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, ist das am besten untersuchte M1-Makrophagensignal und wird von Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs), zu denen der Toll-ähnlichen Rezeptor (Toll-like Receptors, TLRs)-4 gehört, erkannt, obwohl neuere Erkenntnisse zeigen, dass LPS auch durch TLR4-unabhängige Mechanismen erkannt werden kann, die zu einer Inflammasomaktivierung führen^{257,258}. Konventionell induziert die TLR4-Aktivierung die primäre Antwort der myeloischen Differenzierung 88 (MyD88)

und MyD88-ähnlicher Adapter/Toll-Interleukin 1 Rezeptor-Adapter Protein-abhängige Wege, die über IRFs, Aktivierungs-Protein 1 (AP1), Nukleären Faktor-Kappa-Leichtketten-Enhancer (NF-κB) und STAT-5 zu starken pro-inflammatorischen Zytokinprofilen, Chemokinen und Antigenpräsentationsmolekülen führen^{231,255}.

- (iii) Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) bindet den GM-CSF-Rezeptor dodekamerer Struktur²⁵⁹ und rekrutiert JAK-2, was zur Aktivierung von STAT-5, extrazellulärer signalregulierter Kinase (Extracellular-signal regulated Kinsase, ERK) und Proteinkinase B (V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) sowie zur Kerntranslokation des NF-κB und IRF5 führt²⁶⁰; viele dieser Regulatoren sind ebenfalls Teil der IFN γ - und TLR-Signalwege²³¹.

2.1.6.2.2 Stimuli der alternativen Aktivierung

Die Gruppe der anti-inflammatorischen („M2-artigen“) Stimuli wird hauptsächlich aufgrund ihrer Fähigkeit, prototypische Entzündungsreaktionen und -marker zu antagonisieren, gruppiert; wie bei den pro-inflammatorischen Stimuli unterscheiden sich ihre Quelle, Rolle, Rezeptoren und Signalwege²³¹. Im Folgenden werden die wichtigsten anti-inflammatorischen Stimuli vorgestellt.

- (i) Interleukin 4 (IL4) kann durch verschiedenen Rezeptorpaare erkannt werden. Eine Paarung des IL4-Rezeptor-Alpha 1 mit der gemeinsamen Gamma-Kette ermöglicht die Bindung von IL4; auch eine Bindung der Interleukin 13-Rezeptor-Alpha 1-Kette mit der Gamma-Kette ermöglicht nebst der Bindung von IL13 die des IL4. Die Rezeptorbindung von IL4 aktiviert JAK-1 und -3, welche zur Aktivierung und Translokation von STAT-6 führt und die Differenzierung von Th2, die Expression von Zelloberflächenmarkern und den Klassenwechsel von Immunglobulinen moduliert²³¹. Die IL13-Signaturen ähneln denen des IL4, überschneiden sich aber nicht vollständig^{231,261}.
- (ii) Glukokortikoide und IL10 werden als M2-Stimuli aufgenommen, obgleich sie eine gänzlich differente Art von Stimulus darstellen.

- (a) Die von den Nebennieren ausgeschiedenen Glukokortikoidhormone werden durch zelluläre Enzyme metabolisiert. Als aktive Glukokortikoide sind sie lipophil und diffundieren durch die Membran, um den Glukokortikoidrezeptor Alpha zu binden, was zu einer nukleären Translokation des Komplexes führt. Dieser bindet Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid, DNA) direkt, um die Gentranskription beeinflussen, oder indirekt durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie NF-kB oder AP1. Langfristige Exposition führt zu verschiedenen Genexpressionsprogrammen, die mit den LPS- und IFN γ -Signalwegen in einer komplexen und nicht ausschließlich antagonistischen Weise interagieren ²⁶².
- (b) IL10 bindet an den IL10-Rezeptor, ein Dimer aus IL10-Rezeptor 1 und 2. Die Autophosphorylierung des Rezeptors führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-3, dessen Bindung die Hemmung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine bewirkt. IL10 ist ein Th2-Produkt und ein starker Inhibitor von Th1-Zellen und wird von praktisch allen Leukozyten produziert ^{231,263}.
- (iii) Der koloniestimulierende Faktor 1 (Colony Stimulating Factor 1, CSF1), ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, ist - GM-CSF gleichend - eine späte Ergänzung der Stimulatoren. Der CSF1-Rezeptor ist ein Tyrosinkinase-Transmembranrezeptor; die Bindung von CSF1 führt zur Dimerisierung des Rezeptors, zur Autophosphorylierung, zur Aktivierung von ERK, Phosphatidylinositol-3-Kinase, Phospholipase C und schließlich zur nukleären Lokalisierung des Transkriptionsfaktors Spezifitätsprotein 1. Die transkriptionelle Reaktion auf CSF1 umfasst vorübergehende Gencluster mit einer Überrepräsentation von Zellzyklusgenen und einer Herabregulierung von Haupthistokompatibilitätskomplex- (Major Histocompatibility Complex, MHC-; Zelloberflächenproteine zur Antigenpräsentation und -erkennung), Antigenen sowie stabilen Gen-Clustern, darunter TLR7 und von Komplementuntereinheiten ^{231,241}.

2.1.6.3 Postaktivierte Mikroglia

Von größter Bedeutung ist, nebst der Initiierung der Immunreaktion, die Terminierung der Reizantwort. Mikrogliale Zellen betreffend, sind die Wege der Beendigung der Reizantwort so vielseitig wie die Vielzahl der durch sie exprimierten Rezeptoren und Oberflächenmoleküle. Das unkomplizierteste Terminierungssignal einer Reizantwort basiert auf dem reinen Verschwinden oder der Beseitigung des die Reaktion auslösenden Reizes. Weitaus komplexer und nicht vollständig verstanden sind Mechanismen, die mit der Desensibilisierung von Signalkaskaden, die häufig auf der Internalisierung von Rezeptoren beruht²⁶⁴, einhergehen oder die Signalübertragung durch die Blockierung von Rezeptordomänen unterbrechen, wie es bei G-Proteingekoppelten Rezeptoren der Fall ist. Neben autonomen Mechanismen, wie der zeitlich abgestimmten Produktion entzündungshemmender Faktoren oder der Induktion intrazellulärer Signalregulatoren, können Rückkopplungen von anderen Zellen eine Deeskalation bewirken²³³. Gelingt es letztlich nicht, die Aktivierungskaskade zu terminieren, droht eine Schädigung neuronaler Schaltkreise, die ein homöostatisch gestörtes Milieu nicht lange tolerieren²⁶⁵. Daher muss nicht nur die Einleitung der Aktivierung, sondern auch ihre Beendigung der Reizantwort strengen Kontrollen unterliegen²⁶⁵.

Postaktivierte Mikrogliazellen, die eine vorübergehende Reaktion gezeigt haben und deren Reaktion suffizient terminiert wurde, können wieder in den naiven Zustand der Überwachung übergehen. Ein alternatives Schicksal jedoch führt zu persistierend veränderten Mikrogliapopulationen, mit - im Vergleich zum naiven Zustand - divergenter Rezeptorexpression, Signalwirkung oder Transkriptionsregulation, wie bereits für extraneurale Makrophagen berichtet wurde^{233,266}. So scheinen die Erfahrungen aus einer vorhergehenden Aktivierung, die vermutlich epigenetisch festgehalten wird, die Eigenschaften bei einer erneuten Herausforderung zu beeinflussen. So muss davon ausgegangen werden, dass beispielsweise infektiöse Komplikationen, vor allem in der Entwicklung, nicht nur heranreifende ZNS-Strukturen akut beschädigen, sondern auch die Mikroglia-Reaktionen im späteren Leben zu beeinflussen vermögen^{267,268}. In Kombination mit einer angenommenen lebenslangen Gewebeverweildauer des mikroglialen Zellpools, rückt die Betrachtung epigenetischer Abdrücke früherer Aktivierungsepisoden auch für ZNS-Erkrankungen, die keine offensichtlichen inflammatorischen Assoziationen

aufweisen, einschließlich Hirntumoren, Demenzen oder neuropsychiatrische Störungen, in den Fokus neurologischer sowie psychiatrischer Forschung²³³.

2.1.6.4 Aktivierungsassoziierte Marker

Mikroglia bieten die erste Reizantwort zum aktiven Schutz in Situationen, die mit einer Störung der Homöostase zusammenhängen. Diese Zellen sind mit einer Vielzahl an Werkzeugen ausgestattet, die sowohl für die Erkennung als auch für die Eliminierung von Bedrohungen notwendig sind. Marker der Aktivierung umfassen neben Antigen-Präsentations-assoziierten Markern auch Transmembran-, Oberflächen-, Intrazellular- und Effektorproteine sowie sezernierte Moleküle; alle diese Faktoren können als molekulare Marker für aktivierte Mikroglia verwendet werden¹²³. Unter Betrachtung des M1/M2-Paradigmas erlauben Zellmarker eine gewisse Zuordnung in eine Phänotyp-Klasse.

2.1.6.4.1 Antigen-Präsentations-assoziierte Marker

Mikroglia sind Antigen-präsentierende Zellen (Antigen-Presenting Cells, APC). Als solche verwenden sie bei Aktivierung MHC-II-Moleküle, um Fragmente von phagozytierten, verdauten Krankheitserregern zu präsentieren, die zur Ausweitung der Entzündung beitragen. Auch andere für die Antigenpräsentation notwendige Membranmoleküle werden auf der Zelloberfläche hochreguliert²⁶⁹.

2.1.6.4.2 Transmembran- und Oberflächen-Proteine

Die Transmembran- und Oberflächenproteine sind die erste Linie der Pathogenerkennung; im Folgenden werden die wichtigsten Proteine vorgestellt.

CD11b CD11b (Cluster of Differentiation, Unterscheidungsgruppe) stellt die Alpha-Untereinheit dar, die zusammen mit CD18 den Integrin-Komplementrezeptor 3 bildet und an Adhäsionsprozessen und der Aufnahme von komplementbeschichteten Molekülen beteiligt ist. Da

CD11b auch auf leukozytären Membranen vorhanden ist, stellt es keinen spezifischen Marker für ansässige Mikroglia dar^{270,271}.

- CD14** CD14 ist ein Co-Rezeptor für den TLR4 und den endosomalen TLR7/9 und präsentiert diesen Antigene^{264,272}.
- CD16** CD16 ist ein Fc-Rezeptor, der Immunglobulin G-Antikörper erkennt und an Phagozytoseprozessen beteiligt ist²⁷³.
- CD45** CD45 ist ein positiver Regulator der T-Zell-Aktivierung²⁷⁴.
- CD68** Der CD68-Rezeptor (auch: Macrosialin) ist ein Transmembranprotein, das in zellulären, lysosomalen und endosomalen Membranen von Monozyten, Makrophagen sowie Mikroglia lokalisiert ist, während einer Entzündung stark hochreguliert wird und die Fähigkeit hat, unmittelbar nach der Stimulation von der Zelloberfläche in Endosomen zu internalisieren (Holness und Simmons, 1993; Kurushima et al., 2000; Fadini et al., 2013).
- CD115** CD115 (auch: Koloniestimulierender Faktor 1-Rezeptor) gehört zur Familie der Zelloberflächen-Rezeptor-Tyrosinkinasen. CD115 erkennt entzündungsfördernde Liganden wie IL34 oder CSF1. Dieser Rezeptor ist an der Reaktion auf die angeborene Immunität und an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt, was zur Veränderung des Phänotyps und zur Infiltration entzündeter Regionen beiträgt. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Depletion oder Hemmung von CD115 zum Absterben der Mikroglia führt²⁷⁵⁻²⁷⁷.
- CX3CR1** Das Protein C-X3-C Chemokin Rezeptor 1 (CX3CR1) ist ein transmembraner, G-gekoppelter C-X3-C Ligand 1 (CX3CL1, auch Fraktalkin)-Rezeptor, der seine Funktionen im Zusammenhang mit der Migration und Adhäsion von Mikroglia vermittelt²⁷⁸.
- F4/80** Das Zelloberflächen-Glykoprotein F4/80 wird als einer der spezifischsten Marker von Maus-Makrophagen und -Mikroglia

beschrieben, während seine Expression beim Menschen bisher nicht bestätigt werden konnte ^{144,279}.

FCER1G High-Affinity Immunglobulin Epsilon Receptor Subunit Gamma (Hochaffiner Immunglobulin Epsilon Rezeptor Gamma; FCER1G) ist ein hochaffiner IgE-Rezeptor, der mit dem PRR, dem C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren (C-Typ-Lektin-Rezeptoren binden spezifische Kohlenhydrate im Rahmen der PAMP-Erkennung) assoziiert ist. Dadurch wird eine nachgeschaltete Signalübertragung ausgelöst, die zur Reifung von APCs führt. Dieses Molekül ist wahrscheinlich auch an Alterungs- und neurodegenerativen Prozessen beteiligt ²⁸⁰⁻²⁸².

2.1.6.4.3 Intrazellulär- und Effektorproteine

Die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren und anderen Proteinen löst die Mobilisierung intrazellulärer Signalwege und Effektorproteine aus, die auch als Marker für die Aktivierung von Mikroglia dienen können ¹²³.

iNOS iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, Inducible Nitric Oxide Synthase), ist ein Enzym, das NO (Stickstoffmonoxid, Nitric Oxide) aus L-Arginin produziert. In Mikroglia fördert iNOS über die NO-Produktion die Reaktion auf Tumore und Krankheitserreger. Hohe NO-Konzentrationen hemmen die mitochondriale Atmungskette reversibel, indem das NO mit molekularem Sauerstoff in der Cytochrom-c-Oxidase konkurriert. Bei reduzierter mitochondrialer Atmung wird die ROS-Produktion in Form von Superoxid-Anionen erhöht und durch Superoxiddismutase 3 in Wasserstoffperoxid umgewandelt, welches in Folge in das Zytoplasma diffundiert ²⁸³. Bei anhaltender Produktion kann NO mit molekularem Sauerstoff zu Peroxynitrit reagieren, das die Elektronentransportkette irreversibel hemmt ²⁸⁴. Ferner ist NO an der Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase beteiligt, welche Pyruvat in Acetyl-Coenzym A umwandelt, bevor es in den Citrat-Zyklus gelangt ²⁸⁵. Funktionell dient NO als Effektormolekül mit mikrobiozider Aktivität und besitzt die Fähigkeit, die Zellproliferation zu hemmen ²⁸⁶. iNOS fördert die Synthese von Entzündungsfaktoren und ist mit der

Expression von Transkriptionsfaktoren (wie IRF1 und NF-κB) assoziiert²⁸⁷⁻²⁹⁰. Die iNOS-Konzentration in ruhenden Glia ist fast nicht nachweisbar^{123,285}.

Iba1 Das Ionisiertes-Calcium-bindende Adaptermolekül 1 (Ionized Calcium-Binding Adaptor Molecule 1, Iba1, auch: Allograft Inflammatory Factor 1, oder Microglia Response Factor 1) ist ein intrazelluläres Protein, das dank seiner Fähigkeit, Aktinmoleküle zu binden an der Reorganisation des mikroglialen Zytoskeletts und der Unterstützung des Phagozytoseprozesses beteiligt ist²⁹¹. Iba1 ist aufgrund seiner konservativen Aminosäuresequenz und der Stabilität der antigenen Epitope bei verschiedenen Spezies, einschließlich des Menschen, eines der am häufigsten untersuchten Marker in biochemischen Studien²⁹².

Vimentin Vimentin ist ein Intermediärfilament und wird während einer Entzündung von Calpain (Calpaine sind intrazelluläre Calciumion-abhängige Cysteinproteasen, die in fast allen Eukaryoten und einigen Bakterien vorkommen und Substrate proteolysieren, um deren Strukturen und Aktivitäten zu modulieren, weshalb sie auch als "Modulator-Proteasen" bezeichnet werden²⁹³) in kurze Fragmente gespalten, die Signalmoleküle in den Zellkern transportieren²⁹⁴. Es wurde berichtet, dass Vimentin in Mikroglia für die zelluläre Aktivierung notwendig ist²⁹⁵. Seine Rolle bei Entzündungen wurde auch bei Astrozyten beschrieben, so dass es nicht als spezifischer Mikroglia-Marker verwendet werden kann⁵².

Ferritin Ferritin stellt ein weiteres wichtiges mikrogliales multimeres Komplexprotein dar, das für die Eisenspeicherung und -homöostase verantwortlich ist und durch die Aktivierung der Mikroglia herunterreguliert wird²⁹⁶.

2.1.6.4.4 Sezernierte Moleküle

Ebenso wichtig wie die Oberflächenproteine sind diejenigen, die von reaktiven Mikroglia sezerniert werden. Hierzu gehören die Zytokine, darunter Interleukine (IL1 β , IL6), Tumornekrosefaktor Alpha (TNF α), IFN γ , Chemokine, Glutamat und NO. Unter den Enzymen sind Kathepsine, freigesetzte Proteasen, die die von Mikroglia angetriebene Entzündung unterstützen²⁹⁷ und Matrixmetalloproteinasen (MMP), die die Bioverfügbarkeit von Zytokinen und Chemokinen bei Entzündungen regulieren²⁹⁸. Einige von ihnen, wie MMP9, können als Mikroglia-Marker verwendet werden¹²³. Sezernierte Faktoren werden in den nachfolgenden Abschnitten „Marker des pro-inflammatorischen (M1-) Phänotyps“ und „Marker des anti-inflammatorischen (M2-) Phänotyps“ genauer beleuchtet.

2.1.6.4.5 Marker des pro-inflammatorischen Phänotyps

Die Beziehung zwischen Th1/M1- und Th2/M2-Zellen spiegelt sich auch in den von ihnen freigesetzten Faktoren wider²⁴⁷, wie den pro-inflammatorischen Zytokinen, Redoxmolekülen (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase, phagozytäre Oxidase, iNOS), Scavenger Rezeptoren (Makrophagenrezeptor mit kollagener Struktur zur Bindung von Lipoproteinen niedriger Dichte), co-stimulatorische Proteine und MHC-II^{33,229,299-302}.

Antigen-Präsentations-assoziierte Marker

MHCII Der MHC-II-Komplex mobilisiert Immunzellen für die Entzündungsreaktion unter pathologischen Bedingungen. Siehe Kapitel 3.1.6.4.1.

Transmembran- und Oberflächenmoleküle

CD16 CD16 und CD32 sind Membranrezeptoren für die Fc-Region von Immunglobulin G. Ihre Aufgabe besteht darin,
CD32 Entzündungssignale zu induzieren²⁷³. Siehe Kapitel 3.1.6.4.2.

CD86 Die Konzentrationen von CD86, einem membranständigen Co-Stimulationsrezeptor, der für die Proliferation von Immunzellen

CD40 und die IL2-Produktion verantwortlich ist sowie von CD40, sind in klassisch aktivierten Mikroglia hochreguliert ²⁶⁹.

Intrazellulär- und Effektorproteine

iNOS Das Stoffwechsellenzym iNOS trägt zur NO-Synthese bei. iNOS-Werte sind bei Entzündung stark erhöht ³⁰³. Siehe Kapitel 3.1.6.4.3.

Sezernierte Moleküle

Zytokine Interleukine pro-inflammatorischer Wirksamkeit, hierzu zählen vorrangig Interleukine der IL1-Familie, IL6, IL12, IL17, IL18, IL23 ¹²³.

Tumornekrosefaktoren initiieren die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen: TNF α (auch: Kachektin), führt über die Radikalbildung zu oxidativem Stress, zur Steigerung der IFN γ -sowie NF- κ B-Synthese ³⁰⁴.

Interferone: IFN γ ist für die Aufrechterhaltung von Entzündungen verantwortlich ^{245,305}.

Chemokine: Die Rolle der Chemokine besteht darin, Immunzellen zu rekrutieren ³⁰⁶.

Extrazelluläre Proteine

Matrix-Metallo-Proteasen Die MMP9 fördert die pro-inflammatorische IL1 β -Reifung ³⁰⁶. MMP- (auch: Gelatinase B, eine Kollagenase) baut die Kollagene IV und V in ihrer nativen Form ab ³⁰⁷ und kann derweise auch menschliches Myelin-Basisprotein abbauen und trägt damit direkt zur Schädigung des Myelins bei ³⁰⁸⁻³¹⁰. MMP9

wurde als Verstärker von Immunfunktionen bezeichnet, da es bei der Peripherisierung von Leukozyten als Reaktion auf Chemokine³¹¹ zu Entzündungsherden hilft und als Schalter und Katalysator beim Zusammenspiel zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem fungiert³¹²⁻³¹⁴.

2.1.6.4.6 Marker des anti-inflammatorischen Phänotyps

Die Aufgabe des alternativen, anti-inflammatorischen Mikroglia-Phänotyps besteht darin, die Entzündung zu stoppen und die Homöostase in der Umgebung wiederherzustellen³¹⁵. Im Gegensatz zum klassischen Aktivierungsweg setzen alternativ aktivierte Mikroglia entzündungshemmende Faktoren frei und produzieren Proteine, die die extrazelluläre Matrix schützen oder zur Phagozytose von Trümmern beitragen³¹⁶.

Transmembran- und Oberflächenmoleküle

CD206 CD206 ist ein in zellulären und endosomalen Membranen lokalisiertes Transmembranglykoprotein in Makrophagen, Mikroglia und Dendritenzellen und gehört zu den C-Typ-Lektinen³¹⁷, die für Endozytoseprozesse über die Erkennung von pathogenen Glykoproteinen und Polysaccharidketten verantwortlich ist^{318,319}. Die N-terminale Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung endständiger Mannose, sulfatierten Glykoproteinen sowie Fucoseresten auf Glykanen, die an Proteine auf der Oberfläche multipler Mikroorganismen gebunden ist, und hilft bei deren Entfernung aus dem Blutkreislauf³²⁰. Um sicherzustellen, dass Erreger entfernt werden, wird CD206 während der Entzündung in geringen und bei Abklingen der Entzündung in hohen Mengen exprimiert³²¹. CD206 initiiert derweise die Phagozytose seines Liganden und immunsuppressive Signalwege, infolgedessen es zu einer Verringerung pro-inflammatorischer Zytokine kommt, während die Expression von entzündungshemmenden Faktoren erhöht wird^{273,322-324}.

CD163 Der Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor CD163 ist für die Beseitigung von oxidativem Hämoglobin verantwortlich, was zu einem anschließenden Abbau von Häm durch die Häm-Oxygenase 1 und der Produktion von Eisen-Ion, Kohlenstoffmonoxid und den entzündungshemmenden Metaboliten führt ³²⁵.

Interzellulär- und Effektorproteine

Ym1 Die sekretorischen Proteine Ym1 und das Resistin-ähnliche Molekül 1 (Found in Inflammatory Zone 1, FIZZ1) sind **FIZZ1** Faktoren, deren Freisetzung von den Spiegeln der entzündungshemmenden Zytokine IL4 und IL13 abhängig ist ^{5,326}.

ARG1 Arginase 1 (ARG1) ist ein Enzym, das die Aminosäure Arginin in Ornithin und Harnstoff umwandelt. Diese wiederum werden zu Prolin und Polyamiden metabolisiert, die für den Gewebeumbau vonnöten sind ³²⁷⁻³²⁹. Da iNOS und ARG1 um dasselbe Substrat, nämlich Arginin, konkurrieren, sollte das Verhältnis des iNOS und ARG1 in aktivierten Mikroglia verglichen werden; die Überexpression von ARG1 führt zu einer Herunterregulierung der NO-Produktion und der iNOS-Expression ³³⁰.

Sezernierte Moleküle

Zytokine Zu den Interleukinen mit anti-inflammatorischer Wirkung gehören nebst dem IL1-Rezeptor-Antagonist, IL4, der transformierende Wachstumsfaktor Beta (Transforming Growth Factor Beta, TGF β) und IL10, sowie der gemeinsame IL4- und IL13-Rezeptor-Antagonist.

In ähnlicher Weise haben Chemokine, zu denen CCL2, CCL22, CCL17, CCL24 gehören, das Ziel der Terminierung der laufenden Entzündung ²⁴⁵.

Um die Vorherrschaft des pro- bzw. anti-inflammatorischen Mikroglia-Phänotyps innerhalb des Kontinuums festzustellen, können die Verhältnisse der Markermengen beider Zustände verglichen werden ^{331,332}.

2.1.6.4.7 Marker der Übergangs-Mikroglia-Phänotypen

Die Aufweichung des streng dichotomen M1-/M2-Konzepts begann mit der zusätzlichen Unterteilung bzw. Beschreibung von Übergangs-Mikroglia-Phänotypen (in der Literatur als M2a, M2b, M2c, M1 21 oder "intermediäre" Mikroglia bezeichnet). Dies gründete auf der Beobachtung, dass Mikroglia zeitgleich Marker der klassischen wie der alternativ aktivierten Form exprimieren können, wie CD86+/CD206+-Mikroglia oder M1-Mikroglia, die spezifische M1-Marker wie MHCII sowie CD86 exprimieren, die aber das typische M2-Zytokinprofil (IL10^{high}/IL12^{low}) exprimieren ^{248,333-336}. Insgesamt geht man aber heute zunehmend davon aus, dass auch die Einteilung in feste intermediäre Mikroglia-Polarisationsphasen nicht ausreicht, um die dynamischen Aktivierungszustände von Mikroglia umfassend zu beschreiben ^{231,247,248}.

2.2 Rheologie des Zentralnervensystems

Faktisch werden alle Zellen durch mechanische Kräfte beeinflusst, so etwa vermag der Einfluss der Mikroumgebung mehr als nur die Morphogenese von Zellen zu beeinflussen, vielmehr finden grundlegende Prozesse in Zellteilung, der Genexpression, der Zellmigration, der Zelladhäsion, der Flüssigkeitshomöostase sowie der Steuerung von Ionenkanälen und den vesikulären Transport statt ³³⁷⁻³³⁹. Im Gehirn verdrehen, biegen, stauchen, dehnen und krümmen sich krafterzeugende und lasttragende Proteine, mit dem Ziel der neuronalen Signalübertragung sowie der Vermittlung von Plastizität. Obwohl die Funktionen mechanosensitiver Proteine in klassisch-sensorischen Systemen eingehend untersucht und beschrieben sind, berücksichtigen viele Modelle derzeit kaum Prinzipien der Zellmechanik mit ihrer besonderen Auswirkung auf zelluläre Funktionen. Dabei ist ein Verständnis der

grundlegenden zellulär-mechanischen Konzepte für die Integration der Mechanobiologie in die laufenden Studien zur Struktur und Funktion des Gehirns unerlässlich³⁴⁰. Hauptmotivation für mechanobiologische Untersuchungen besteht darin, Mechanismen aufzudecken, die es den Zellen ermöglichen, Alterationen mechanischer Eigenschaften ihrer Umgebung als Reiz wahrzunehmen, weiterzuleiten und darauf zu reagieren³³⁸.

2.2.1 Mechanische Eigenschaften des Gehirns

Der Youngsche Modul oder Elastizitätsmodul (auch: E-Modul) eines Materials beschreibt seinen Widerstand als Reaktion auf mechanische Belastung und gewinnt, mit seinem der elastischen Verformung entgegengesetztem Widerstand, an Größe. Daten aus Studien zur Charakterisierung der physikalischen Eigenschaften des Gehirns weisen darauf hin, dass das ZNS-Gewebe mit E-Modulen zwischen 0,1 und 16 kPa ($1 \text{ nN}/\mu\text{m}^2 = 1.000 \text{ Pa}$) zu den weichsten Geweben des Körpers gehört³⁴¹⁻³⁴⁴. Andere Gewebe weisen deutlich höhere Elastizitätsmodule auf. So misst das Youngsche Modul von Bindegewebe und Arterien 0,1 bis 1 MPa, während Knochen Elastizitätsmodule von etwa 15 bis 30 GPa aufweisen³⁴⁵. Studien unter Nutzung der Magnet-Resonanz-Elastographie (MRE), die für die Charakterisierung und Kartierung nicht-linearer viskoelastischer Eigenschaften des intakten menschlichen Gehirns verwendet wurde,^{343,346} weisen darauf hin, dass die Steifigkeit in Abhängigkeit zur untersuchten Hirnregionen substanziell variiert^{343,346,347}. Auch beschreiben sie eine Alteration der mechanischen Eigenschaften mit dem Alter³⁴⁸ und dem Krankheitszustand^{349,350}.

Ursächlich für die niedrigen Elastizitätsmodule des erwachsenen Gehirns und des RM ist das weitgehende Fehlen der Art von ECM, die in den meisten anderen Weichgeweben Gerüste bildet^{351,352}. Neurone und Astrozyten sind mit Integrinen und anderen Transmembranproteinen ausgestattet, die typischerweise mit der Adhäsion von Zellen an eine faserige ECM oder Basalmembran in Verbindung gebracht werden. Das gesunde Gehirn ist auffallend frei von fibrillären Kollagenen oder Fibronectinfibrillen; eine Ausnahme bilden die Hirnhäute, das Gefäßsystem und die BBB³⁵³. Anstelle eines dreidimensionalen Proteingerüsts, das aus einer netzartigen Basalmembran und langen, steifen Fibrillen besteht, die den Raum der meisten Gewebe durchdringen – sogar den von Fettgewebe mit ebenfalls niedrigen

Elastizitätsmodulen³⁵⁴ – besteht die ECM des erwachsenen Gehirns großteilig aus viel weicheren Elementen, wie den anionischen Kohlenhydratpolymeren Hyaluronan und anderen Glykosaminoglykanen, dem Integrin-Liganden Tenascin C und einer großen Anzahl von Proteoglykanen^{352,355}. Im Gehirn scheint die ECM weniger eine strukturelle Stütze zu sein, die dem Gewebe Elastizität verleiht, als vielmehr ein trophischer und topographischer Leitfaden während der Entwicklung und des Umbaus³⁵¹.

Die Rheologie des Gehirns ist aus verschiedenen Gründen von bedeutendem Interesse und daher umfassend untersucht und charakterisiert worden. Die viskoelastischen Eigenschaften des Gehirns bestimmen die Art seiner Verformung infolge von Traumata, wie plötzlichen Stößen^{356,357}, Erschütterungen³⁵⁸, Druckwellen durch Projektile³⁵⁹ oder Explosionen^{356,360}. Unabdingbar sind rheologische Studien ferner für die Entwicklung chirurgischer Methoden³⁶¹ und der Entwicklung neuraler Implantate^{343,346,347,362,363}. Die ungewöhnliche Rheologie des Gehirns und die Mechanosensorik von Neuronen und Gliazellen lassen vermuten, dass Veränderungen der Hirnrheologie während der Entwicklung, bei Verletzungen und Krankheiten einen erheblichen Einfluss auf den pathophysiologischen Zustand haben. Der Zeitverlauf sowie die Verformungen, die für diese verschiedenen Aspekte der Hirnmechanik relevant sind, scheinen sehr unterschiedlich; demnach könnten viskoelastische Parameter auf sehr kleinen Zeitskalen, großen Längenskalen und großen Dehnungsgrößen für die Untersuchung von ZNS-Traumata am relevantesten sein, während große Zeitskalen, kleine Längenskalen und kleine Dehnungen wahrscheinlich für die Mechanismen bedeutsam sind, mit denen ZNS-Zellen die mechanischen Eigenschaften ihrer Umgebung wahrnehmen³⁶⁴.

2.2.2 Elastizitätsmodulierende Faktoren

Heute sind multiple Faktoren bekannt, die die elastischen Eigenschaften des zerebral-intrinsischen Milieus beeinflussen. Die Gewebeelastizität verändert sich beispielsweise während des Alterns³⁶⁵ und im Zusammenhang mit Hirnpathologien³⁶⁶⁻³⁶⁸. Gliale Vernarbung aufgrund von Hirnverletzungen oder Neuroinflammation^{349,367}, zerebrale Neoplasien³⁶⁸ sowie neurodegenerative Erkrankungen^{350,369} sind mit Veränderungen der Gewebeelastizität verbunden. Aus dieser Betrachtung muss hervorgehen, dass Veränderungen in der Gewebzusammensetzung und

Zellarchitektur einen umfassenden und sowohl regional als auch zeitlich divergierenden Faktor darstellen ³⁴⁰.

Eine Erweichung des Nervengewebes wird unter anderem beschrieben für neurodegenerative Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer ^{350,369}, welcher sich durch die Entwicklung pathologischer neuritischer Plaques, intrazellulärer neurofibrillärer Tangles und Neurodegeneration zeigt ³⁷⁰. Die Abnahme der Steifigkeit könnte auf eine Reihe von mikrostrukturellen Ereignissen zurückzuführen sein, die die normale zytoarchitektonische Integrität stören, wie zum Beispiel der Abbau der ECM nach der Ablagerung des hydrophoben Amyloidproteins, die Störung des Zytoskeletts nach der Tau-Hyperphosphorylierung und der Verlust der synaptischen Verbindungsnetze untereinander. Zusätzlich haben Studien mit Hilfe der MRE eine verringerte Hirnsteifigkeit auch bei neuroimmunologischen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose festgestellt ^{349,366,367}, deren Kennzeichen fokale Demyelinisierung, Entzündung, Narbenbildung und (sekundär) axonale Degeneration sind ³⁷¹. Ähnlich berichteten Streitberger und Kollegen über eine verringerte Steifigkeit bei Patienten mit Normaldruckhydrozephalus ³⁷². Auch Hirntumoren können eine Vielzahl histologischer Merkmale aufweisen, wie Kernatypien, verstärkte Proliferation, mikrovaskuläre Proliferation und Nekrose ³⁷³. Diese Veränderungen der Gewebearchitektur beeinflussen die zugrundeliegenden biomechanischen Eigenschaften des Hirngewebes und beruhen zusammengefasst wahrscheinlich auf Veränderungen der ECM, dem Synapsenverlust, Neurodegeneration oder einer Kombination dieser Prozesse ³⁶⁹.

2.3 Ziele der Dissertationsschrift

Ziel der Dissertationsschrift ist die Charakterisierung primärer Mikroglia unter Nutzung weicher, viskoelastischer Polydimethylsiloxan- (PDMS-) basierter Böden bei Subkultivierung, die in Kooperation mit dem „Institute of Neuroscience and Medicine“ des „Department of Cognitive Neuroscience“ sowie dem „Institute of Biological Information Processing“ des „Department of Mechanobiology“ des Forschungszentrum Jülich, zur Untersuchung des Effektes mechanischer Stimuli *in vitro* generiert wurden. Die Nutzung primärer Mikroglia aus der Ratte stellt dabei ein etabliertes Kulturmodell dar ^{228,374}.

Unter der Hypothese, dass der allgegenwärtige Einfluss der Substratelastizität die Funktionen der primären Mikroglia moduliert und sogar die dynamische Reaktion der Mikroglia auf nachfolgende (pro- oder anti-inflammatorische) Reize verändern könnte, erfolgte die Kultivierung primärer Rattenmikroglia auf PDMS-basierten Elastomersubstraten mit unterschiedlicher Steifigkeit, die dem biophysikalischen zerebralen Milieu nachempfunden waren. Primär zielte die vorliegende Studie auf ein besseres Verständnis der bereits beschriebenen morphogenetischen Anpassung auf Umweltreize ab; ferner auf einen ersten Einblick auf die funktionelle Anpassung der Zellen, auf - im Aspekt der rheologischen Eigenschaften - zum ZNS-Milieu weitgehend kongruent konstruierten Elastomerböden. Die Studie machte sich zur Aufgabe, die morphogenetische Transformation der Zellen zu objektivieren, und im Licht der funktionellen Transformation zu bewerten. Zu diesem Zweck wurden unstimulierte Zellen auf ihr Überleben und Proliferationsverhalten untersucht. Auf die Art der funktionellen Transformation im Sinne des M1/M2-Paradigmas wurde unter Nutzung etablierter Mikroglia-Marker geschlossen, die nebst Transmembran- und Oberflächen-Proteinen, Interzellulär- und Effektorproteine sowie sezernierte Moleküle umfassten. Festzustellen war, ob Mikroglia andere Merkmalsausprägungen auf den weichen Substraten aufwiesen als auf den als Referenz mitgeführten konventionellen supraphysiologisch steifen Substratböden, entsprechend unserer Hypothese.

Weiter induzierten wir eine Polarisation der Zellen mit etablierten Stimuli der klassischen Aktivierung, vor dieser die Zellen entweder für 24 Stunden einem entzündungshemmend-alternativen Vorkonditionierungsstimulus oder keinem Vorkonditionierungsreiz ausgesetzt waren, um die Auswirkung der Substratelastizität auf die dynamischen Polarisationsseigenschaften postaktivierter mikroglialer Zellen auf Ribonukleinsäure- (Ribonucleic Acid, RNA-) wie Proteineben zu untersuchen.

Um einen möglichen Mechanismus hinter einigen der durch Elastizität hervorgerufenen Wirkungen auf Mikroglia zu erforschen, untersuchten wir ferner dehnungsabhängige Chloridkanäle, die nachweislich die Aktivierung von Mikroglia vermitteln. Auf diese Weise sollte ein tieferes Verständnis der komplexen Regulierung der Mikroglia bei Gesundheit und Krankheit gewonnen werden, zur besseren Vorhersage der Mikroglia-Reaktion und in der Zukunft möglicherweise Entwicklung neuer Mikroglia-basierter Behandlungsstrategien für neurologische Erkrankungen.

3. Publikation

Der vorliegenden Dissertationsschrift liegt die nachfolgend benannte Publikation „Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia“ mit dem folgenden Abstract zugrunde.

Blaschke SJ*, Demir S*, König A, Abraham J-A, Vay SU, Rabenstein M, Olschewski DN, Hoffmann C, Hoffmann M, Hersch N, Merkel R, Hoffmann B, Schroeter M, Fink GR and Rueger MA (2020) Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 14:590500. doi: 10.3389/fncel.2020.590500.

* Geteilte Erstautorenschaft ³⁷⁵

Sämtliche dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden durch Seda Demir mit Unterstützung insbesondere von Herrn Dr. Stefan J. Blaschke durchgeführt. Die mikroskopische und statistische Auswertung wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Stefan J. Blaschke, dem Postdoktoranden der Arbeitsgruppe „Neurale Stammzellen“ und gleichberechtigtem Erstautor, durchgeführt. Das Manuskript der beiliegenden Publikation mit dem Titel „Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia“ veröffentlicht im *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Blaschke, Demir et al., 2020), die der vorliegenden Dissertationsschrift zugrunde liegt, wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Stefan J. Blaschke verfasst. Herr Dr. Stefan J. Blaschke, Frau Dr. Monika Rabenstein, Herr Dr. Bernd Hoffmann, Frau Dr. Sabine U. Vay, Herr Universitätsprofessor Dr. Michael Schroeter, Herr Universitätsprofessor Dr. G. R. Fink sowie Frau Professorin Dr. Dr. M. Adele Rieger waren an der Planung und Koordinierung der Studie beteiligt und haben das Manuskript zur Publikation kritisch überarbeitet.

Microglia - the brain's primary immune cells - exert a tightly regulated cascade of pro- and anti-inflammatory effects upon brain pathology, either promoting regeneration or neurodegeneration. Therefore, harnessing microglia emerges as a potential therapeutic concept in neurological research. Recent studies suggest that - besides being affected by chemokines and cytokines - various cell entities in the brain

relevantly respond to the mechanical properties of their microenvironment. For example, we lately reported considerable effects of elasticity on neural stem cells regarding quiescence and differentiation potential. However, the impact of elasticity on microglia remains to be explored.

Under the hypothesis that the elasticity of the microenvironment affects vital characteristics and functions of microglia, we established an in-vitro model of primary rat microglia grown in a polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer-based cell culture system. This way, we simulated the brain's physiological elasticity range and compared it to supraphysiological stiffer PDMS controls. We assessed functional parameters of microglia under "resting" conditions, as well as when polarized towards a pro-inflammatory phenotype (M1) by lipopolysaccharide (LPS) or an anti-inflammatory phenotype (M2) by interleukin-4 (IL4).

Microglia viability was unimpaired on soft substrates, but we found various significant effects with a more than two-fold increase in microglia proliferation on soft substrate elasticities mimicking the brain (relative to PDMS controls). Furthermore, soft substrates promoted the expression of the activation marker vimentin in microglia. Moreover, the M2-marker Cluster of Differentiation 206 (CD206) was upregulated in parallel to an increase in the secretion of Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1). Upregulation of CD206 was abolished by blockage of stretch-dependent chloride channels.

Our data suggest that the cultivation of microglia on substrates of brain-like elasticity promotes a primary anti-inflammatory activation state. The results highlight the significance of the omnipresent but mostly overlooked mechanobiological effects exerted on microglia and contribute to a better understanding of the complex spatial and temporal interactions between microglia, neural stem cells, and glia in health and diseases



Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia

Stefan J. Blaschke^{1,2†}, Seda Demir^{1†}, Anna König¹, Jella-Andrea Abraham^{1,3}, Sabine U. Vay¹, Monika Rabenstein¹, Daniel N. Olschewski¹, Christina Hoffmann³, Marco Hoffmann³, Nils Hersch³, Rudolf Merkel³, Bernd Hoffmann³, Michael Schroeter¹, Gereon R. Fink^{1,2} and Maria A. Rueger^{1,2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Jong Eun Lee,
Yonsei University, South Korea

Reviewed by:

Se-Young Choi,
Seoul National University,
South Korea
Doris Lam,
Department of Energy (DOE),
United States

*Correspondence:

Maria A. Rueger
maria.rueger@uk-koeln.de

[†]These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Non-Neuronal Cells,
a section of the journal
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 01 August 2020

Accepted: 12 October 2020

Published: 05 November 2020

Citation:

Blaschke SJ, Demir S, König A, Abraham J-A, Vay SU, Rabenstein M, Olschewski DN, Hoffmann C, Hoffmann M, Hersch N, Merkel R, Hoffmann B, Schroeter M, Fink GR and Rueger MA (2020) Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 14:590500. doi: 10.3389/fncel.2020.590500

¹Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital, The University of Cologne, Cologne, Germany, ²Department of Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Research Centre Jülich, Jülich, Germany, ³Department of Mechanobiology, Institute of Biological Information Processing (IBI-2), Research Centre Jülich, Jülich, Germany

Microglia—the brain’s primary immune cells—exert a tightly regulated cascade of pro- and anti-inflammatory effects upon brain pathology, either promoting regeneration or neurodegeneration. Therefore, harnessing microglia emerges as a potential therapeutic concept in neurological research. Recent studies suggest that—besides being affected by chemokines and cytokines—various cell entities in the brain relevantly respond to the mechanical properties of their microenvironment. For example, we lately reported considerable effects of elasticity on neural stem cells, regarding quiescence and differentiation potential. However, the effects of elasticity on microglia remain to be explored. Under the hypothesis that the elasticity of the microenvironment affects key characteristics and functions of microglia, we established an *in vitro* model of primary rat microglia grown in a polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer-based cell culture system. This way, we simulated the brain’s physiological elasticity range and compared it to suprphysiological stiffer PDMS controls. We assessed functional parameters of microglia under “resting” conditions, as well as when polarized towards a pro-inflammatory phenotype (M1) by lipopolysaccharide (LPS), or an anti-inflammatory phenotype (M2) by interleukin-4 (IL-4). Microglia viability was unimpaired on soft substrates, but we found various significant effects with a more than two-fold increase in microglia proliferation on soft substrate elasticities mimicking the brain (relative to PDMS controls). Furthermore, soft substrates promoted the expression of the activation marker vimentin in microglia. Moreover, the M2-marker CD206 was upregulated in parallel to an increase in the secretion of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1). The upregulation of CD206 was abolished by blockage of stretch-dependent chloride channels. Our data suggest that the cultivation of microglia on substrates of brain-like elasticity promotes a basic anti-inflammatory activation state *via* stretch-dependent chloride

channels. The results highlight the significance of the omnipresent but mostly overlooked mechanobiological effects exerted on microglia and contribute to a better understanding of the complex spatial and temporal interactions between microglia, neural stem cells, and glia, in health and disease.

Keywords: neuroinflammation, microglia, elasticity, polarization, vimentin

INTRODUCTION

As primary immune cells of the central nervous system (CNS), microglia mediate, and regulate neuroinflammation in health and disease (Ransohoff and El Khoury, 2015). A plethora of stimuli impact microglia function, both under physiological as well as under pathological conditions (Stoll et al., 2002; Hanisch and Kettenmann, 2007). Microglia do not only exert (neuro)-inflammation and cell phagocytosis but also possess supportive functions associated with regeneration such as the induction of synaptic pruning and neuronal plasticity (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012). A tightly controlled regulation of both initiation and termination of microglial activation is vital for healthy development (Lenz and Nelson, 2018) and homeostasis of the CNS (Walberer et al., 2014; Yin et al., 2017). Understanding this complex interplay might expedite microglia-directed therapies in the future (Kim et al., 2015). In parallel to the subdivision of activation states of macrophages in other organs, a pro-inflammatory (M1) and an anti-inflammatory (M2) phenotype in microglia have been proposed upon activation (Tang and Le, 2016) with transitional states in between (Vay et al., 2018). While this concept has been a subject of thorough investigation, more in-depth knowledge of influencing factors, transitional states, or state reversibility is needed to develop novel therapeutic options targeting the microglial response to pathology.

Thus far, most research has addressed the effect of soluble factors like chemokines, cytokines, or other means of cell-cell interaction (Kettenmann et al., 2011; Vay et al., 2018). In contrast, little is known about mechanobiological effects on microglia (Goriely et al., 2015). However, mechanical cues constitute an abundant and regionally as well as temporally diverging factor, the influence of which is often neglected. Tissue elasticity, mostly determined by the properties of the extracellular matrix (ECM), is remarkably different within the brain as one of the softest tissues of the body (Tyler, 2012), but changes, e.g., during aging (Arbogast et al., 1997; Arani et al., 2015), and in the context of brain pathology (Schregel et al., 2012; Streitberger et al., 2012; Chauvet et al., 2016). Glial scarring due to brain injury or neuroinflammation (Wuerfel et al., 2010; Streitberger et al., 2012), cerebral neoplasia (Chauvet et al., 2016) as well as neurodegenerative diseases such as Alzheimer's (Murphy et al., 2011), are associated with changes in tissue elasticity. The change of viscoelastic properties of the CNS is claimed to be a sensitive biomarker of CNS pathology and, consequently, exploited to assess pathological processes by innovative MRI techniques (MRI elastography; for review see Murphy et al., 2019).

We and others have previously shown that a simulation of mechanical properties on CNS cells *in vitro* is feasible and allows analyzing cell functions under more physiological conditions than provided by regular cell cultures, uncovering essential aspects and mechanobiological properties of neural stem cells and neurons (Pathak et al., 2014; Abraham et al., 2019; Blaschke et al., 2019). Overall, mechanical properties alter the development and behavior not only of mesenchymal stem cells (Murphy et al., 2011), hematopoietic stem cells (Kumar et al., 2013), and cardiomyocytes (Hersch et al., 2013) but also of neural cells like neurons (Abraham et al., 2019), astrocytes (Moshayedi et al., 2014), and neural stem cells (Blaschke et al., 2019). While single reports describe morphological alterations of microglia dependent on underlying substrate elasticity (Moshayedi et al., 2014; Bollmann et al., 2015), the impact of elasticity on microglia at the functional level to date remains elusive.

We previously proposed polydimethylsiloxane (PDMS)-based substrates as a suitable *in vitro* model for the investigation of mechanical influences, given smooth surface topography and excellent biocompatibility (Schellenberg et al., 2014; Abraham et al., 2019; Blaschke et al., 2019). We here hypothesize that the ubiquitous influence of substrate elasticity modulates primary microglia functions and might even alter dynamic microglia reaction upon subsequent stimuli. Accordingly, we here cultivated primary rat microglia on PDMS-based elastomeric substrates of varying stiffness to mimic the biophysical cerebral milieu and analyzed the impact on microglial activation and polarization *in vitro*. Thereby, a more in-depth understanding of the complex regulation of microglia in health and disease states will be gained, allowing better prediction of microglia response and, eventually, novel microglia-based treatment strategies.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Elastomeric Silicone Rubber Substrates

Microglia were seeded on PDMS based substrates with different elastic moduli obtained through variation in the composition of the base (vinyl terminated PDMS) and cross-linkers (methyl-hydro siloxane-dimethylsiloxane) copolymer of a two-component system (Sylgard 184, Dow Corning, Wiesbaden, Germany). Mixing ratios of 10:1, 70:1, and 75:1 (base:cross-linker) were used and elastomers were prepared, as described previously (Hersch et al., 2013). Elastomers were cross-linked at 60°C for 16 h as thick layers in cell culture dishes (Nunc Multidishes, 4-Well, flat bottom, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The calibration of the elasticity of all cross-linked elastomeric mixtures was controlled

accurately by indentation, as described before (Ulbricht et al., 2013), to result in elasticities of 1.2 MPa (10:1), 1 kPa (70:1), and 0.6 kPa (75:1).

Microglia Isolation and Cultivation

Cortices of neonatal Wistar rats of postnatal day one to three were used to obtain primary microglial cell cultures as previously described (Rabenstein et al., 2016). In brief, pups were decapitated, and meningeal layers, as well as blood vessels, were removed. The cortices were incubated in trypsin/EDTA solution (1% trypsin; 0.025% EDTA) for 15 min at 37°C. Afterward, culture medium [Dulbecco's essential medium (DMEM) with the addition of 10% fetal bovine serum (FBS)], 1% penicillin/streptomycin, and 2 mM L-glutamine was added to stop trypsinization. After removal of trypsin, the cortices were mechanically dissociated, and the cells were resuspended in fresh DMEM and transferred into culture flasks to grow at 37°C with 5% CO₂ for 10 days, with a change of medium after 3 days. Pure microglial cell subcultures were acquired through detaching microglial cells from the astrocytes co-cultured initially by shaking the culture flasks for 1 h at 250 rpm in an orbital shaker at steadily 37°C. The cells were seeded at a density of 5×10^4 cells per well on various formulations of PDMS-coated plates. As normalization controls, cells were additionally seeded on conventional glass coverslips used for cell culture. At least three independent samples from at least two different preparations were used, with the exact number of replicates individually stated below.

Stimulation

To analyze the effect of external stimuli, microglia polarization was induced by either LPS or IL-4. Two hours after subcultivation, the cell medium was replaced, and microglia were stimulated with 50 ng/ml LPS or 100 ng/ml IL-4, compared to no stimulation. To subsequently assess microglia memory, cells were treated with IL-4 or no stimulation 24 h before treatment with LPS, as described above.

Blockage of Stretch-Dependent Cl⁻ Channels

Primary microglia were seeded on soft PDMS substrates of 0.6 kPa and cultivated for 24 h. Microglia seeded on conventional glass substrates served as controls. Cells on soft substrates were either treated with 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), an anion exchange inhibitor previously shown to block stretch-activated Cl⁻ currents (Eder et al., 1998; Hines et al., 2009), or its dissolvent, KHCO₃ as a negative control for 24 h. Afterward, RNA was extracted for further analyses, as described below.

Immunocytochemistry

After cell fixation with 4% paraformaldehyde for 10 min, cells were subsequently stained with primary antibodies against iNOS (mouse mAB ab49999 Abcam, Cambridge, UK), against vimentin (mouse mAB ab92547 Abcam, Cambridge, UK), against Iba-1 (rabbit mAB 019-19741, WAKO, Neuss, Germany), and with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Before staining for BrdU, cells were incubated in 2 N HCl for 30 min for antigen retrieval. For visualization, fluorescein-labeled anti-mouse immunoglobulin (goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor TM 488, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-rabbit IgG (goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor TM 568, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used. Cells were counted manually using ten randomly selected pictures per trial (FOV = 730 × 550 μm), taken with a Keyence BZ-9000 inverted fluorescence microscope (Keyence Osaka, Japan). On average, 85 cells per image were evaluated.

Using the ImageJ software (Laboratory of Optical and Computational Instrumentation; Wisconsin, USA), the cell area and roundness of microglial cells, chosen as a criterion of morphology, were measured. Roundness is defined here as $area/(\pi b^2)$, where b denotes the longer half axis of the ellipse with equal second central moments as the cell outline.

Cell Viability Assay

To assess cell viability, dead microglia were stained with propidium iodide (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and counterstained, irrespective of viability, with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich GmbH; St. Louis, MO, USA) after 24 or 48 h of cultivation. Fluorescence microscopy was performed as described above. To compare the number of living cells across conditions, a ratio of propidium negative (vital) cells to all cells stained by Hoechst 33342 was assessed. In addition to the live/dead assay, cell death was indirectly assessed measuring lactate dehydrogenase (LDH) release into the media using a colorimetric assay (Pierce LDH assay kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The experiment was performed according to the manufacturer's protocol. The intensity of the red color formed in the assay was measured at a wavelength of 490 nm (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany), being proportional to LDH activity and thus correlating with the number of damaged cells. Results were normalized to lysed cells as a positive control, while blank culture media served as a negative control.

BrdU Assay

To assess the ratio of proliferating cells, 10 μM bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich GmbH; St. Louis, MO, USA) was added to the cells 6 h before fixation with 4% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Sciences; Hatfield, PA, USA). After immunocytochemical staining, fluorescence microscopy was performed as described above. To compare proliferating cells across conditions, a ratio of BrdU positive proliferating cells to all cells stained by Hoechst 33342 was assessed. Ten random images per sample were taken as described above.

Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

RNA was extracted from cultivated cells using the GeneUP total RNA mini Kit (Biotech rabbit; Henningsdorf, Germany), following the manufacturer's recommendations, while respecting the stimulation protocol. The total RNA concentration and purity were evaluated photometrically. Total RNA was converted to cDNA using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen; Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol.

TABLE 1 | Primer sequences and parameters used for real-time quantitative PCR (RT-qPCR).

RNA	Sequences forward/ backward 5'–3'	Temp. (C°) Step 1/2/3	Duration (s) Step 1/2/3
iNOS	GCTTGCTCTGGGTCCTCTG/ CTCACTGGGACAGCACAGAA	95/59/72	15/15/45
CD206	AACAAGAATGGTGGGCGATC/ CCTTTCAGTCTTTGCAAGC	95/56/72	15/15/45
Ki67	TCTTGGCACTCACAGTCCAG/ GCTGGAAGCAAGTGAAGTCC	95/58/72	15/15/45
Vimentin	GCAGCCTCTATTCTCGTCC/ TAGTTGGCGAAGCGGTCATT	95/60/72	15/15/45
IL-6	CCCAACTTCCAATGCTCTCT/ AGCACACTAGGTTTGCCGAG	95/57.3/72	15/15/45
CD68	GGACACTTCGGGCCATGCTT/ CCTACAGAGTGGACTGGAGC	95/60/72	15/15/45
RPL13a	TCCAGGAGCTGTTCAAGCG/ CAACACCTTGAGGCGTTCCA		

All primers were obtained from Biologio (Nijmegen, The Netherlands) and were enlisted, along with the thermal cycler conditions (Table 1). Sample amplification and quantification were executed in the CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). The integrity of the PCR products was evaluated by melting point analysis and agarose gel electrophoresis. Each sample was normalized to ribosomal protein L13a (RPL13a; $\Delta\Delta Cq$) as a reference gene and the experimental control condition ($\Delta\Delta Cq$). Mean fold changes were expressed as $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$.

Griess Assay

NO release was quantified using a Griess reagent kit (Biotium; Hayward, CA, USA). Accordingly, the supernatant was incubated with Griess reagent, and the NO concentration was evaluated under the manufacturer's protocol by measuring the optical density (OD) of each sample at 548 nm in a plate reader (FLUOstar Omega; BMG LABTECH; Ortenberg, Germany). Results were normalized to standardized measurements.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

The concentrations of pro- (IL-1b) and anti-inflammatory proteins (IGF-1) within the culturing media were measured 24 or 48 h after sub-cultivation. Using the mouse/rat IGF-1 Quantikine ELISA Kit or Rat IL-1 β /IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (#MG100 or #RLB00; R&D Systems; Minneapolis, MN, Canada), the concentration was measured following the manufacturer's protocol. OD measurements were performed in the plate reader (FLUOstar Omega; BMG LABTECH; Ortenberg, Germany) at 450 nm wavelength with additional measurements at 540 nm to exclude unspecific signals. Results were normalized to standardized measurements.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics (Version 25, International Business Machines Corporation IBM, Armonk, NY, USA). Group differences were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) in case of a normal distribution as verified by inspection of data distribution and Shapiro–Wilk test.

Additionally, *post hoc* Tukey's HSD—in case of equal variances across groups—or Games-Howell test in heteroscedasticity were performed to control for multiple comparisons. Otherwise, a Kruskal–Wallis test with *post hoc* Bonferroni correction was conducted. Furthermore, to assess the additional effect of LPS stimulation across the elasticity range, a two-way ANOVA was conducted with elasticity and LPS stimulation as independent variables on vimentin expression in microglia.

Additionally, to further assess within-group differences, simple effects analysis with *post hoc* Bonferroni correction was performed. Statistical significance was assumed at $p < 5\%$. Besides the descriptive statistic given by the mean (M) and standard deviations (SD), effect sizes are reported as omega squared (Ω^2) or the correlation coefficient r in case of nonparametric tests. Results were displayed as boxplots showing the median, quartiles, and extreme values, with outliers exceeding the quartile by 1.5-fold of the interquartile range displayed as dots.

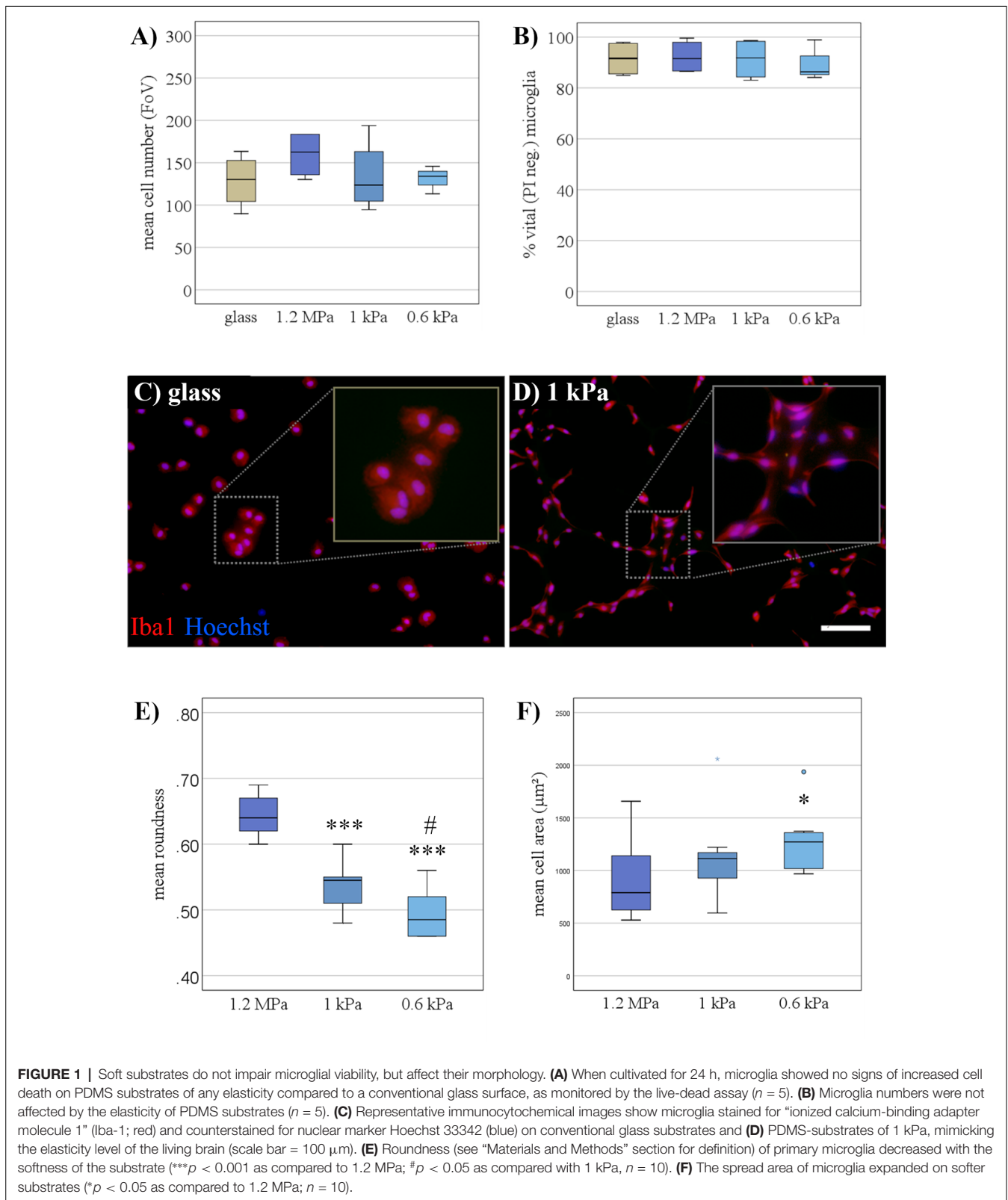
RESULTS

Soft Substrates Do Not Impair Microglial Viability but Affect Their Morphology

First, the viability of primary microglia grown for 24 h on soft PDMS-based substrates (1 kPa, < 1 kPa) was assessed in comparison to substrates of higher stiffness (1.2 MPa). There was no evidence of impaired cell viability as assessed by propidium iodide positive dead cells (Figure 1A) or overall cell number (Figure 1B), suggesting the PDMS substrates to be a suitable culture system for *in vitro* characterization of microglia. The purity of cultures was assessed by Iba-1 staining, yielding more than 90% Iba-1 positive microglial cells irrespective of substrate condition (Figures 1C,D). Furthermore, cell morphology of resting microglia was altered when cultured on softer substrates, predominantly displaying an elongated shape (Figure 1D). This was quantified as a significant decrease in cell roundness over the stiffness gradient ($F_{(2,27)} = 48.8$, $p < 0.001$, $\omega^2 = 0.88$; Figure 1E) with significant differences between both softer substrates compared to the stiffer PDMS-control, as well as even between the softest conditions (1 vs. < 1 kPa; Figure 1E). Stainings confirmed that morphologically different microglia still expressed both the characteristic constitutive microglial marker CD11b as well as Iba-1 as a marker for activated microglia, while they did not express GFAP, indicating that there was no contamination with astrocytes (Supplementary Figure 1). Additionally, the mean cell spread area was significantly altered by substrate elasticity ($H_2 = 6.9$, $p < 0.05$), with a significant increase by about 29% on the softest substrates ($M = 1,260 \mu\text{m}^2$, $SD = 90 \mu\text{m}^2$) compared to stiffer controls of 1.2 MPa ($M = 900 \mu\text{m}^2$, $SD = 110 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$, $r = 0.83$; Figure 1F).

Increased Microglia Proliferation on Soft Substrates Under Resting Conditions

As a next step, the proliferative capacity of microglia was assessed when cultured on substrates of varying stiffness. Proliferative



capacity increased on softer substrates as evaluated by BrdU uptake over 6 h (Figures 2A,B). The increase in proliferation on softer substrates was statistically significant ($F_{(2,12)} = 8.8$,

$p < 0.05$, $\omega^2 = 0.4$) with *post hoc* analyses revealing differences between substrates of 1 kPa ($M = 5.8\%$, $SD = 0.8\%$; $p < 0.05$) and the softest condition of <1 kPa ($M = 6\%$, $SD = 0.8\%$; $p < 0.05$;

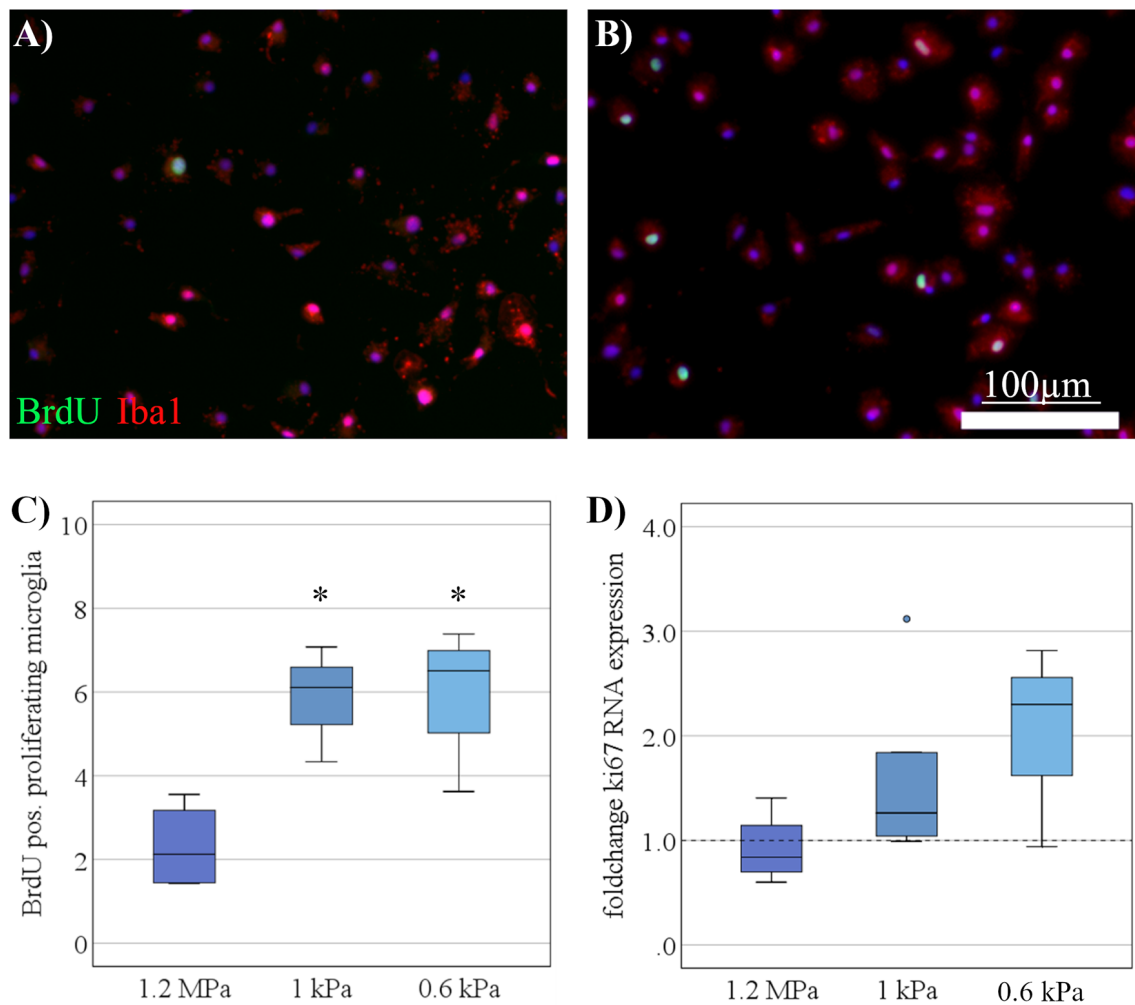


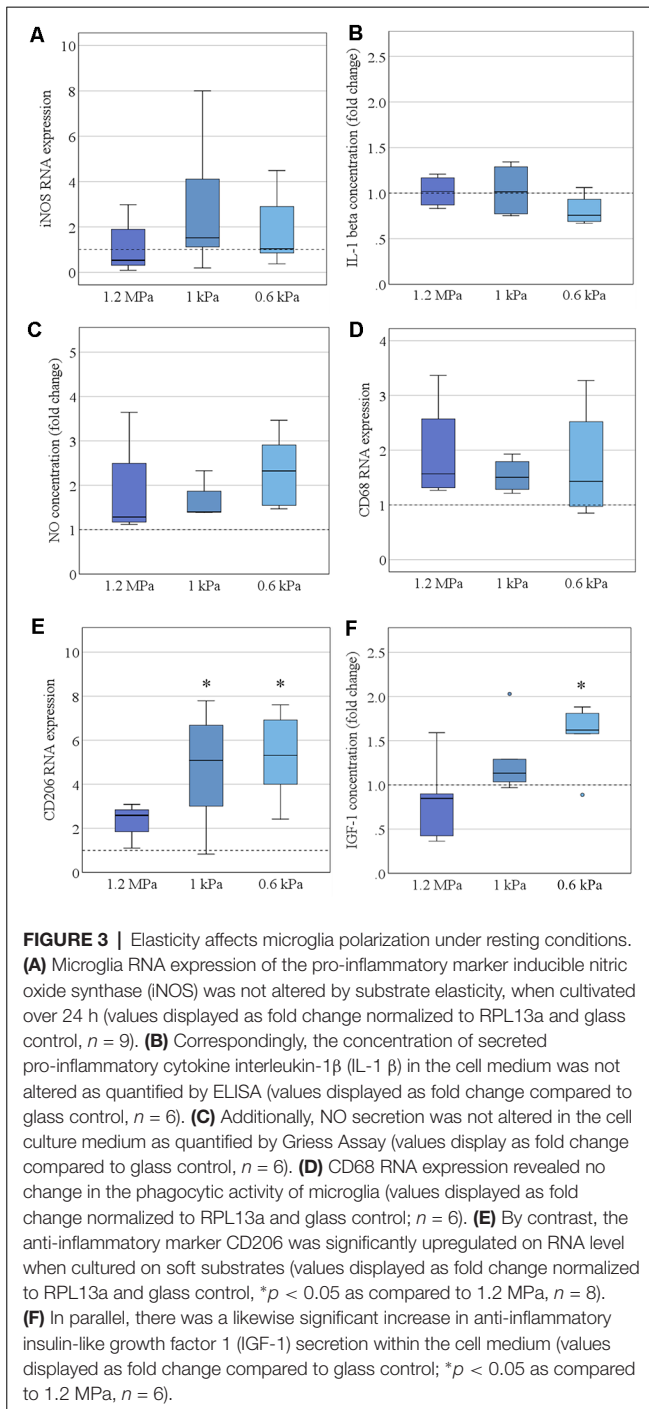
FIGURE 2 | Increased microglia proliferation on soft substrates under resting conditions. **(A)** Representative images show Iba-1 positive microglia (red) double-stained for BrdU (green) to detect proliferating cells on substrates of 1.2 MPa, and **(B)** soft substrates of 0.6 kPa (scale bars = 100 μ m). **(C)** Microglia proliferation measured by bromodeoxyuridine- (BrdU-) incorporation over 6 h increased with substrate elasticity ($*p < 0.05$ as compared to 1.2 MPa; $n = 7$). **(D)** In parallel, changes in microglia mRNA expression of Ki67 yielded an increasing yet statistically not significant trend on softer substrates (values displayed as fold change normalized to RPL13a and glass control; $n = 5$).

Figure 2C), both compared to stiffer controls ($M = 2.3\%$, $SD = 0.5\%$). We found a likewise, albeit non-significant, increase in ki67 mRNA expression on softer substrates (Figure 2D).

Elasticity Affects Microglia Polarization Under Resting Conditions

Consecutively, we assessed the spontaneous functional alteration of primary microglia cultured on soft substrates. Representative markers of pro- or anti-inflammatory microglia polarization states were assessed on the mRNA—as well as on the protein level. There was no pro-inflammatory alteration concerning varying stiffness levels, as assessed neither by iNOS mRNA expression (Figure 3A) nor by secretion of interleukin-1 β (Figure 3B). Likewise, the secretion of NO into the medium

was not altered on softer substrates (Figure 3C). There was no evidence of an increase in the phagocytic activity of microglia as evaluated by CD68 mRNA expression (Figure 3D). However, there was a significant increase in CD206 mRNA expression in an elasticity-dependent manner ($F_{(2,18)} = 4.9$, $p < 0.05$, $\omega^2 = 0.29$; Figure 3E). We saw a more than 2-fold increase in CD206 levels on the softest substrates ($M = 5.3$, $SD = 0.95$) compared to stiffer controls of 1.2 MPa ($M = 2.3$, $SD = 0.24$). In parallel, we found a likewise significant increase in IGF-1 secretion within the cell medium ($H_2 = 7.6$, $p = 0.02$, $r = 0.78$), with *post hoc* analyses revealing an almost two-fold increase on the softest substrates ($M = 1.6$, $SD = 0.14$, $p = 0.02$), compared to substrates of 1.2 MPa ($M = 0.8$, $SD = 0.2$; Figure 3F).



Activation Marker Vimentin Is Differentially Expressed Dependent on Substrate Elasticity

To further assess the effects of elasticity on microglial activation, we quantified vimentin expression as a marker of microglial activation. Vimentin RNA expression was evaluated both under resting conditions and after stimulation with LPS (as a strong pro-inflammatory stimulus). Data were fed into a two-way ANOVA to test for the interaction effect of stimulation

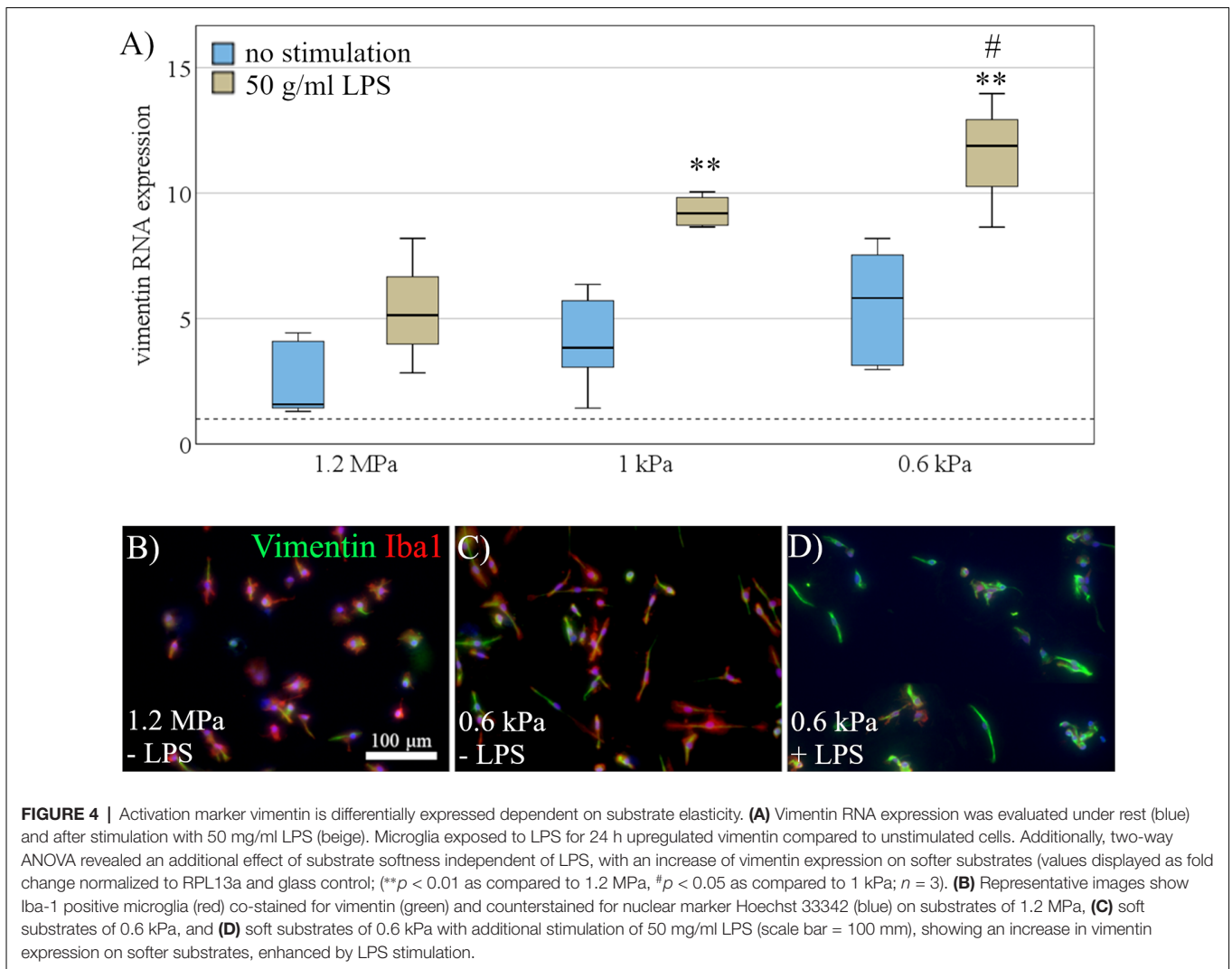
and substrate stiffness, as well as both effects independently (Figure 4A). As expected, there was a significant effect of LPS stimulation on vimentin expression ($F_{(1,21)} = 33.6$, $p < 0.001$, $\omega^2 = 0.42$; Figure 4A). Most interestingly, while we found no significant interaction effect, there was an additional effect of substrate stiffness independent of LPS stimulation ($F_{(2,21)} = 10.1$, $p < 0.01$, $\omega^2 = 0.25$; Figure 4A). Further analyses for within-group effects revealed a significant increase in vimentin expression on LPS treated cells between the softest substrates ($M = 11.5$, $SD = 2.7$) compared to substrates of 1.2 MPa ($M = 5.4$, $SD = 2.6$, $p < 0.01$), while there was a likewise non-significant trend between the same groups in the unstimulated group (Figure 4A). Additionally, microglia were stained immunocytochemically for vimentin to detect vimentin on the protein level. Qualitatively—and corresponding to mRNA data—there was an increase in vimentin expression on softer substrates, additionally boosted by LPS stimulation, as shown by vimentin staining of Iba-1 positive microglia (Figures 4B–D).

Dynamic Microglia Polarization Is Independent of Substrate Elasticity

Next, we investigated the effect of substrate elasticity on dynamic polarization properties of microglia. To this end, microglia, seeded on substrates of varying stiffness, were stimulated with LPS for 24 h to induce a pro-inflammatory activation phenotype. Before LPS stimulation, microglia received either an anti-inflammatory preconditioning stimulus (IL-4) for 24 h, or no preconditioning stimulus, respectively (Figure 5A). Markers of pro-inflammatory microglia polarization were subsequently assessed on RNA and protein level. Anti-inflammatory pre-stimulation led to a significant reduction of pro-inflammatory markers upon LPS, constituting a microglia memory (Vay et al., 2018). In detail, a preceding exposure to IL-4 mitigated the pro-inflammatory response of microglia in terms of iNOS RNA expression (mean fold change no pro-conditioning = 1.2, $SD = 0.6$; mean IL-4 = 0.12, $SD = 0.05$; $F_{(1,29)} = 46.9$, $p < 0.001$, $\omega^2 = 0.62$; Figure 5B), iNOS staining (mean fold change no pro-conditioning = 72.5% iNOS positive microglia, $SD = 6.8\%$; mean IL-4 = 27.1%, $SD = 6.1\%$; $F_{(1,29)} = 466.8$, $p < 0.001$, $\omega^2 = 0.93$; Figures 5C–E), IL-1 β secretion (mean fold change no pro-conditioning = 1.3, $SD = 0.5$; mean IL-4 = 0.5, $SD = 0.3$; $F_{(1,17)} = 43.2$, $p < 0.001$, $\omega^2 = 0.75$; Figure 5F), and IL-6 RNA expression (mean fold change no pro-conditioning = 1.4, $SD = 0.9$; mean IL-4 = 0.2, $SD = 0.12$; $F_{(1,29)} = 30.9$, $p < 0.001$, $\omega^2 = 0.5$; Figure 5G). However, there was no specific effect of elasticity on their activation parameters in the context of “microglia memory.”

Blockage of Chloride Channels Reverses Elasticity Dependent Effects

To explore a potential mechanism behind some of the elasticity-evoked effects on microglia, we blocked stretch-dependent chloride-channels, previously shown to mediate microglial activation (Eder et al., 1998; Hines et al., 2009). Primary microglia were seeded on substrates of 0.6 kPa and treated with DIDS to block chloride channels. In order to establish a dosing regime, various concentrations of DIDS ranging from 250 μM

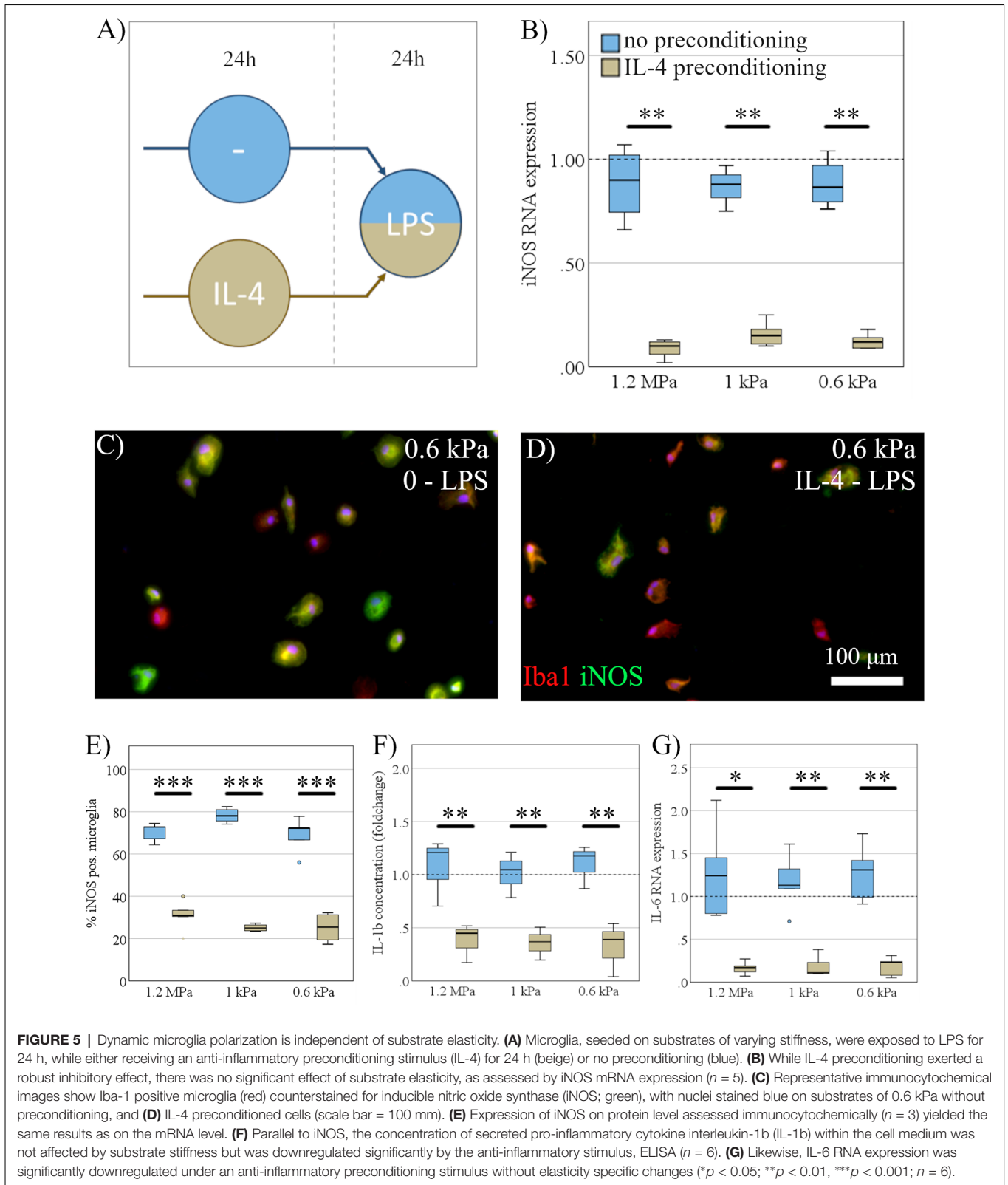


to 1 mM were tested. There were dose-dependent signs of cell impairment under high concentrations of DIDS, as indicated by a significant increase in LDH release ($H_4 = 31$, $p < 0.001$; **Figure 6A**), with a significant increase in LDH when treated with concentrations of 1 mM ($M = 56\%$ of positive control, $SD = 7.9\%$; $p < 0.001$) and 750 μM ($M = 45\%$, $SD = 6.9\%$; $p < 0.01$), compared to negative controls treated with KHCO_3 ($M = 29\%$, $SD = 7.9\%$). As a concentration of 500 μM DIDS did not negatively affect microglia as shown by both LDH release assay (**Figure 6A**) and propidium iodide staining (**Figures 6B,C**), this concentration was chosen to block chloride channels for further experiments. After 24 h of cultivation, blockage with DIDS completely abolished CD206 RNA expression induced in microglia by soft substrates 0.6kPa ($M = 0.8$, $SD = 0.4$) compared to control ($M = 4.9$, $SD = 4.1$; $t_{(8)} = -2.5$, $p < 0.05$, $d = 0.89$; **Figure 6D**). Furthermore, we saw a likewise, yet non-significant, trend on vimentin expression (control: $M = 3.3$, $SD = 1.3$; DIDS: $M = 0.45$, $SD = 0.14$; $t_{(11)} = 4.2$, $p = 0.07$; **Figure 6E**), while no difference was observed on iNOS expression (control: $M = 2.1$, $SD = 2.5$; DIDS = 1.7; $SD = 1.2$; $t_{(11)} = 0.1$, $p = 0.7$; **Figure 6F**).

DISCUSSION

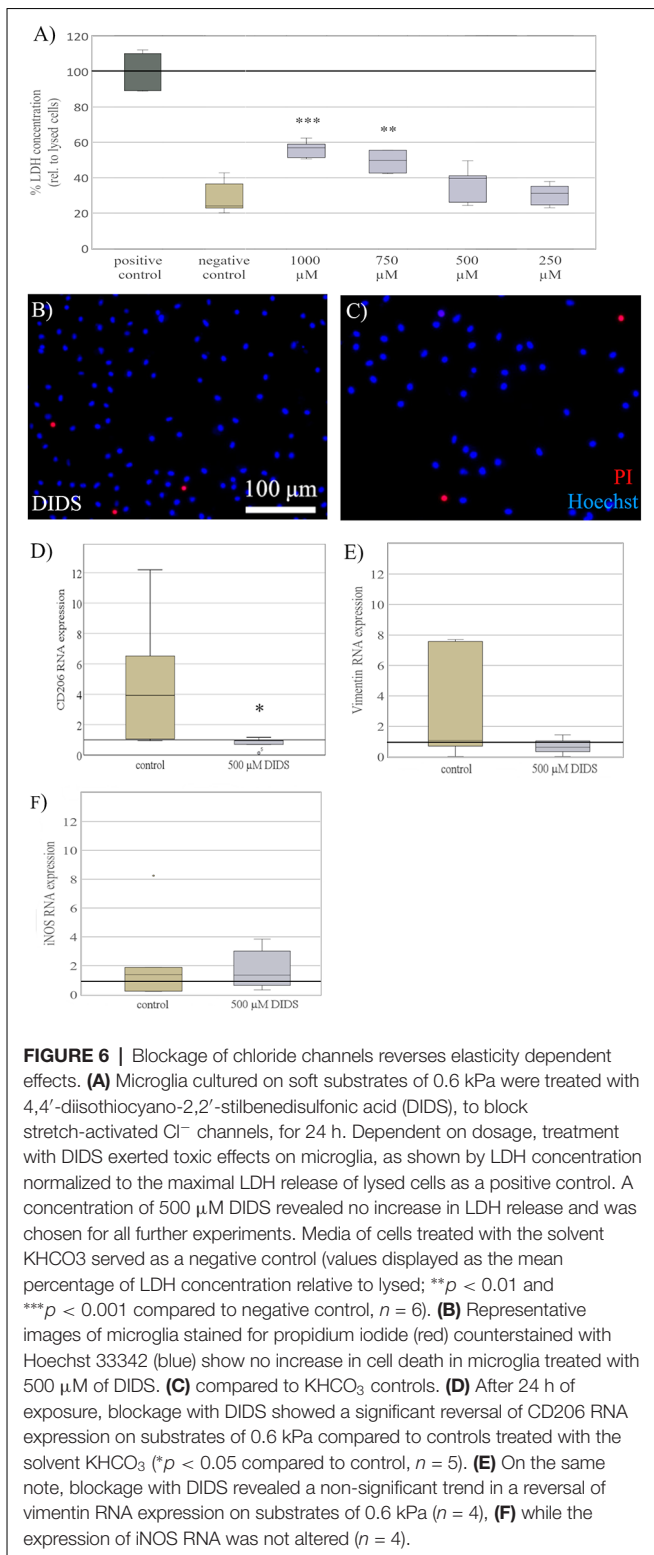
While previously shown to affect various cell entities, like cardiomyocytes, neural stem cells, and neurons, the effects of elasticity of the microenvironment on microglia function remain elusive. As relevant viscoelastic alteration of neural tissue is induced by chronic inflammation (Streitberger et al., 2012; Millward et al., 2015), stroke (Freimann et al., 2013), or aging (Arbogast et al., 1997; Arani et al., 2015), further knowledge about elasticity-dependent microglia function will help to understand microglia action in disease better and possibly support directed therapeutic strategies.

To this end, we present evidence that substrate elasticity alters microglia morphology and substantially influences functional properties and activation markers of primary microglia *in vitro*. Importantly, the soft substrates resemble much more the elasticity of brain tissue than glass or plastic plates commonly used to culture microglia. Hence, the use of soft substrates may help to establish a more physiological environment in microglia culture experiments.



Our results indicate that microglia are converted to CD206 expressing microglia—one of the markers associated with M2-like microglia—when cultured on soft substrates

mimicking the brain’s elasticity. Additionally, these changes are accompanied by a significant increase in proliferative activity, while overall microglial activation is enhanced as indicated



by vimentin expression. In line with our results, Bollmann et al. (2015) reported that microglial morphology is affected by the microenvironment's stiffness. Using polyacrylamide (PAA) substrates, they described a more complex microglia morphology displaying predominantly elongated shapes on softer substrates

(Bollmann et al., 2015). While we here used cell roundness as a more general metric to quantify cell complexity, we found similar changes within the upper range of brain elasticity around 1 kPa. As known from the classical descriptions, microglial activation goes along with changes in cell morphology (Streit et al., 1988; Stoll et al., 1998). A highly arborized shape is associated with a resting microglia state while rounded stellate or even amoeboid shapes characterize activated microglia (Kreutzberg, 1996). Altogether, we suggest that microglia on soft substrates display essential properties of de-activated or resting microglia, more than microglia on hard substrates.

At the functional level, a previous report by Moshayedi et al. (2014) describes an increase in inflammatory microglia markers when cultured on stiffer substrates, as assessed by DNA microarray. Alike, we here observed an increase in anti-inflammatory markers on softer substrates, while we did not detect an alteration in pro-inflammatory markers. Additionally, converging with previous studies connecting anti-inflammatory states with microglial proliferation (Pepe et al., 2017; Vay et al., 2018), we found soft substrates to increase cell proliferation significantly.

Moreover, we observed a robust increase in vimentin expression by microglia cultured on softer substrates. Previous reports suggested an indispensable role of vimentin for initiating microglial activation (Jiang et al., 2012), as a marker of cell activation after axotomy (Graeber et al., 1988) or spinal cord injury (Noristani et al., 2017). Based on the importance of vimentin for microglial activation, the current data suggest a relevant impact of substrate elasticity on microglial activation, besides the predicted increase in vimentin expression upon LPS stimulation.

To sum up the functional aspects, we suggest that microglia on soft substrates are primarily resting, but more in a ready-to-respond state than glass-plated microglia, as indicated by the increased proliferation capacity, mannose receptor expression (CD206), and vimentin expression. Within health and disease, microglia exert both pro-inflammatory (rather neurotoxic) or anti-inflammatory (rather neuroprotective) properties dependent on the given state of activation and polarization, all within a continuous and dynamically changing spectrum (Vay et al., 2018). Accordingly, microglia exhibit overlapping characteristic pro-inflammatory ("M1-like") or anti-inflammatory ("M2-like") markers, while "resting" microglia appear to display a more M2-like phenotype (Franco and Fernández-Suárez, 2015; Vay et al., 2018), which is in line with our findings. Moreover, tight temporal regulation and termination of microglia activation are vital, to ensure an adequate disease-state specific microglia reaction, i.e., after stroke (Hu et al., 2012; Walter et al., 2015), traumatic brain injury (Ramlackhansingh et al., 2011) or neurodegenerative disease (Hickman et al., 2018).

In the aging and diseased CNS, the stiffness of CNS tissue often decreases (Hiscox et al., 2018). Our results are compatible with the notion that those changes of mechanobiological properties may contribute to an altered functional and activation state of microglia, including a chronically activated phenotype, and a failure to shut down activation as known from

neurodegenerative disorders (for recent reviews see Sabogal-Guáqueta et al., 2020; Webers et al., 2020).

Regarding the mechanism through which cells sense mechanical stimuli, previous studies highlighted the effect of stretch-dependent chloride channels by blockage with DIDS (Eder et al., 1998; Hines et al., 2009). In line with these results, the treatment of microglia on soft substrates with DIDS reversed the elasticity-induced expression of CD206 as a marker for M2-like microglia. Overall, while this highlights the robustness of our findings, the evidence is insufficient to determine stretch-dependent chloride channels as a causal substrate of all the observed effects. Moreover, DIDS might have additional non-specific effects, so future investigations should include NPPB and Flufenamic acid to make sure that the effects are indeed stretch-activated Cl⁻ channel-dependent and not anion-exchanger dependent (Eder et al., 1998; Schlichter et al., 2011). Thus, further investigations, i.e., by the usage of alternative pharmacological or molecular methods, are warranted to comprehensively clarify the mechanisms underlying elasticity-dependent effects on microglia. However, the strength of the current study is to characterize for the first time the effects of an abundant mechanical cue, i.e., elasticity, on microglia function, and suggest a potential mechanism as a basis for future studies.

Besides the static functional properties of microglia, recent studies highlight the importance of dynamic functional microglia states (Hamzei Taj et al., 2016; Vay et al., 2018; Rabenstein et al., 2020). In this respect, preconditioning of microglia, either pharmacologically or by a pathological stimulus, can modulate the successive microglia reaction upon further stimuli. As cultivation on soft substrates primed microglia towards an anti-inflammatory state under resting conditions, we hypothesized that this change of the starting position might also affect the dynamic reaction of microglia, or their “memory” (Vay et al., 2018). However, using established models of pro- or anti-inflammatory microglia stimulation, we found no significant effect of substrate elasticity on this microglia memory. Technically, our results reproduced previous reports that anti-inflammatory preconditioning with IL-4 alters the response upon a successive pro-inflammatory stimulation with LPS (Michelucci et al., 2009; Vay et al., 2018). Overall, while the effect of pharmacological stimuli far exceeded the rather moderate effect of substrate elasticity, we assume that potential effects on microglia dynamics in this study might have been obscured and could be provoked with less prominent pro-inflammatory stimuli.

Altogether, our data highlight that primary microglia is significantly affected by its microenvironment’s mechanical properties. Culturing microglia on substrates mimicking the softness of the living brain alters basal microglial activation

levels. Thus, substrate elasticity appears to be relevant for the *a priori* configuration of microglia and may help to explain differences between histological examinations *ex vivo* and cultivation *in vitro*, important for translational research. Altogether, mechanical factors in general and elasticity, in particular, constitute an essential factor impacting how microglia interact with the CNS milieu and warrant further investigation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw/processed data required to reproduce these findings cannot be shared at this time as the data also form part of an ongoing study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SB, SD, AK, and DO conducted the experiments. J-AA, CH, MH, and NH prepared and calibrated the PDMS substrates. SB, SV, and MR performed the analysis and statistics. SB and SD drafted the manuscript. RM, BH, SV, MS, and MAR participated in the design and coordination of the study and critically revised to draft the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was funded by the Marga-und-Walter-Boll-Stiftung (#210-10-15). SB received a stipend by the “Gerok Program” (Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany, grant/award number: 3622/9900/11) and was supported by the “Cologne Clinician Scientist Program” (CCSP), funded by the German Research Council (FI 773/15-1). SV was supported by the “Köln Fortune Program” (Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany, 370/2019).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claudia Drapatz for excellent technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.590500/full#supplementary-material>.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 | (A) Representative images of microglia cultivated on soft PDMS substrates of 0.6 kPa expressing CD11b (red) as well as Iba-1 (green) as characteristic microglia markers. **(B)** Cultivation on soft substrates of 0.6 kPa did not promote contamination with primary astrocytes as indicated by staining for GFAP (red), but exclusively yielded growth of primary Iba-1 positive (green) microglia.

REFERENCES

- Abraham, J. A., Linnartz, C., Dreissen, G., Springer, R., Blaschke, S., Rueger, M. A., et al. (2019). Directing neuronal outgrowth and network formation of rat cortical neurons by cyclic substrate stretch. *Langmuir* 35, 7423–7431. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02003
- Arani, A., Murphy, M. C., Glaser, K. J., Manduca, A., Lake, D. S., Kruse, S. A., et al. (2015). Measuring the effects of aging and sex on regional brain stiffness with MR elastography in healthy older adults. *NeuroImage* 111, 59–64. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.02.016
- Arbogast, K. B., Thibault, K. L., Pinheiro, B. S., Winey, K. I., and Margulies, S. S. (1997). A high-frequency shear device for testing soft

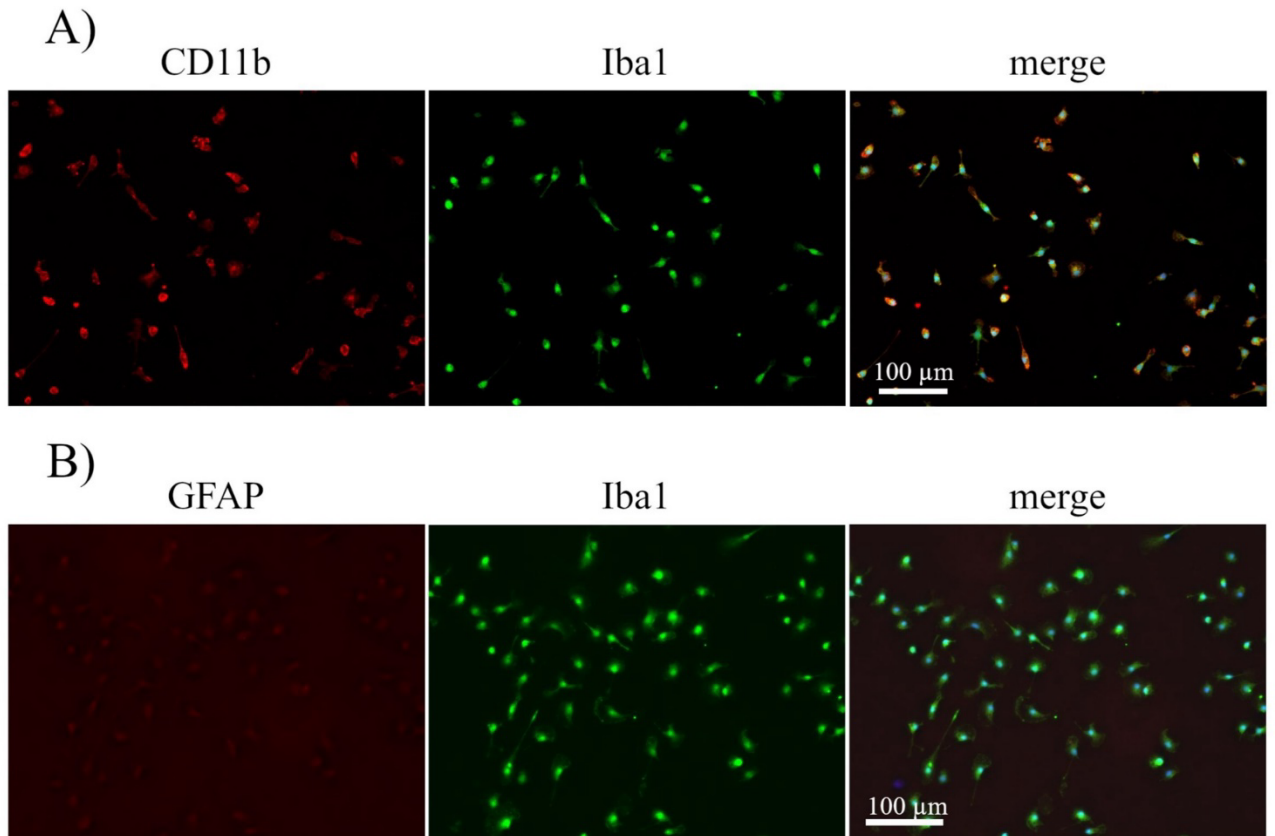
- biological tissues. *J. Biomech.* 30, 757–759. doi: 10.1016/s0021-9290(97)00023-7
- Blaschke, S., Vay, S. U., Pallast, N., Rabenstein, M., Abraham, J. A., Linnartz, C., et al. (2019). Substrate elasticity induces quiescence and promotes neurogenesis of primary neural stem cells—A biophysical *in vitro* model of the physiological cerebral milieu. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13, 960–972. doi: 10.1002/term.2838
- Bollmann, L., Koser, D. E., Shahapure, R., Gautier, H. O., Holzapfel, G. A., Scarcelli, G., et al. (2015). Microglia mechanics: immune activation alters traction forces and durotaxis. *Front. Cell. Neurosci.* 9:363. doi: 10.3389/fncel.2015.00363
- Chauvet, D., Imbault, M., Capelle, L., Demene, C., Mossad, M., Karachi, C., et al. (2016). *In vivo* measurement of brain tumor elasticity using intraoperative shear wave elastography. *Ultraschall Med.* 37, 584–590. doi: 10.1055/s-0034-1399152
- Eder, C., Klee, R., and Heinemann, U. (1998). Involvement of stretch-activated Cl^- channels in ramification of murine microglia. *J. Neurosci.* 18, 7127–7137. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-18-07127.1998
- Franco, R., and Fernández-Suárez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 131, 65–86. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.05.003
- Freimann, F. B., Müller, S., Streitberger, K. J., Guo, J., Rot, S., Ghori, A., et al. (2013). MR elastography in a murine stroke model reveals correlation of macroscopic viscoelastic properties of the brain with neuronal density. *NMR Biomed.* 26, 1534–1539. doi: 10.1002/nbm.2987
- Goriely, A., Geers, M. G., Holzapfel, G. A., Jayamohan, J., Jerusalem, A., Sivaloganathan, S., et al. (2015). Mechanics of the brain: perspectives, challenges, and opportunities. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 14, 931–965. doi: 10.1007/s10237-015-0662-4
- Graeber, M. B., Streit, W. J., and Kreutzberg, G. W. (1988). The microglial cytoskeleton: vimentin is localized within activated cells *in situ*. *J. Neurocytol.* 17, 573–580. doi: 10.1007/BF01189811
- Hamzei Taj, S., Kho, W., Aswendt, M., Collmann, F. M., Green, C., Adamczak, J., et al. (2016). Dynamic modulation of microglia/macrophage polarization by miR-124 after focal cerebral ischemia. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 11, 733–748. doi: 10.1007/s11481-016-9700-y
- Hanisch, U. K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997
- Hersch, N., Wolters, B., Dreissen, G., Springer, R., Kirchgessner, N., Merkel, R., et al. (2013). The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening. *Biol. Open* 2, 351–361. doi: 10.1242/bio.20133830
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., and El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 21, 1359–1369. doi: 10.1038/s41593-018-0242-x
- Hines, D. J., Hines, R. M., Mulligan, S. J., and Macvicar, B. A. (2009). Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57, 1610–1618. doi: 10.1002/glia.20874
- Hiscox, L. V., Johnson, C. L., McGarry, M. D. J., Perrins, M., Littlejohn, A., van Beek, E. J. R., et al. (2018). High-resolution magnetic resonance elastography reveals differences in subcortical gray matter viscoelasticity between young and healthy older adults. *Neurobiol. Aging* 65, 158–167. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.010
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., et al. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43, 3063–3070. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659656
- Jiang, S. X., Slinn, J., Aylsworth, A., and Hou, S. T. (2012). Vimentin participates in microglia activation and neurotoxicity in cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 122, 764–774. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07823.x
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010
- Kim, J. Y., Kim, N., and Yenari, M. A. (2015). Mechanisms and potential therapeutic applications of microglial activation after brain injury. *CNS Neurosci. Ther.* 21, 309–319. doi: 10.1111/cns.12360
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–318. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7
- Kumar, S. S., Hsiao, J.-H., Ling, Q.-D., Dulinska-Molak, I., Chen, G., Chang, Y., et al. (2013). The combined influence of substrate elasticity and surface-grafted molecules on the *ex vivo* expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* 34, 7632–7644. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.002
- Lenz, K. M., and Nelson, L. H. (2018). Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Front. Immunol.* 9:698. doi: 10.3389/fimmu.2018.00698
- Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., and Heuschling, P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β . *J. Neuroimmunol.* 210, 3–12. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.003
- Millward, J. M., Guo, J., Berndt, D., Braun, J., Sack, I., and Infante-Duarte, C. (2015). Tissue structure and inflammatory processes shape viscoelastic properties of the mouse brain. *NMR Biomed.* 28, 831–839. doi: 10.1002/nbm.3319
- Moshayedi, P., Ng, G., Kwok, J. C., Yeo, G. S., Bryant, C. E., Fawcett, J. W., et al. (2014). The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials* 35, 3919–3925. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.038
- Murphy, M. C., Huston, J. III., and Ehman, R. L. (2019). MR elastography of the brain and its application in neurological diseases. *NeuroImage* 187, 176–183. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.10.008
- Murphy, M. C., Huston, J. III., Jack, C. R. Jr., Glaser, K. J., Manduca, A., Felmlee, J. P., et al. (2011). Decreased brain stiffness in Alzheimer's disease determined by magnetic resonance elastography. *J. Magn. Reson. Imaging* 34, 494–498. doi: 10.1002/jmri.22707
- Noristani, H. N., Gerber, Y. N., Sabourin, J. C., Le Corre, M., Lonjon, N., Mestre-Frances, N., et al. (2017). RNA-seq analysis of microglia reveals time-dependent activation of specific genetic programs following spinal cord injury. *Front. Mol. Neurosci.* 10:90. doi: 10.3389/fnmol.2017.00090
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458. doi: 10.1126/science.1202529
- Pathak, M. M., Nourse, J. L., Tran, T., Hwe, J., Arulmoli, J., Le, D. T., et al. (2014). Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111, 16148–16153. doi: 10.1073/pnas.1409802111
- Pepe, G., De Maglie, M., Minoli, L., Villa, A., Maggi, A., and Vegeto, E. (2017). Selective proliferative response of microglia to alternative polarization signals. *J. Neuroinflammation* 14:236. doi: 10.1186/s12974-017-1011-6
- Rabenstein, M., Vay, S. U., Blaschke, S., Walter, H. L., Ladwig, A., Fink, G. R., et al. (2020). Crosstalk between stressed brain cells: direct and indirect effects of ischemia and aglycemia on microglia. *J. Neuroinflammation* 17:33. doi: 10.1186/s12974-020-1697-8
- Rabenstein, M., Vay, S. U., Flitsch, L. J., Fink, G. R., Schroeter, M., and Rueger, M. A. (2016). Osteopontin directly modulates cytokine expression of primary microglia and increases their survival. *J. Neuroimmunol.* 299, 130–138. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.09.009
- Ramlackhansingh, A. F., Brooks, D. J., Greenwood, R. J., Bose, S. K., Turkheimer, F. E., Kinnunen, K. M., et al. (2011). Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 70, 374–383. doi: 10.1002/ana.22455
- Ransohoff, R. M., and El Khoury, J. (2015). Microglia in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8:a020560. doi: 10.1101/cshperspect.a020560
- Sabogal-Guáqueta, A. M., Marmolejo-Garza, A., de Pádua, V. P., Eggen, B., Boddeke, E., and Dolga, A. M. (2020). Microglia alterations in neurodegenerative diseases and their modeling with human induced pluripotent stem cell and other platforms. *Prog. Neurobiol.* 190:101805. doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101805
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026
- Schellenberg, A., Jousset, S., Moser, K., Hampe, N., Hersch, N., Hemeda, H., et al. (2014). Matrix elasticity, replicative senescence and DNA methylation patterns of mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 35, 6351–6358. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.079

- Schlichter, L. C., Mertens, T., and Liu, B. (2011). Swelling activated Cl^- channels in microglia. biophysics, pharmacology and role in glutamate release. *Channels* 5, 128–137. doi: 10.4161/chan.5.2.14310
- Schregel, K., Wuerfel, E., Garteiser, P., Gemeinhardt, I., Prozorovski, T., Aktas, O., et al. (2012). Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified *in vivo* by magnetic resonance elastography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 6650–6655. doi: 10.1073/pnas.1200151109
- Stoll, G., Jander, S., and Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* 56, 149–171. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00034-3
- Stoll, G., Jander, S., and Schroeter, M. (2002). Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 513, 87–113. doi: 10.1007/978-1-4615-0123-7_3
- Streit, W. J., Graeber, M. B., and Kreutzberg, G. W. (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1, 301–307. doi: 10.1002/glia.440010502
- Streitberger, K.-J., Sack, I., Krefting, D., Pfuller, C., Braun, J., Paul, F., et al. (2012). Brain viscoelasticity alteration in chronic-progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 7:e29888. doi: 10.1371/journal.pone.0029888
- Tang, Y., and Le, W. (2016). Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5
- Tyler, W. J. (2012). The mechanobiology of brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 867–878. doi: 10.1038/nrn3383
- Ulbricht, A., Eppler, F. J., Tapia, V. E., van der Ven, P. F., Hampe, N., Hersch, N., et al. (2013). Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr. Biol.* 23, 430–435. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.064
- Vay, S. U., Flitsch, L. J., Rabenstein, M., Rogall, R., Blaschke, S., Kleinhaus, J., et al. (2018). The plasticity of primary microglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Neuroinflammation* 15:226. doi: 10.1186/s12974-018-1261-y
- Walberer, M., Jantzen, S. U., Backes, H., Rueger, M. A., Keuters, M. H., Neumaier, B., et al. (2014). *In-vivo* detection of inflammation and neurodegeneration in the chronic phase after permanent embolic stroke in rats. *Brain Res.* 1581, 80–88. doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.030
- Walter, H. L., Walberer, M., Rueger, M. A., Backes, H., Wiedermann, D., Hoehn, M., et al. (2015). *In vivo* analysis of neuroinflammation in the late chronic phase after experimental stroke. *Neuroscience* 292, 71–80. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.024
- Webers, A., Heneka, M. T., and Gleeson, P. A. (2020). The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol. Cell Biol.* 98, 28–41. doi: 10.1111/imcb.12301
- Wuerfel, J., Paul, F., Beierbach, B., Hamhaber, U., Klatt, D., Papazoglou, S., et al. (2010). MR-elastography reveals degradation of tissue integrity in multiple sclerosis. *NeuroImage* 49, 2520–2525. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.06.018
- Yin, J., Valin, K. L., Dixon, M. L., and Leavenworth, J. W. (2017). The role of microglia and macrophages in CNS homeostasis, autoimmunity, and cancer. *J. Immunol. Res.* 2017:5150678. doi: 10.1155/2017/5150678

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Blaschke, Demir, König, Abraham, Vay, Rabenstein, Olschewski, Hoffmann, Hoffmann, Hersch, Merkel, Hoffmann, Schroeter, Fink and Rueger. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Suppl. Figure



Suppl. Figure:

(A) Representative images of microglia cultivated on soft PDMS substrates of 0.6 kPa expressing CD11b (red) as well as Iba1 (green) as characteristic microglia markers.

(B) Cultivation on soft substrates of 0.6 kPa did not promote contamination with primary astrocytes as indicated by staining for GFAP (red), but exclusively yielded growth of primary Iba-1 positive (green) microglia.

4. Diskussion

4.1 Legitimation für das Studienkonzept

Bislang befassten sich die meisten Forschungsarbeiten mit den Auswirkungen löslicher Faktoren oder anderen Mitteln der Zell-Zell-Interaktion^{110,228}. Jüngste Studien deuten darauf hin, dass verschiedene Zelleinheiten im Gehirn nicht nur durch diese beeinflusst werden, sondern auch auf die mechanischen Eigenschaften ihrer Mikroumgebung reagieren. So berichten einzelne Arbeiten von einer morphogenetischen Anpassung mikroglialer Zellen an die Elastizität der Substrate, auf denen sie kultiviert wurden^{8,362}. Jedoch war über die Auswirkung mechanobiologischer Effekte auf Mikroglia auf funktioneller Ebene bisher nur wenig bekannt³⁷⁶.

Mechanische Einflüsse stellen einen reichhaltigen und sowohl regional als auch zeitlich divergierenden Faktor dar, welche oft, vor allem in in-vitro Bedingungen, vernachlässigt werden³⁴⁰. Die elastischen Eigenschaften des Gehirns unterliegen rheologie-modulierenden Veränderungen systemischer Art^{348,365} sowie Modulationen infolge mannigfaltiger Hirnpathologien, etwa neurodegenerativen, inflammatorischen, onkologischen oder traumatischen Charakters^{349,350,366-368}. Die Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften des ZNS gilt als empfindlicher Biomarker für ZNS-Pathologien und wird daher zur Bewertung pathologischer Prozesse genutzt^{343,346}.

Unter der Hypothese, dass die Elastizität der Mikroumgebung wichtige Eigenschaften und Funktionen der Mikroglia beeinflusst, beschäftigte sich unsere Studie mit der Charakterisierung primärer Ratten-Mikroglia unter Verwendung von Substraten aus PDMS, einem Modell zur Untersuchung des Effektes mechanischer Stimuli in-vitro. In dieser Studie wiesen wir nach, dass die Elastizität des Substrats die Morphologie der Mikroglia verändert und die funktionellen Eigenschaften und Aktivierungsmarker der primären Mikroglia in-vitro wesentlich beeinflusste. Beachtenswert ist, dass weiche Substrate der Elastizität von Hirngewebe sehr viel ähnlicher sind als Glas- oder Kunststoffplatten, die üblicherweise für die Mikroglia-Kultur verwendet werden. Daher stellt die Verwendung von Weichsubstraten eine Möglichkeit dar, bei Mikroglia-Kulturexperimenten ein physiologischeres Umfeld zu schaffen.

Die Daten heben die allgegenwärtigen mechanobiologischen Effekte hervor, die auf multiple Zellentitäten des Gehirns wirken und die die Basis dafür bilden, komplexe Wechselwirkungen zwischen Mikroglia, neuronalen Stammzellen und Glia im gesunden wie auch im erkrankten Gehirn zu erschließen. Insgesamt zeigen die hier erhobenen Daten, dass primäre Mikroglia durch die mechanischen Eigenschaften ihrer Mikroumgebung in erheblichem Maße beeinflusst werden. Die Kultivierung primärer Mikroglia auf elastischen, das Gehirn imitierenden Substraten verändert das Niveau der basalen Mikrogliaaktivierung. Die Elastizität des Substrats scheint für die A-priori-Konfiguration der Mikroglia von Bedeutung und könnte im Sinne der translationalen Forschung wichtig sein. Insgesamt stellen mechanische Faktoren derweise einen wesentlichen Faktor dar, der sich auf die Interaktion von Mikroglia mit dem ZNS-Milieu auswirkt und weitere Untersuchungen rechtfertigt (Blaschke, Demir et al., 2020).

4.2 Die Beeinflussung von Morphologie und Funktion

4.2.1 Verwendung von PDMS-basierten Substraten

In Kooperation mit dem „Institute of Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine“ sowie dem „Institute of Biological Information Processing“ des Forschungszentrums Jülich wurde unter Verwendung von Substraten aus Polydimethylsiloxan ein Modell zur Untersuchung der Bedeutung mechanischer Stimuli in-vitro erschaffen (Blaschke, Demir et al., 2020). Zellen verschiedenster Entitäten konnten unter Nutzung PDMS-basierter Substrate der Analyse von Zellfunktionen unter physiologischeren Bedingungen zugeführt werden. Insgesamt verändern mechanische Eigenschaften in Vorarbeiten die Entwicklung und das Verhalten nicht nur von mesenchymalen Stammzellen ³⁵⁰, hämatopoetischen Stammzellen ³⁷⁷ und Kardiomyozyten ³⁷⁸, sondern auch von neuronalen Zellen wie Neuronen ³⁷⁹, Astrozyten ⁸ und neuronalen Stammzellen ²³⁸.

Auf diese Weise haben sich PDMS-basierte Substrate mit ihrer glatten oberflächenmorphologie und ihrer ausgezeichneten Biokompatibilität bereits als geeignetes in-vitro-Modell für die Untersuchung mechanischer Einflüsse etabliert ^{238,379,380}. Mikroglia wurden für die vorliegende Studie auf PDMS-Substraten mit unterschiedlichen Elastizitätsmodulen ausgesät, die durch Variation der

Zusammensetzung der Basis (vinyl-terminiertes PDMS) und Cross-linkern (Methylhydrosiloxan-Diethylsiloxan-Copolymer) erzielt wurden. Substrate mit einem Elastizitätsmodul von 0,6 und 1 kPa ahmten die Elastizität des Gehirns nach; derweil stellten steifere Substrate von 1,2 MPa und sowie herkömmliche Platten mit einem im Vergleich zu PDMS-Platten erheblich höherem Elastizitätsmodul von über 1 GPa, die Kontrollgruppe dar (Blaschke, Demir et al., 2020).

Die Lebensfähigkeit von primären Mikrogliazellen, die 24 Stunden lang auf weichen PDMS-Substraten gezüchtet wurden, im Vergleich zu Substraten mit höherer Steifigkeit untersucht, ergab keine Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen, wie anhand der Propidiumiodid-positiven toten Zellen und der Gesamtzahl der Zellen festzustellen war. Immunhistochemisch konnte neben der Reinheit der Kulturen, anhand der Iba-1-Färbung gezeigt werden, dass der Kultivierungsprozess unabhängig von der Substratelastizität, durchweg zu mehr als 90 % Iba1-positiven Mikrogliazellanteilen führte (siehe Abbildung 1A und 1B in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Es gab keine Anzeichen für eine Zunahme der phagozytischen Aktivität der Mikroglia, wie anhand der CD68-messenger RNA-(mRNA-)Expression bewertet wurde (siehe Abbildung 3D in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Zusammengefasst deuteten die Ergebnisse so darauf hin, dass die entwickelten PDMS-Substrate ein geeignetes Kultursystem für die in-vitro-Charakterisierung (auch) von Mikroglia darstellen (Blaschke, Demir et al., 2020).

4.2.2 Beeinflussung der Morphologie

Untersuchungen der morphologischen Transformation führten zur Annahme, dass die mikrogliale Metamorphose reaktiv auf eine funktionellen Anforderung, die die Zelle adressiert, fußen könnte ^{17,33}. Die bemerkenswert schnellen und drastischen Veränderungen der Zellform deuten darauf hin, dass sie für funktionelle Anpassungen erforderlich sein könnten. So sind beispielsweise die Ausstülpung von Filopodien und der dynamische Umbau für die Motilität und die gerichtete Migration erforderlich. In ähnlicher Weise deutet das Auftreten "schaumiger" Zellen mit lipid- oder myelinbeladenen Organellen in Hirngewebeschnitten auf phagozytotische Aktivität hin, zum Beispiel bei einer Myelinläsion. Auch die Bezeichnung Zellen als „ruhend“ und verzweigt impliziert unweigerlich eine enge Assoziation zwischen Morphologie und Funktion ³⁸¹. Im Transformationsprozess verloren Mikroglia ihre

morphologischen Eigenschaften, die sie als ruhend auswiesen; sie reduzieren die Komplexität ihrer Form, indem sie die Verzweigungen ihrer Fortsätze verkürzten. Indes lassen sich transformatorische Zwischenstadien differenzieren^{232,381,382}. In-vitro weisen Mikrogliazellen nicht die verzweigte Struktur auf, die sich im physiologischen ZNS in-vivo beobachten lässt, vielmehr zeichnen sie sich durch morphologische Heterogenität aus; die mikrogliale Erscheinung bietet buschige oder bi- und tripolare, spindel- bis stäbchenförmige oder amöboide Versionen mit kurzen dicken Fortsätzen, die sich als Lamellipodien ausdehnen^{383,384}. Die Formen können sich abwechseln und ineinander übergehen, während der Übergang von den verzweigten Mikrogliazellen zum amöboiden, makrophagenähnlichen Erscheinungsbild unabhängig der Versuchsmodalitäten als stereotype Abfolge im Prozess der Aktivierung angesehen wird³⁸². So ist die Morphologie nicht immer ein zuverlässiger Hinweis auf die funktionelle Ausrichtung der Mikroglia. So wurde für die Induktion bestimmter Gegensätze berichtet, dass sie ohne offensichtliche morphologische Transformation ablaufen³⁸⁵, während verzweigte Formen experimentell auch unter Bedingungen induziert werden können, die eine Verzweigung nicht unterstützen^{386,387}. Infolgedessen kann der Verlust verzweigter und der Gewinn amöboider Zellformen kein valider und ausschließlicher Indikator des reaktiven Mikroglia-Phänotyps darstellen³⁸⁸.

Unter Hinzunahme des Faktors der Substratelastizität konnten wir nachweisen, dass sich die Zellmorphologie ruhender Mikroglia, kultiviert auf weichen PDMS-Substraten, in Abhängigkeit von der Elastizität veränderte, diese quantifiziert als signifikante Abnahme der Rundheit der Zellen über den Steifigkeitsgradienten, mit signifikanten Unterschieden zwischen den beiden weicheren Substraten im Vergleich zur steiferen PDMS-Kontrolle und sogar zwischen den weichsten Bedingungen (siehe Abbildung 1E in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Ferner konnte für die durch die Elastizität des Substrates signifikant veränderte mittlere Zellausbreitungsfläche eine Zunahme um etwa 29 % auf den weichsten Substraten im Vergleich zu steiferen Kontrollen von 1,2 MPa (Abbildung 1C, 1D und 1F in (Blaschke, Demir et al., 2020)) beobachtet werden (Blaschke, Demir et al., 2020).

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, berichtete die Arbeitsgruppe um Professor Kristian Franze³⁶², dass die Morphologie primärer Mikroglia durch die Steifigkeit der Mikroumgebung beeinflusst wird. Unter Verwendung weicher, elastischer Substrate aus Polyacrylamid (PAA) mit E-Modulen von 100, 300 und

1000 Pa, die den Bereich der berichteten Steifigkeit des Nervengewebes abdeckten³⁶⁴, wiesen Mikroglia auf weicheren Substraten überwiegend längliche Formen auf, ihre Ausbreitungsfläche nahm mit der Substratsteifigkeit signifikant zu. Die Form der Mikroglia änderte sich, wenn sie auf 1 kPa steifen Substraten oder auf Glas kultiviert wurden. Die Zellen besaßen eine differente Morphologie mit langen, ausgeprägten Fortsätzen und lamellipodienartigen Strukturen an ihren Spitzen³⁶². In unserer Studie beobachteten wir eine ähnliche Veränderungen im oberen Elastizitätsbereich um 1 kPa (Blaschke, Demir et al., 2020).

Auch für andere Gliazellen ist solch eine Anpassung der Morphologie beschrieben, so reagieren diese auf die Steifigkeit ihrer Umgebung auf unterschiedliche Weise. Astrozyten zum Beispiel vergrößern ihre Ausbreitungsfläche, ihre morphologische Gesamtkomplexität und ihre F-Aktin-Organisation auf steiferen Wachstumssubstraten^{389,390}. In ähnlicher Weise vergrößern Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ihre Fläche und Komplexität auf steiferen Substraten, zeigen aber ein Optimum an Überleben und Proliferation bei mittleren Werten der ZNS-Gewebesteifigkeit³⁹¹.

4.2.3 Beeinflussung der Funktion

Während bereits gezeigt werden konnte, dass die Elastizität der Mikroumgebung verschiedenste Zelleinheiten beeinflusst, sind die Auswirkungen der Elastizität der Mikroumgebung auf die Funktion der Mikroglia nach wie vor nicht klar. Unsere Ergebnisse sind mit der Vorstellung vereinbar, dass Veränderungen der mechanobiologischen Eigenschaften zu einem veränderten Funktions- und Aktivierungszustand der Mikroglia beitragen können (Blaschke, Demir et al., 2020).

4.2.3.1 Einfluss der Elastizität auf die Mikroglia-Polarisierung

Anschließend untersuchten wir die spontanen funktionellen Veränderungen von primären Mikroglia, die auf weichen Substraten kultiviert wurden. Repräsentative Marker für pro- und anti-inflammatorische Mikroglia-Polarisationszustände wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht (Blaschke, Demir et al., 2020).

Die Arbeitsgruppe um Professor Dr. Jochen Guck analysierte in ihrer Veröffentlichung „The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system“⁸ das Transkriptionsprofil von Mikrogliazellen und Astrozyten in Abhängigkeit von der Substratnachgiebigkeit mithilfe von DNA-Mikroarrays. Hierzu kultivierten sie primäre Ratten-Mikroglia auf PAA-basierten Substraten der Steifigkeiten von 100 Pa bis > 10 kPa. Funktionelle Genexpressionsanalysen ergaben unter anderem eine signifikante Zunahme der Entzündungsreaktion, des Immunzellverkehrs und des Zellwachstums, der zellvermittelten Immunreaktion und der Antigenpräsentation von Mikroglia, die auf steifen Substraten gewachsen waren. Zu den einzelnen entzündungsbezogenen Genen, die in den auf den steiferen Substraten kultivierten Mikroglia signifikant erhöht waren, gehören Marker der Mikrogliaaktivierung, Rezeptoren, die die Mikrogliaaktivierung vermitteln und Rezeptoren, die an Adhäsion und Migration beteiligt sind⁸.

Wir konnten über verschiedene Systemebenen der Marker für den proinflammatorischen Mikroglia-Phänotypen keine Veränderungen für die unterschiedlichen Steifigkeitsgrade beobachten. So waren weder eine nachweisbar erhöhte mRNA-Expression von iNOS (siehe Abbildung 3A in (Blaschke, Demir et al., 2020)) noch eine Sekretion von IL1 β (siehe Abbildung 3B in (Blaschke, Demir et al., 2020)) festzustellen, wie sie bei einer Polarisierung klassischer Art zu erwarten gewesen wäre. Auch die Sekretion von NO in das Medium zeigte bei Kultivierung auf weicheren Substraten keine Alternation (siehe Abbildung 3C in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Ferner gab es im Einklang dazu keine Anzeichen für eine Zunahme der phagozytischen Aktivität der Mikroglia, die anhand der CD68-mRNA-Expression bewertet wurde (siehe Abbildung 3D in (Blaschke, Demir et al., 2020)) (Blaschke, Demir et al., 2020).

Während wir keine Veränderung entzündungsfördernder Marker über die Elastizitätsstufen hinweg nachweisen konnten, beobachteten wir indes einen Anstieg der entzündungshemmenden Marker auf weicheren Substraten, die eine Zellpolarisierung im Sinne einer alternativen Aktivierung nahelegte. Derart konnte für die weichsten Substrate ein mehr als zweifacher Anstieg der CD206-Spiegel im Vergleich zu steiferen Kontrollen mit Elastizitäten von 1,2 MPa festgestellt werden. Passend dazu fanden wir einen ebenfalls signifikanten Anstieg der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1- (Insulin-like Growth Factor 1, IGF1) Sekretion im Zellmedium,

wobei wir einen fast zweifachen Anstieg auf den weichsten Substraten im Vergleich zu Substraten mit Elastizitäten um 1,2 MPa (siehe Abbildung 3F in (Blaschke, Demir et al., 2020)) beobachteten (Blaschke, Demir et al., 2020). In Übereinstimmung mit früheren Studien, die entzündungshemmende Zustände mit mikroglialer Proliferation in Verbindung brachten (Pepe et al., 2017; Vay et al., 2018), untersuchten wir das Proliferationspotenzial mikroglialer Zellen unter in ihrer Steifigkeit divergierenden Kultivierungsbedingungen und beobachteten eine Zunahme der Proliferationsfähigkeit auf weicheren Substraten. Eine Betrachtung der Aufnahme von Bromdesoxyuridin (Bromodesoxyuridine, BrdU) in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen, ermöglichte eine immunzytochemische Färbung mit einem primären Anti-BrdU-Antikörper, der, durch Nutzung eines sekundären fluoreszierenden Antikörpers sichtbar gemacht, zur Quantifizierung der proliferativen Fähigkeit genutzt wurde³⁹². Die Zunahme der Proliferation auf weicheren Substraten war statistisch signifikant, wobei Unterschiede zwischen Substraten von 1 kPa und der weichsten Bedingung von <1 kPa (siehe Abbildung 2C in (Blaschke, Demir et al., 2020)) bestanden, beide im Vergleich zu steiferen Kontrollen (siehe Abbildung 2A, 2B, und 2C in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Wir fanden einen ähnlichen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg der Kiel-67 (Ki67)-mRNA-Expression auf weicheren Substraten (Abbildung 2D). Zusammengenommen kann die Steigerung der Proliferationsmarker auf RNA-Ebene und in der Immunhistochemie erklärt werden durch die veränderte A-priori Konfiguration, die die PDMS-Böden ermöglichen, und stehen somit im Einklang zu einer Aktivierung alternativer Art (M2-Phänotyp)^{228,393}.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Mikroglia auf weichen Substraten wesentliche Eigenschaften von entzündungshemmenden und „ruhenden“ Mikroglia aufweisen, mehr als Mikroglia auf harten Substraten. So vermuteten bereits Franco und Fernandez-Suarez, dass sich der „ruhende“ Mikroglia-Phänotyp ähnlich wie M2-Mikroglia verhält - wahrscheinlich als abgeschwächter Schutzphänotyp - was mit unserer Beobachtung übereinstimmt, dass unbehandelte primäre Mikroglia M2-Charakterisierungsmarker exprimieren, aber keine Merkmale des M1-Phänotyps aufweisen^{228,394}.

4.2.3.2 Einfluss der Elastizität auf die dynamische Mikroglia-Polarisierung

Obwohl die M1- und M2-Kategorien für die Beschreibung der Mikroglia-Aktivitäten *in vitro* hilfreich sind, wird zunehmend anerkannt, dass das M1/M2-Paradigma für die Beschreibung der Mikroglia- und Makrophagen-Aktivierung *in-vivo* unzureichend ist, da Mikroglia nur selten eine signifikante Tendenz zum M1- oder M2-Phänotyp aufweisen. Tatsächlich zeigen Transkriptomstudien, dass die Mikrogliaaktivierung vielfältig und vom Kontext abhängig ist. Unter physiologischen ZNS-Bedingungen weisen Mikroglia ein homöostasesicherndes Transkriptom-Profil auf, das ihren überwachenden Charakter widerspiegelt^{239,395-399}. Dieses Profil kann unter *in-vitro* Bedingungen erreicht werden, wie wir unter Zuhilfenahme PDMS-basierter Kultursubstrate demonstrieren konnten (Blaschke, Demir et al., 2020). Neben den statischen funktionellen Eigenschaften von Mikroglia weisen neuere Studien auf die Bedeutung dynamischer funktioneller Mikroglia-Zustände hin. In dieser Hinsicht kann die Präkonditionierung von Mikroglia, entweder pharmakologisch oder durch einen pathologischen Stimulus, die anschließende Reaktion der Mikroglia auf weitere Stimuli modulieren^{228,400,401}.

Da die Kultivierung auf weichen Substraten pharmakologisch unstimulierte Mikroglia in einen am ehesten entzündungshemmenden Zustand versetzt, stellten wir die Hypothese auf, dass diese Veränderung der Ausgangsposition auch die dynamische Reaktion der Mikroglia, also ihr molekulares, epigenetisch vermitteltes Immun-"Gedächtnis", beeinflussen könnte^{228,402-404}. Zu diesem Zweck wurden Mikroglia, die auf Substraten mit unterschiedlicher Steifigkeit ausgesät worden waren, 24 Stunden lang mit LPS stimuliert, um einen proinflammatorischen Aktivierungsphänotyp zu induzieren. Vor der LPS-Stimulation erhielten die Mikroglia entweder einen entzündungshemmenden Vorkonditionierungsreiz mit IL4 für 24 Stunden oder keinen Vorkonditionierungsreiz (siehe Abbildung 5A in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Marker der pro-inflammatorischen Mikroglia-Polarisierung wurden anschließend auf RNA- und Proteinebene bestimmt (Blaschke, Demir et al., 2020).

Unter Verwendung etablierter Modelle der pro- oder anti-inflammatorischen Mikroglia-Stimulation fanden wir jedoch keinen signifikanten Effekt der Substratelastizität auf das Mikroglia-Gedächtnis. Eine entzündungshemmende Vorstimulation jedoch führte zu einer signifikanten Verringerung der pro-

inflammatorischen Marker nach konsekutiver LPS-Stimulation, was eine Reproduktion der bisherigen Ergebnisse substratunabhängiger Untersuchungen des Mikroglia-Gedächtnis darstellt (Vay et al., 2018). Im Einzelnen milderte eine vorausgehende Exposition gegenüber IL4 die pro-inflammatorische Reaktion der Mikroglia in Bezug auf die iNOS-RNA-Expression (siehe Abbildung 5B in (Blaschke, Demir et al., 2020)), iNOS-Färbung (siehe Abbildungen 5C-E in (Blaschke, Demir et al., 2020)), IL1 β -Sekretion (siehe Abbildung 5F in (Blaschke, Demir et al., 2020)) und IL6-RNA-Expression (siehe Abbildung 5G in (Blaschke, Demir et al., 2020)) ab. Der Effekt der pharmakologischen Stimulation zugunsten einer alternativen Aktivierung übertraf den eher moderaten Effekt der Substratelastizität deutlich und scheint daher keinen eigenständigen Effekt bezüglich einer Präkonditionierung zu bieten (Blaschke, Demir et al., 2020). Daher bleibt zu diskutieren, in wie weit sich der durch die rheologische Eigenschaften des Milieus festgelegte Phänotyp mit der durch IL4 alternativ aktivierten Mikroglia-Subpopulation vergleichen lässt. Gleichzeitig erlaubt diese Beobachtung aber auch, vorhergehende Studien in ihrer Limitation bezüglich der Vernachlässigung rheologischer Umwelteinflüsse zu relativieren. Technisch gesehen reproduzieren unsere Ergebnisse in diesem Fall frühere Berichte, dass eine entzündungshemmende Vorkonditionierung mit IL4 die Reaktion auf eine nachfolgende pro-inflammatorische Stimulation mit LPS verändert^{228,403}.

Unsere Daten stehen mit Einklang mit den Ergebnissen von Micelucci et al.⁴⁰³, die sich für den Phänotyp von Mikrogliazellen, die vor der Oligomere (Oligomer, ol)-A β -Aktivierung, die ein M1-Stimulus darstellt, mit entzündungshemmenden Zytokinen vorbehandelt wurden, interessierten. Es ist bekannt, dass Mikroglia auf denselben Stimulus unterschiedlich reagieren, je nachdem, ob ihm andere Stimuli vorausgehen oder folgen, was darauf hindeutet, dass das Verhalten der Mikroglia durch einen erworbenen Phänotyp und nicht stereotyp bestimmt wird²⁶⁵. Es hat sich gezeigt, dass IL10 oder IL4 in der Lage sind, den durch A β induzierten pro-inflammatorischen Zustand der Mikroglia zu reduzieren^{405,406}. Weitere Daten zeigten, dass Mikroglia, die selbst mit niedrigen Dosen von IL10 oder IL4 aktiviert wurden, durch diese Behandlungen auch dann noch beeinflusst werden, wenn sie einer bedrohlichen Umgebung in Form des stärkeren ol-A β ausgesetzt waren⁴⁰³.

Da die normale Alterung des menschlichen Gehirns durch eine Zunahme der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen⁴⁰⁷ zusammen mit einer Abnahme von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL10⁴⁰⁸ und IL4^{409,410} gekennzeichnet ist,

ist zu erwarten, dass seneszente Mikrogliazellen in Gegenwart von neu synthetisierten A β -Oligomeren leichter in Richtung eines M1-ähnlichen Phänotyps polarisieren als junge Zellen ⁴⁰³. Unter Hinzunahme der Überlegung, dass die Substratelastizität, die im fortschreitenden Alter abnimmt ^{348,365}, unbeeinflusst durch die rheologisch bedingte Konditionierung bleibt, bietet die Überlegung, es bestehe eine Abnahme anti-inflammatorischer und eine Zunahme pro-inflammatorischer Zytokine ⁴⁰³, eine Ergänzung zu diesen Studienergebnissen.

4.2.3.3 Einfluss der Elastizität auf die Expression von Vimentin

Vimentin ist Teil des Intermediärfilamentsystems, das aus GFAP, Vimentin, Nestin und Synemin besteht ^{411,412}. Zusammen mit GFAP, Nestin und Synemin spielt Vimentin wichtige physiologische Rollen, einschließlich der Aufrechterhaltung der Zellform, der Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem Stress, der Vermittlung von zytoskelettalen Überschneidungen und der Organisation von Signalmolekülen. So spaltet Calpain, eine calciumabhängige Cysteinprotease, bei axonalen Verletzungen Vimentin in kleinere, lösliche Fragmente, die wichtige Signalmoleküle zum Kern des verletzten Nervs transportieren ^{294,413,414}. Um die Rolle von Vimentin bei der Mikroglia-Aktivierung in-vitro und in-vivo zu verstehen, isolierte die Arbeitsgruppe um Herrn Sheng T. Hou Mikroglia aus Gehirnen Vimentin-defizierter (Vimentin-Knockout-, VIM-/-) und Vimentin-Wildtyp (Vimentin-Wildtyp, VIM+/+)-Mäusen, und verglich ihre Reaktionen auf die Behandlung mit LPS. Mit LPS behandelte VIM+/+ wiesen Marker der klassischen Aktivierung auf und waren amöboider Morphologie; LPS-behandelte VIM-/-Mikroglia jedoch interessanterweise nicht ²⁹⁵. Ferner wurde die Wiederherstellung der Mikroglia-Aktivierung untersucht, als das funktionelle Vimentin-Gen mit Hilfe eines Tetrazyklin-regulierten Expressionsplasmids wieder in die VIM-/-Mikroglia eingebracht wurde. Die Expression von Vimentin wurde durch das Entfernen von Tetracyclin aus dem Kulturmedium eingeleitet, diese Zellen dann mit LPS behandelt und zeigten eine VIM+/+-ähnliche Expression der Marker der klassischen Mikrogliaaktivierung. Darüber hinaus wurden VIM-/-Mäuse und VIM+/+Mäuse einer vorübergehenden fokalen zerebralen Ischämie ausgesetzt. Das Fehlen einer funktionellen Vimentin-Expression reduzierte die Mikroglia-Aktivierung. Insgesamt zeigte diese Studie, dass Vimentin eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Aktivierung von Mikroglia als Reaktion auf die LPS-Toxizität spielt ²⁹⁵.

Um die Auswirkungen der Elastizität auf die Mikrogliaaktivierung weiter zu bewerten, quantifizierten wir die Vimentin-Expression als Marker der Mikrogliaaktivierung. Diese bewerteten wir sowohl unter Ruhebedingungen als auch nach Stimulation mit LPS und untersuchten den Einfluss von Stimulation zu Substratsteifigkeit sowie die Interaktionen beider Effekte (siehe Abbildung 4A in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Im Einklang mit Vorstudien zeigte sich ein signifikanter Effekt der Stimulation auf die Vimentin-Expression. Interessanterweise fanden wir einen zusätzlichen Effekt der Substratsteifigkeit, der unabhängig von der LPS-Stimulation war. Weitere Analysen für gruppeninterne Effekte ergaben einen signifikanten Anstieg der Vimentin-Expression auf LPS-behandelten Zellen zwischen den weichsten Substraten im Vergleich zu Substraten höchster Steifigkeit, während es in der nicht stimulierten Gruppe einen ebenfalls nicht signifikanten Trend zwischen denselben Gruppen gab (siehe Abbildung 4A in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Zusätzlich wurden die Mikroglia zum Nachweis auf Proteinebene immunzytochemisch auf Vimentin angefärbt. Qualitativ gesehen und in Übereinstimmung mit den mRNA-Daten gab es einen Anstieg der Vimentin-Expression auf weicheren Substraten, der durch die LPS-Stimulation zusätzlich verstärkt wurde, wie die Vimentin-Färbung von Iba1-positiven Mikroglia zeigt (siehe Abbildungen 4B-D in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Angesichts der Bedeutung von Vimentin für die Mikrogliaaktivierung deuten die aktuellen Daten darauf hin, dass neben dem vorhergesagten Anstieg der Vimentinexpression bei LPS-Stimulation auch die Elastizität des Substrats einen relevanten Einfluss auf die Mikrogliaaktivierung hat (Blaschke, Demir et al., 2020).

4.2.3.4 Einfluss spannungsaktivierter Chlorid-Kanäle

Um einen möglichen Mechanismus hinter einigen der durch Elastizität hervorgerufenen Wirkungen auf Mikroglia zu erforschen, blockierten wir dehnungsabhängige Chloridkanäle, die nachweislich die Mikrogliaaktivierung vermitteln (Eder et al., 1998; Hines et al., 2009). Primäre Mikroglia wurden auf Substraten mit 0,6 kPa ausgesetzt und mit 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonsäure (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic Acid, DIDS) behandelt mit dem Ziel der Blockade spannungsaktivierter Chloridkanäle. In einem Dosierungsschema, welches verschiedene DIDS-Konzentrationen von 250 µM bis 1 mM umfasste, zeigten hohe DIDS-Konzentrationen dosisabhängig Anzeichen für eine (toxische) Beeinträchtigung der Zellen. Konzentration von 500 µM DIDS zeigten

keine negativen Auswirkungen auf die Mikroglia, wie sowohl der LDH-Assay (siehe Abbildung 6A in (Blaschke, Demir et al., 2020)) als auch die Propidiumiodid-Färbung (siehe Abbildungen 6B und C in (Blaschke, Demir et al., 2020)) zeigten (Blaschke, Demir et al., 2020).

Nach 24 Stunden Kultivierung hob die Blockade mit DIDS die CD206-RNA-Expression, die in Mikroglia durch weiche Substrate von 0,6 kPa induziert wurde, vollständig auf (siehe Abbildung 6D in (Blaschke, Demir et al., 2020)). Außerdem wurde ein ähnlicher Effekt bei der Vimentin-Expression festgestellt (siehe Abbildung 6E in (Blaschke, Demir et al., 2020)), während bei der iNOS-Expression kein Unterschied festgestellt wurde (siehe Abbildung 6F in (Blaschke, Demir et al., 2020)). In Bezug auf den Mechanismus, durch den Zellen mechanische Reize wahrnehmen, haben frühere Studien die Wirkung von dehnungsabhängigen Chloridkanälen nach Blockierung mit DIDS hervorgehoben (Eder et al., 1998; Hines et al., 2009). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen kehrte die Behandlung von Mikroglia auf weichen Substraten mit DIDS die elastizitätsinduzierte Expression von CD206 um (Blaschke, Demir et al., 2020).

Insgesamt unterstreicht dies zwar die Stabilität unserer Ergebnisse, aber die Datenlage reicht nicht aus, um dehnungsabhängige Chloridkanäle als kausales Substrat für alle beobachteten Effekte zu bestimmen. Darüber hinaus könnte DIDS zusätzliche unspezifische Effekte haben, so dass künftige Untersuchungen 5-Nitro-2-(phenylpropylamino)-Benzoat und Flufenaminsäure einschließen sollten, um sicherzustellen, dass beobachtete Effekte tatsächlich von dehnungsaktivierten Chlorid-Kanälen und nicht etwa von Anionenaustauschern abhängig sind (Eder et al., 1998; Schlichter et al., 2011). Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen, beispielsweise durch den Einsatz alternativer pharmakologischer oder molekularer Methoden, erforderlich, um die Mechanismen, die den dehnungsabhängigen Effekten auf Mikroglia zugrunde liegen, umfassend zu klären (Blaschke, Demir et al., 2020).

4.3 Anwendbarkeit der Studienergebnisse

4.3.1 Vergleichbarkeit von Mikroglia aus Mensch und Nagetier

Das Meiste, was wir über die Funktion der Mikroglia wissen, stammt aus Studien an Nagetieren oder seltener aus postmortalen menschlichen Proben ⁴¹⁵. Die Problematik der Vergleichbarkeit entsteht auf mehreren Untersuchungsebenen, die weit über die direkte Vergleichbarkeit von Mikroglia aus Mensch und Nagetier hinausreicht. Vielmehr umfasst sie die im Primärcharakter von Mikroglia begründete sensible Reaktivität, die unter anderem bestimmt wird durch Effektoren, die bekannt, aber nicht veränderbar oder noch unbekannt sind; ebenso sind neben der hier vorrangig betrachteten interspezifischen Heterogenität auch intraspezifische Divergenz und das (Untersuchungs-)Milieu, mit ultrastruktureller Umgebung, technischer Methodik und Effektoren im Sinne umgebender Zellsysteme in-vivo und in-vitro zu beachten. Allen Problemebenen liegt erklärend zugrunde, dass die Anzahl menschlicher Modellsysteme (noch) nicht als Standard Einzug in die Mikrogliaforschung gefunden hat.

Primär basiert das Problemfeld unter anderem auf dem Primärcharakter mikroglialer Zellen. Als reaktive Zellen reagieren diese auf kleinste, durchaus potentiell in Studien nicht berücksichtigte, Veränderung des Milieus; dieses wird bestimmt durch lösliche Faktoren, wie den Zytokinen oder anderen Mitteln der Zell-Zell-Interaktion ^{110,228} sowie - sicherlich nicht abschließend - den elastischen Eigenschaften der umgebenden Substanz, wie in der vorliegenden sowie vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden konnte ^{8,362}. So lassen transkriptomisch ermittelte Unterschiede zwischen murinen und humanen Mikroglia letztlich keine Aussage über generelle Unterschiede zu, sind sie doch als Transkriptionsprofile einzelner Abstufungen einer sensibel-reaktiven Zellklasse zu bewerten. Es hat sich so gezeigt, dass die gewebespezifische Umgebung im Gehirn unabhängig ihrer Spezieszugehörigkeit ein definiertes Transkriptionsprofil hervorruft, das die Identität der Mikroglia spezifiziert ³⁹⁷. Inwieweit diese Unterschiede charakteristische dauerhafte lokale Umweltprägungen oder eher vorübergehende Aktivierungszustände (auch im Untersuchungssetting) widerspiegeln, wie es das Spektrum der Mikrogliaverzweigung nahelegen könnte, muss noch gezeigt werden. Fortschritte in diesem Bereich werden wahrscheinlich von der Definition lokaler Anhaltspunkte abhängen, die Mikroglia-Identitäten bestimmen, sowie von der Charakterisierung verschiedener anatomischer Nischen ^{124,416}. Solche lokale Anhaltspunkte können zur

erhöhten Vergleichbarkeit innerhalb (Mensch zu Mensch und Nagetier zu Nagetier) und unter den Spezies (Nagetier zu Mensch und Mensch zu Nagetier) neben ontologischen Betrachtungszeitpunkten, Untersuchungsmodellen und -protokollen nur eine Erweiterung der Untersuchungstechniken, die näher am humanen Organismus angesiedelt sind, bieten.

Hand in Hand geht diese Überlegung mit der Beachtung intraspezifischer Unterschiede, die eine umfassende interspezifische Vergleichbarkeit bereits in erheblichem Maße beeinflussen. So gibt es nur eine begrenzte Anzahl von Studien, die sich mit der Heterogenität der Mikroglia im menschlichen ZNS befassen. Unter Nutzung der innovativen Einzel-Zell-RNA-Sequenzierung (Single-Cell RNA-Sequencing, scRNA-seq; misst die Verteilung der Expressionsniveaus für jedes Gen in einer Zellpopulation und ermöglicht die Untersuchung neuer biologischer Fragestellungen, bei denen zellspezifische Veränderungen im Transkriptom wichtig sind, zum Beispiel Identifizierung von Zelltypen, Heterogenität von Zellreaktionen, Stochastizität der Genexpression, Rückschlüsse auf genregulatorische Netzwerke in den Zellen⁴¹⁷) konnten verschiedene Transkriptionszustände menschlicher Mikroglia während der Homöostase identifiziert werden¹¹⁴. So zeigt eine junge Studie, die eine Kombination aus Einzelzell-RNA-Sequenzierung und Cytometry by Time of Flight (eine Anwendung der Massenzytometrie zur Quantifizierung markierter Ziele auf der Oberfläche und im Inneren einzelner Zellen, wobei die Immunmarkierung zur Quantifizierung von Proteinen, Kohlenhydraten oder Lipiden in einer Zelle genutzt wird⁴¹⁸) an frisch isolierten humanen Mikroglia verwendet, auffällige Unterschiede in den Transkriptionszuständen in verschiedenen anatomischen Lokalisationen^{419,420}, auf eine räumliche Vielfalt menschlicher Mikroglia hinweisend. Der Vergleich mit Studien zur Heterogenität von Mikrogliaclustern muriner Gehirne zeigte: im Allgemeinen war zusammengenommen die Vielfalt der Mikroglia in menschlichen Gehirnen im Sinne einer größeren räumlichen Heterogenität sowie parallel mehr Aktivierungszuständen deutlich größer als die der Mikroglia von Mäusen, die in hyperhygienischen Einrichtungen gehalten wurden¹¹⁴, was auf Umweltfaktoren oder die längere Lebensspanne des Menschen zurückzuführen sein könnte^{114,115,397}.

Hinzukommend zur räumlichen Heterogenität ist von mindestens ebenso großer Bedeutung ein weiteres von der Funktionsweise der Mikroglia abhängiges Problemkomplex - das der Abhängigkeit mikroglialer Zellen von den sie umgebenden Zellen und ihrer Effektoren. Die meisten Studien über die Wechselwirkungen

zwischen Neuronen und Glia werden an Nagetieren durchgeführt, da es (noch) keine geeigneten menschlichen Modellsysteme gibt, die die Entwicklung von Mikroglia in vivo und das Zusammenspiel zwischen Mikroglia, Makroglia und Neuronen in einem dreidimensionalen Kontext rekapitulieren. Menschliche Modellsysteme sind jedoch unerlässlich, um zu verstehen, wie sich die Interaktionen zwischen Neuronen und Glia auf die Entwicklung, Physiologie und Pathologie des menschlichen ZNS auswirken. So bringt die Mikrogliaforschung neue Lösungsansätze zur Ergründung mikroglialen Charakters in Anwesenheit neuronaler Zellen hervor, hierzu gehört die Entwicklung sogenannter Organoid-Systeme, die eine Brücke zwischen muriner und humaner Mikrogliaforschung zu schlagen versuchen. Wichtig ist, dass mikrogliaähnliche Zellen in Organoiden vorhanden sind, was die Möglichkeit eröffnet, menschliche Mikroglia in einer komplexen Umgebung zu untersuchen, die das lebende Gehirn rekapituliert ⁴²¹. Bemerkenswerterweise, so die Studienergebnisse der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Jeroen Pasterkamp, können sich Mikroglia von Natur aus in einem zerebralen Organoidmodell entwickeln und weisen dabei ihre charakteristische verzweigte Morphologie auf. Das Transkriptom und die Reaktion auf Entzündungsreaktionen dieser im Organoid gezüchteten Mikroglia ähneln sehr stark dem Transkriptom und der Reaktion erwachsener Mikroglia, die akut aus postmortalem menschlichem Hirngewebe isoliert wurden. Insgesamt charakterisiert die Studie ein Mikroglia-enthaltendes Organoidmodell, das ein wertvolles Instrument zur Untersuchung des Zusammenspiels zwischen Mikroglia, Makroglia und Neuronen bei der Entwicklung und Erkrankung des menschlichen Gehirns darstellt ⁴²¹.

Alle Lösungsansätze beschäftigen sich daher mit neuen Methoden, die den Nachteilen Vorhergehender auszuweichen versuchen; das zeigen neue Untersuchungsprotokolle, zu denen mit Sicherheit die Modifikationen bereits bestehender und etablierter Methodik sowie innovative Techniken beisteuern und weiterhin aufzeigen, worin die Bedeutung muriner Untersuchungen auch heute noch liegt: Nicht zuletzt in der Grundlage, die sie für eine Mikrogliaforschung an humanem Gewebe bildet. Die allmähliche Abkehr von der klassischen Zellkultur zu Modifikationen dieser, sowie die Etablierung gänzlich neuer Studienmodelle, kann möglicherweise in Zukunft die Vergleichbarkeit steigern, indem man an dem Zahnrad der Milieubeeinflussung dreht.

4.3.2 Vergleichbarkeit von in-vivo- mit in-vitro-Studien

Bei der Präparation primär-gemischter Zellkulturen aus Mikroglia und Astrozyten, aus denen die Mikroglia isoliert werden, fallen große Mengen an Gewebetrümmern an. Während bereits die Vorbereitung der Zellkultur in diesem Sinne einen Reiz bietet, wird dieser zusätzlich potentiell durch den hohen Serumgehalt im Wachstumsmedium, und fördert die schnelle Umwandlung der Mikrogliazellen in Hirnmakrophagen. Typischerweise werden Mikroglia in-vitro aktiviert, indem man sie potenten immunstimulierenden Substanzen, wie LPS oder IFN γ , aussetzt. Unter Zunahme des Kultivierungsprozesses bedeutet das, dass Zellen, die bereits durch den Kultivierungsprozess in Hirnmakrophagen transformiert wurden, superaktiviert werden, wenn man sie LPS aussetzt. Diese in-vitro-Stimulation erzeugt eine andere Art von aktivierten Mikroglia, als wenn ruhende Mikroglia in-vivo durch neuronale Verletzungen aktiviert würden. In-vivo findet eine Transformation der Mikroglia zu Hirnmakrophagen nur dann statt, wenn Trümmer degenerierter Zellen phagozytiert werden müssen; in Abwesenheit von Zelluntergang werden Mikrogliazellen in-vivo zwar aktiviert, transformieren aber nicht unbedingt zu zur Phagozytose befähigten Hirnmakrophagen. Daher ist es wichtig, die Mikrogliaaktivierung in-vitro nicht mit der Mikrogliaaktivierung in-vivo gleichzusetzen ^{2,422}.

Techniken zur Induktion der Mikrogliaverzweigung in-vitro, einschließlich der Verwendung organotypischer oder Slice-Kulturen, der Co-Kultivierung von Mikroglia mit Astrozyten oder der Exposition gegenüber astrozytenkonditioniertem Medium oder der Behandlung mit verzweigungsfördernden Substanzen wie Vitamin E und Thapsigargin können es Forschern ermöglichen, verzweigte Mikroglia direkter zu untersuchen ⁴²³⁻⁴²⁸. So nutzt unsere Studie, die auf der Charakterisierung kultivierter Zellen fußt, initial Ko-Kulturen, in denen Mikroglia astrozytär begleitet werden. In einem weiteren Schritt wurden Erstere aus der Mischkultur isoliert und auf elastischen PDMS-Substraten kultiviert, auf denen keine Anzeichen für eine Zunahme der phagozytischen Aktivität im Sinne einer Funktionsaufnahme bei Transformation zu Hirnmakrophagen, die anhand der CD68-mRNA-Expression bewertet wurde, zu detektieren war (Blaschke, Demir et al., 2020)s. Wenngleich diese Technik weiterhin zweifelsfrei eine induzierte Reaktion darstellt, verursacht diese Herangehensweise dennoch weniger als die konventionelle Zellkulturtechnik eine Superaktivierung.

Ein Großteil des Wissens über die molekularen und zellulären Prinzipien sowie die Folgen der mikroglialen Aktivierung wurde aus experimentellen Stimulationen unter kontrollierten in-vitro-Bedingungen gewonnen ¹¹⁰. Auch wenn der Verlust des Gewebekontextes unvermeidliche Einschränkungen mit sich bringt (Fehlen von Umweltreizen mit aktivitätssteuerndem Einfluss), können die Schritte und Merkmale der Aktivierung durch viele der wichtigsten Rezeptorsysteme im Wesentlichen rekapituliert werden. Bestimmte Manipulations- und Überwachungsoptionen sind in vivo noch nicht in gleicher Weise zugänglich, so dass die Arbeit mit Zellpräparaten als ergänzenden Ansatz wertvoll erscheint ².

4.4 Perspektive - Mikroglia als therapeutisches Target

Als Pío del Río-Hortega 1919 erstmals Mikroglia anhand von Siliziumcarbonat-Färbungen von animalen und humanem Hirngewebe charakterisierte, war er beeindruckt von der morphologischen Plastizität und der Fähigkeit der Mikroglia zur Phagozytose ¹⁷⁵. Ein Jahrhundert später ermöglichen Fortschritte in der Molekularbiologie, der Bildgebung und der Einzel-Zell-Analyse faszinierende Einblicke in die dynamischen Veränderungen der Mikroglia als Reaktion auf das Altern sowie auf ZNS-Erkrankungen und offenbaren ihr Potential als therapeutisches Target, das die Hoffnungen auf zukünftige kontextabhängige Behandlungsmöglichkeiten weckt ⁶. Allerdings ist die genaue Beschaffenheit des Kontextes, der die verschiedenen Mikroglia-Zustände unter den jeweiligen Krankheitsbedingungen prägt, noch unklar ¹²⁴.

Die jüngste Kartierung der Mikroglia-Vielfalt durch die Integration hochdimensionaler Techniken hat ein neues Licht auf die transkriptionelle und funktionelle Heterogenität mikroglialer Zellen im ZNS geworfen. Die neuesten Erkenntnisse beschreiben eine molekulare Vielfalt der Mikroglia von Nagetieren auf einer zeitlichen und räumlichen Achse während der Ontogenese, des Erwachsenenalters, des Alterns und im Rahmen von Pathologika ^{114,115,429}. Es gibt jedoch noch viele Hindernisse und ungelöste Fragen auf dem Gebiet der Mikrogliaforschung. Dazu gehören die funktionellen und dynamischen Interaktionen zwischen verschiedenen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen. Das dringendste Problem der Mikrogliaforschung ist jedoch die Tatsache, dass der größte Teil unseres Verständnisses der Mikroglia-Biologie auf Tierversuchen beruht. Tatsächlich ist die Menge an funktionellen und

transkriptionellen Daten, die für menschliche Mikroglia während der (Patho-)Physiologie zur Verfügung stehen, spärlich. Während man traditionell davon ausging, dass Mikroglia schnell auf jedes pathologische Ereignis im Gehirn reagieren und zur Wiederherstellung der Homöostase beitragen, wird deutlich, dass diese passive Rolle der Mikroglia bei der Reaktion auf Schäden ihre komplexen Funktionen im ZNS nur unzureichend widerspiegelt. Tatsächlich können Mikroglia selbst neurale Dysfunktion und Neurodegeneration auslösen, indem sie ihre homöostatische Funktion verlieren oder aberrante, nicht terminierte Funktionszustände einnehmen. Viele genetische Veränderungen, die mit einem erhöhten Risiko für neurologische und psychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie, Autismus-Spektrum-Störung, frontotemporale Demenz und Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht werden, betreffen Gene, die von Mikroglia stark exprimiert werden ⁶.

So müssen, bevor die Mikroglia-Modulation für die Behandlung von ZNS-Erkrankungen genutzt werden kann, noch viele Hindernisse überwunden werden. Es erscheint unerlässlich, Medikamente zu entwickeln, die spezifisch auf krankheitsbedingte Mikroglia-Zustände abzielen, ohne homöostatische Mikroglia- oder Makrophagenpopulationen im peripheren Gewebe zu beeinträchtigen. Diese Wirkstoffe müssten die Blut-Hirn-Schranke überwinden, um in das Hirnparenchym zu gelangen, und im Falle der Gentechnik müssten effiziente Vektoren für menschliche Mikroglia zur Verfügung stehen, die keine Entzündungen auslösen. Die Protokolle für die Transplantation von gentechnisch veränderten myeloischen Zellen in das menschliche ZNS müssten ebenfalls optimiert werden. Interventionen müssten möglicherweise zeitlich begrenzt werden, wenn krankheitsassoziierte Mikroglia dynamische Zustände sind. Eine dynamische Modulation der Mikrogliafunktion wäre erforderlich, um die räumlich und zeitlich unterschiedlichen Rollen der krankheitsassoziierten Mikrogliazustände und die komplexen Interaktionen der Mikroglia mit anderen Immunzellen, wie beispielweise grenznahen Hirnmakrophagen, Astrozyten, Oligodendrozyten und peripheren Immunzellen sowie Endothelzellen, im Krankheitsverlauf zu berücksichtigen, was eine immense Aufgabe darstellt. Dennoch hat sich unser Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Mikroglia und anderen Zelltypen im ZNS und in der Peripherie in den letzten Jahren drastisch verbessert und könnte sogar ermöglichen, die Funktion der Mikroglia indirekt und ohne Eindringen in das ZNS zu beeinflussen ⁶.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse aus 100 Jahren Mikrogliaforschung kaum Zweifel an der Bedeutung der Mikroglia für die Physiologie des ZNS und für die Entwicklung von ZNS-Erkrankungen lassen. In Zukunft werden Ansätze auf Einzelzellebene, neuartige Tiermodelle, Fate Mapping und bildgebende Verfahren, von Patienten stammende kultivierte Mikrogliazellen und andere innovative Techniken helfen, viele der noch ungelösten Fragen über die Zelle zu beantworten, die Pío del Río-Hortega einst erstmals als „Mikroglia“ bezeichnete ¹²⁴.

5. Literaturverzeichnis

1. Benarroch EE. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* 2013; **81**(12): 1079-88.
2. Streit WJ. Microglial Cells. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. *Neuroglia*. 3. ed. United States of America, 198 Madison Avenue, New York, NY 10016: Oxford University Press; 2012: 86-97.
3. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; **308**(5726): 1314-8.
4. Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 2011; **31**(45): 16064-9.
5. Du L, Zhang Y, Chen Y, Zhu J, Yang Y, Zhang HL. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol* 2017; **54**(10): 7567-84.
6. Priller J, Prinz M. Targeting microglia in brain disorders. *Science* 2019; **365**(6448): 32-3.
7. Polazzi E, Monti B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol* 2010; **92**(3): 293-315.
8. Moshayedi P, Ng G, Kwok JC, et al. The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials* 2014; **35**(13): 3919-25.
9. Verkhratsky A, Butt AM. *Glial physiology and pathophysiology*. Wiley-Blackwel, Chichester. 2013: 560.
10. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 2017; **35**: 441-68.
11. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci* 2010; **17**(1): 6-10.
12. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; **330**(6005): 841-5.
13. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 2013; **16**(3): 273-80.
14. Verkhratsky A, Ho MS, Zorec R, Parpura V. The Concept of Neuroglia. *Adv Exp Med Biol* 2019; **1175**: 1-13.

15. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1999; **117**(2): 145-52.
16. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 2014; **32**: 367-402.
17. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; **19**(8): 312-8.
18. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; **8**(6): 752-8.
19. Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay ME. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast* 2014; **2014**: 610343.
20. Sierra A, Tremblay ME, Wake H. Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Front Cell Neurosci* 2014; **8**: 240.
21. Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; **20**(3): 269-87.
22. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 2007; **131**(6): 1164-78.
23. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009; **29**(13): 3974-80.
24. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 2010; **7**(4): 483-95.
25. Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 2010; **8**(11): e1000527.
26. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; **333**(6048): 1456-8.
27. Bruce-Keller AJ. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 1999; **58**(1): 191-201.
28. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 2013; **77**(1): 10-8.

29. Ekdahl CT. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol* 2012; **3**: 41.
30. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1990; **1**(1): 2-5.
31. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; **4**(4): 399-418.
32. Tang Y, Le W. "Good" and "bad" microglia in Parkinson's disease: an understanding of homeostatic mechanisms in immunomodulation. In: Thomas M, ed. *Inflammation in Parkinson's disease*. Springer, New York; 2014: 105-26.
33. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; **10**(11): 1387-94.
34. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 2005; **76**(2): 77-98.
35. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**(1): 57-69.
36. Krafft PR, Bailey EL, Letic T, et al. Etiology of stroke and choice of models. *Int J Stroke* 2012; **7**(5): 398-406.
37. Virchow R. Virchow R Ueber das granulirte Ansehen der Wandungen der Gehirnvventrikel In: Virchow R (ed) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Meidinger Sohn & Comp., Frankfurt A.M. 1856: 885-91.
38. Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Befundung auf physiologische und pathologische Gewebelehre, 20 Vorlesungen, gehalten während d. Monate Feb., März und April 1858 im Patholog. Inst. zu Berlin*. Auguts Hirschwald, Berlin. 1858: 440.
39. Haller A. *First Lines of Physiology*. . 1966: 10-1.
40. Jakel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci* 2017; **11**: 24.
41. Hawkins A, Olszewski J. Glia/nerve cell index for cortex of the whale. *Science* 1957; **126**(3263): 76-7.
42. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol* 2016; **524**(18): 3865-95.

43. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 2009; **513**(5): 532-41.
44. Herculano-Houzel S, Lent R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J Neurosci* 2005; **25**(10): 2518-21.
45. Lent R, Azevedo FA, Andrade-Moraes CH, Pinto AV. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *Eur J Neurosci* 2012; **35**(1): 1-9.
46. Stallcup WB. The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Dev Biol* 1981; **83**(1): 154-65.
47. Verkhratsky A, Nedergaard M. The homeostatic astroglia emerges from evolutionary specialization of neural cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2016; **371**(1700).
48. Verkhratsky A, Rodriguez JJ, Parpura V. Neuroglia in ageing and disease. *Cell Tissue Res* 2014; **357**(2): 493-503.
49. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2016; **275 Pt 3**: 305-15.
50. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 2014; **81**(2): 229-48.
51. Lanciotti A, Brignone MS, Bertini E, Petrucci TC, Aloisi F, Ambrosini E. Astrocytes: Emerging Stars in Leukodystrophy Pathogenesis. *Transl Neurosci* 2013; **4**(2).
52. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; **50**(4): 427-34.
53. Pekny M, Pekna M, Messing A, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 2016; **131**(3): 323-45.
54. Sofroniew MV. Astroglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; **7**(2): a020420.
55. Sofroniew MV. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist* 2014; **20**(2): 160-72.
56. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci* 2015; **16**(5): 249-63.

57. Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 2012; **121**(1): 4-27.
58. Verkhratsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 2014; **42**(5): 1291-301.
59. Kidd GJ, Ohno N, Trapp BD. Biology of Schwann cells. *Handb Clin Neurol* 2013; **115**: 55-79.
60. Salzer JL. Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; **7**(8): a020529.
61. Iloghen O, Manole E, Gherghiceanu M, Popescu BO, Creafalan LC. Non-Myelinating Schwann Cells in Health and Disease *IntechOpen* 2020.
62. Todd KJ, Robitaille R. Neuron-glia interactions at the neuromuscular synapse. *Novartis Found Symp* 2006; **276**: 222-9; discussion 9-37, 75-81.
63. Sugiura Y, Lin W. Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. *Biosci Rep* 2011; **31**(5): 295-302.
64. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999; **22**(5): 208-15.
65. Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG. The tripartite synapse : glia in synaptic transmission. Oxford: Oxford University Press; 2002.
66. Ko CP, Robitaille R. Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; **7**(10): a020503.
67. Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**(2): 624-30.
68. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Rev* 2005; **48**(3): 457-76.
69. Huang LY, Gu Y, Chen Y. Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia* 2013; **61**(10): 1571-81.
70. Ruitenberg MJ, Vukovic J, Sarich J, Busfield SJ, Plant GW. Olfactory ensheathing cells: characteristics, genetic engineering, and therapeutic potential. *J Neurotrauma* 2006; **23**(3-4): 468-78.

71. Grubisic V, Gulbransen BD. Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol* 2017; **595**(2): 557-70.
72. Grubisic V, Verkhatsky A, Zorec R, Parpura V. Enteric glia regulate gut motility in health and disease. *Brain Res Bull* 2018; **136**: 109-17.
73. Dudenredaktion. Glia. Duden online; o.D.
74. Dudenredaktion. Astro-. Duden online; o.D.
75. Dudenredaktion. Zytos-. Duden online; o.D.
76. Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 2010; **20**(5): 588-94.
77. Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 2018; **98**(1): 239-389.
78. Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q, Anderson DJ. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 2008; **133**(3): 510-22.
79. Tsai HH, Li H, Fuentealba LC, et al. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* 2012; **337**(6092): 358-62.
80. Tabata H. Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci* 2015; **9**: 114.
81. Kettenmann H, Verkhatsky A. [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2011; **79**(10): 588-97.
82. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 2012; **814**: 23-45.
83. Reichenbach A, Wolburg H. Astrocytes and Ependymal Glia. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. Neuroglia. 3. ed. United States of America, 198 Madison Avenue, New York, NY 10016: Oxford University Press; 2012: 35-49.
84. Feig SL, Haberly LB. Surface-associated astrocytes, not endfeet, form the glia limitans in posterior piriform cortex and have a spatially distributed, not a domain, organization. *J Comp Neurol* 2011; **519**(10): 1952-69.
85. Chan-Palay V, Palay SL. The form of velate astrocytes in the cerebellar cortex of monkey and rat: high voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1972; **138**(1): 1-19.

86. Beattie R, Hippenmeyer S. Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. *FEBS Lett* 2017; **591**(24): 3993-4008.
87. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 2009; **32**: 149-84.
88. Rakic P. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 2003; **43**(1): 19-32.
89. Sild M, Ruthazer ES. Radial glia: progenitor, pathway, and partner. *Neuroscientist* 2011; **17**(3): 288-302.
90. Young JK, McKenzie JC, Baker JH. Association of iron-containing astrocytes with dopaminergic neurons of the arcuate nucleus. *J Neurosci Res* 1990; **25**(2): 204-13.
91. Liu X, Zhang Z, Guo W, Burnstock G, He C, Xiang Z. The superficial glia limitans of mouse and monkey brain and spinal cord. *Anat Rec (Hoboken)* 2013; **296**(7): 995-1007.
92. Dudenredaktion. Ependym. Duden online; o.D.
93. Reichenbach A, Bringmann A. Comparative anatomy of glial cells in mammals (2nd ed.). In: Kaas J, ed. *Evolution of Nervous Systems*. New York: Academic Press/Elsevier; 2017: 309-48.
94. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Reichenbach A. Ependymal Cells. In: Squire L, ed. *The New Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford, England: Academic Press; 2009: 1133-40.
95. Andriezen WL. The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br Med J* 1893; **2**(1700): 227-30.
96. Oberheim NA, Takano T, Han X, et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 2009; **29**(10): 3276-87.
97. Colombo JA. Interlaminar glia and other glial themes revisited: pending answers following three decades of glial research. *Neuroglia* 2018: 1:7-20.
98. Butt AM, Papanikolaou M, Rivera A. Physiology of Oligodendroglia. *Adv Exp Med Biol* 2019; **1175**: 117-28.
99. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest* 2017; **127**(9): 3271-80.
100. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; **8**(1): a020479.

101. Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 2008; **135**(1): 145-57.
102. Zhu X, Hill RA, Dietrich D, Komitova M, Suzuki R, Nishiyama A. Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Development* 2011; **138**(4): 745-53.
103. Dimou L, Gallo V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* 2015; **63**(8): 1429-51.
104. Simon C, Gotz M, Dimou L. Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 2011; **59**(6): 869-81.
105. Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2009; **10**(1): 9-22.
106. Filous AR, Tran A, Howell CJ, et al. Entrapment via synaptic-like connections between NG2 proteoglycan+ cells and dystrophic axons in the lesion plays a role in regeneration failure after spinal cord injury. *J Neurosci* 2014; **34**(49): 16369-84.
107. Scafidi J, Hammond TR, Scafidi S, et al. Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. *Nature* 2014; **506**(7487): 230-4.
108. Whittaker MT, Zai LJ, Lee HJ, et al. GGF2 (Nrg1-beta3) treatment enhances NG2+ cell response and improves functional recovery after spinal cord injury. *Glia* 2012; **60**(2): 281-94.
109. Claus HL, Walberer M, Simard ML, et al. NG2 and NG2-positive cells delineate focal cerebral infarct demarcation in rats. *Neuropathology* 2013; **33**(1): 30-8.
110. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; **91**(2): 461-553.
111. Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay ME. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol* 2017; **595**(6): 1929-45.
112. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 2007; **147**(4): 867-83.
113. Savage JC, Picard K, Gonzalez-Ibanez F, Tremblay ME. A Brief History of Microglial Ultrastructure: Distinctive Features, Phenotypes, and Functions Discovered Over the Past 60 Years by Electron Microscopy. *Front Immunol* 2018; **9**: 803.
114. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 2019; **566**(7744): 388-92.

115. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep* 2020; **30**(5): 1271-81.
116. Dudenredaktion. Phage. Duden online; o.D.
117. Kaufmann SH. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* 2008; **9**(7): 705-12.
118. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**(12): 953-64.
119. Aschoff L. The reticuloendothelial system. Das retikuloendotheliale System. . *Erg Inn MedKinderheilk* 1924; **26**: 1-117.
120. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; **327**(5966): 656-61.
121. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972; **46**(6): 845-52.
122. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010; **468**(7323): 562-6.
123. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 2020; **14**: 198.
124. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 2019; **179**(2): 292-311.
125. Prinz M. Microglia Lineage and Development. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. *Neuroglia*. 3. ed. United States of America, 198 Madison Avenue, New York, NY 10016: Oxford University Press; 2012: 172-82.
126. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; **111**(7): 927-30.
127. Hamilton JA. GM-CSF in inflammation. *J Exp Med* 2020; **217**(1).
128. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 1980; **56**(6): 947-58.
129. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 2007; **28**(1): 12-8.

130. Kierdorf K, Masuda T, Jordao MJC, Prinz M. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2019; **20**(9): 547-62.
131. Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol* 2017; **18**(4): 385-92.
132. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 2014; **15**(5): 300-12.
133. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002; **40**(2): 140-55.
134. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985; **15**(2): 313-26.
135. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 2016; **44**(3): 450-62.
136. Gomez Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F. Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia* 2013; **61**(1): 112-20.
137. Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat* 2010; **217**(4): 436-48.
138. Schlegelmilch T, Henke K, Peri F. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 2011; **21**(1): 5-10.
139. Swinnen N, Smolders S, Avila A, et al. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* 2013; **61**(2): 150-63.
140. Cuadros MA, Martin C, Coltey P, Almendros A, Navascues J. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol* 1993; **330**(1): 113-29.
141. Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* 2001; **238**(2): 274-88.
142. Pont-Lezica L, Bechade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A. Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* 2011; **119**(5): 901-8.
143. Sorokin SP, Hoyt RF, Jr., Blunt DG, McNelly NA. Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat Rec* 1992; **232**(4): 527-50.

144. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; **39**(1): 151-70.
145. Lopez-Atalaya JP, Askew KE, Sierra A, Gomez-Nicola D. Development and maintenance of the brain's immune toolkit: Microglia and non-parenchymal brain macrophages. *Dev Neurobiol* 2018; **78**(6): 561-79.
146. Reu P, Khosravi A, Bernard S, et al. The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep* 2017; **20**(4): 779-84.
147. Brioschi S, Zhou Y, Colonna M. Brain Parenchymal and Extraparenchymal Macrophages in Development, Homeostasis, and Disease. *J Immunol* 2020; **204**(2): 294-305.
148. Takahashi K, Yamamura F, Naito M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 1989; **45**(2): 87-96.
149. Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; **66**(5): 372-82.
150. Kurz H, Christ B. Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 1998; **22**(1): 98-102.
151. Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 2005; **106**(9): 3004-11.
152. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 745-85.
153. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 2007; **53**(2): 344-54.
154. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2011; **14**(10): 1227-35.
155. Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 1998; **8**(5): 458-74.
156. Rezaie P, Male D. Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech* 1999; **45**(6): 359-82.
157. Rigato C, Buckinx R, Le-Corronc H, Rigo JM, Legendre P. Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 2011; **59**(4): 675-95.

158. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 2011; **14**(9): 1142-9.
159. Chvatal A, Verkhratsky A. An Early History of Neuroglial Research: Personalities. *Neuroglia* 2018.
160. Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 2008; **31**(12): 653-9.
161. Golgi C. Sulla sostanza connettiva del cervello (nevroglia). Rendiconti del R. Istituto Lambergo di Scienze e Lettere. Serie 2. 1870: 3:275-7.
162. Golgi C. Opera Omnia. Hoepli, Milano. 1903.
163. Ramón y Cajal S. Algunas conjeturas sobre el mecanismo anatómico de la ideación, asociación y atención. *Rev Med Cirug* 1895: Pr.c. 36, 3-14.
164. Schleich C. Schmerzlose Operationen: Oertliche Betäubung mit indifferenten Flüssigkeiten. Psychophysik des natürlichen und künstlichen Schlafes. Berlin, Julius Springer. 1894: 256.
165. Von Lenhossék M. Der Feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuerer Forschung. 1895.
166. Ramón y Cajal S. Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres. Maloine Paris. 1909.
167. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; **119**(1): 7-35.
168. Robertson WF. On a new method of obtaining a black reaction in certain tissue-elements of the central nervous system (platinum method). *Scitt med surg J* 1899: 4:23-30.
169. Robertson WF. A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. *J Ment Sci* 1900: 46:733-52.
170. Sturrock RR. William Ford Robertson (1867-1923): his study of neuroglia. *Med Hist* 1975; **19**(4): 370-5.
171. Jones EG. Golgi, Cajal and the Neuron Doctrine. *J Hist Neurosci* 1999; **8**(2): 170-8.
172. Del Río-Hortega P. Estudios sobre la neuroglia. La glia de escasas radiaciones oligodendrogliá. . *Biol Soc Esp Biol* 1921: 21:64-92.

173. Del Río-Hortega Bereciartu J. Pio del Río-Hortega: The Revolution of Glia. *Anat Rec (Hoboken)* 2020; **303**(5): 1232-41.
174. Stallcup WB. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol* 2002; **31**(6-7): 423-35.
175. Del Río-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglia. *Bol de la Soc esp de biol* 1919; 9:69-120.
176. Del Río-Hortega P. La microglia y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab del Lab de invest biol* 1920; 18:37.
177. Del Río-Hortega P. Microglia. *Penfield W (ed) Cytology and cellular pathology of the nervous system* 1932; **vol 2** 482-534.
178. Tremblay ME, Lecours C, Samson L, Sanchez-Zafra V, Sierra A. From the Cajal alumni Achucarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front Neuroanat* 2015; **9**: 45.
179. Ramón y Cajal S. Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano Trabajos del laborat. de investig. biol. de la univ. de Madrid. *ref Zentralbl f d ges Neurol u Psychiatrie* 1913; **10**: 109.
180. Ramón y Cajal S. Algunas consideraciones sobre la mesoglia de Robertson y Río Hortega. Trabajos del laborat. de investig. biol. de la univ. de Madrid. *ref Zentralbl f d ges Neurol u Psychiatrie* 1920; **24**: 4.
181. Metz A, Spatz H. Die Hortegaschen Zellen (= das sogenannte „dritte Element“) und über ihre funktionelle Bedeutung). *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 1924; **89**: 138-70.
182. Garcia-Marin V, Garcia-Lopez P, Freire M. Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci* 2007; **30**(9): 479-87.
183. Frommann C. Untersuchungen über die Gewebsveränderungen bei der Multiplen Sklerose des Gehirns und Rückenmarks. *Jena: Verlag von Gustav Fischer* 1878.
184. Matcovitch-Natan O, Winter DR, Giladi A, et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 2016; **353**(6301): aad8670.
185. Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ. Response of microglial cells to experimental rat glioma. *Glia* 1992; **6**(1): 75-9.
186. Streit WJ, Kreutzberg GW. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp Neurol* 1988; **268**(2): 248-63.

187. Streit WJ, Xue QS. Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; **4**(4): 371-9.
188. Ramos GC. Inflammation as an animal development phenomenon. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**: 983203.
189. Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2005; **2**(12): 932-40.
190. Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. Neuroglia. 3. ed. United States of America, 198 Madison Avenue, New York, NY 10016: Oxford University Press; 2012: 223-37.
191. Ashwell K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; **58**(1): 1-12.
192. Cuadros MA, Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 1998; **56**(2): 173-89.
193. Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 2008; **28**(32): 8138-43.
194. Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol* 1997; **377**(1): 70-84.
195. Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 2004; **41**(4): 535-47.
196. Sedel F, Bechade C, Vyas S, Triller A. Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J Neurosci* 2004; **24**(9): 2236-46.
197. Ashwell KW, Hollander H, Streit W, Stone J. The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci* 1989; **2**(5): 437-48.
198. Cuadros MA, Moujahid A, Martin-Partido G, Navascues J. Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 1992; **148**(1-2): 11-4.
199. Takahashi K, Rochford CD, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* 2005; **201**(4): 647-57.

200. Hristova M, Cuthill D, Zbarsky V, et al. Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development. *Glia* 2010; **58**(1): 11-28.
201. Frade JM, Barde YA. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 1998; **20**(1): 35-41.
202. Ashwell K. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 1990; **55**(2): 219-30.
203. Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 2013; **36**(4): 209-17.
204. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 2009; **32**(8): 421-31.
205. Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1968; **85**(2): 145-57.
206. Nance E, Kambhampati SP, Smith ES, et al. Dendrimer-mediated delivery of N-acetyl cysteine to microglia in a mouse model of Rett syndrome. *J Neuroinflammation* 2017; **14**(1): 252.
207. Milinkeviciute G, Henningfield CM, Muniak MA, Chokr SM, Green KN, Cramer KS. Microglia Regulate Pruning of Specialized Synapses in the Auditory Brainstem. *Front Neural Circuits* 2019; **13**: 55.
208. Sominsky L, De Luca S, Spencer SJ. Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; **94**: 56-60.
209. Wilton DK, Dissing-Olesen L, Stevens B. Neuron-Glia Signaling in Synapse Elimination. *Annu Rev Neurosci* 2019; **42**: 107-27.
210. Choudhury ME, Miyanishi K, Takeda H, et al. Phagocytic elimination of synapses by microglia during sleep. *Glia* 2020; **68**(1): 44-59.
211. Rodriguez-Iglesias N, Sierra A, Valero J. Rewiring of Memory Circuits: Connecting Adult Newborn Neurons With the Help of Microglia. *Front Cell Dev Biol* 2019; **7**: 24.
212. Augusto-Oliveira M, Arrifano GPF, Malva JO, Crespo-Lopez ME. Adult Hippocampal Neurogenesis in Different Taxonomic Groups: Possible Functional Similarities and Striking Controversies. *Cells* 2019; **8**(2).

213. Vivar C, van Praag H. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front Neural Circuits* 2013; **7**: 15.
214. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010; **11**(5): 339-50.
215. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(23): 13427-31.
216. Speisman RB, Kumar A, Rani A, et al. Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging* 2013; **34**(1): 263-74.
217. Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci* 2010; **33**(12): 569-79.
218. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011; **477**(7362): 90-4.
219. Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Lopes-Araujo A, et al. What Do Microglia Really Do in Healthy Adult Brain? *Cells* 2019; **8**(10).
220. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001; **21**(18): 7153-60.
221. Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, et al. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 2006; **54**(8): 815-25.
222. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 2010; **116**(5): 829-40.
223. Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, Lang R, Uv A, Betsholtz C. A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One* 2011; **6**(1): e15846.
224. Masuch A, Shieh CH, van Rooijen N, van Calker D, Biber K. Mechanism of microglia neuroprotection: Involvement of P2X7, TNFalpha, and valproic acid. *Glia* 2016; **64**(1): 76-89.
225. Kato G, Inada H, Wake H, et al. Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. *eNeuro* 2016; **3**(3).

226. Zotova E, Holmes C, Johnston D, Neal JW, Nicoll JA, Boche D. Microglial alterations in human Alzheimer's disease following Abeta42 immunization. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; **37**(5): 513-24.
227. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 2017; **79**: 619-43.
228. Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, et al. The plasticity of primary microglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation* 2018; **15**(1): 226.
229. Varnum MM, Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; **60**(4): 251-66.
230. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 2004; **1**(1): 14.
231. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; **6**: 13.
232. Lynch MA. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol* 2009; **40**(2): 139-56.
233. Hanisch UK. Factors controlling microglial activation. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. *Neuroglia*. 3. ed. United States of America, 198 Madison Avenue, New York, NY 10016: Oxford University Press; 2012: 614-25.
234. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; **140**(6): 918-34.
235. Ransohoff RM, El Khoury J. Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; **8**(1): a020560.
236. Lenz KM, Nelson LH. Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. *Front Immunol* 2018; **9**: 698.
237. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 2016; **53**(2): 1181-94.
238. Blaschke S, Vay SU, Pallast N, et al. Substrate elasticity induces quiescence and promotes neurogenesis of primary neural stem cells-A biophysical in vitro model of the physiological cerebral milieu. *J Tissue Eng Regen Med* 2019; **13**(6): 960-72.
239. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 2016; **19**(8): 987-91.

240. Tang Y. Editorial: Microglial Polarization in the Pathogenesis and Therapeutics of Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 2018; **10**: 154.
241. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 2006; **177**(10): 7303-11.
242. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(12): 958-69.
243. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**(11): 723-37.
244. Jang E, Kim JH, Lee S, et al. Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. *J Immunol* 2013; **191**(10): 5204-19.
245. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; **11**(10): 889-96.
246. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; **23**(11): 549-55.
247. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; **164**(12): 6166-73.
248. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; **41**(1): 14-20.
249. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005; **175**(1): 342-9.
250. Graeber MB. Changing face of microglia. *Science* 2010; **330**(6005): 783-8.
251. Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009; **18**(3): 482-96.
252. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**(12): 826-37.
253. Shechter R, Schwartz M. CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends Mol Med* 2013; **19**(3): 135-43.

254. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992; **176**(1): 287-92.
255. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* 2009; **31**(4): 539-50.
256. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(3): 1503-8.
257. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 2013; **341**(6151): 1246-9.
258. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 2013; **341**(6151): 1250-3.
259. Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, et al. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 2008; **134**(3): 496-507.
260. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 2011; **12**(3): 231-8.
261. Scotton CJ, Martinez FO, Smelt MJ, et al. Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13. *J Immunol* 2005; **174**(2): 834-45.
262. van de Garde MD, Martinez FO, Melgert BN, Hylkema MN, Jonkers RE, Hamann J. Chronic exposure to glucocorticoids shapes gene expression and modulates innate and adaptive activation pathways in macrophages with distinct changes in leukocyte attraction. *J Immunol* 2014; **192**(3): 1196-208.
263. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; **170**(6): 2081-95.
264. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 2011; **147**(4): 868-80.
265. Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 2006; **29**(2): 68-74.

266. De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 2007; **130**(6): 1083-94.
267. Bilbo SD, Schwarz JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci* 2009; **3**: 14.
268. Bilbo SD, Biedenkapp JC, Der-Avakian A, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *J Neurosci* 2005; **25**(35): 8000-9.
269. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**(3): 251-8.
270. Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, et al. Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J* 2010; **24**(2): 548-59.
271. Jeong HK, Ji K, Min K, Joe EH. Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions. *Exp Neurobiol* 2013; **22**(2): 59-67.
272. Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *J Exp Med* 2010; **207**(12): 2689-701.
273. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 2009; **29**(43): 13435-44.
274. Nagarajan S, Chesla S, Cobern L, Anderson P, Zhu C, Selvaraj P. Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fc gamma receptor III) isoforms. Phagocytic signaling by associated zeta and gamma subunits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1995; **270**(43): 25762-70.
275. Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 2014; **82**(2): 380-97.
276. Elmore MRP, Hohsfield LA, Kramar EA, et al. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell* 2018; **17**(6): e12832.
277. Jenkins SJ, Ruckerl D, Thomas GD, et al. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J Exp Med* 2013; **210**(11): 2477-91.

278. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv* 2010; **10**(5): 263-70.
279. Lin HH, Faunce DE, Stacey M, et al. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* 2005; **201**(10): 1615-25.
280. Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. The Role of FcRn in Antigen Presentation. *Front Immunol* 2014; **5**: 408.
281. Lorenz V, Stegner D, Stritt S, et al. Targeted downregulation of platelet CLEC-2 occurs through Syk-independent internalization. *Blood* 2015; **125**(26): 4069-77.
282. Mukherjee S, Klaus C, Pricop-Jeckstadt M, Miller JA, Struebing FL. A Microglial Signature Directing Human Aging and Neurodegeneration-Related Gene Networks. *Front Neurosci* 2019; **13**: 2.
283. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002; **55**(2): 239-49.
284. Bolanos JP, Garcia-Nogales P, Almeida A. Provoking neuroprotection by peroxynitrite. *Curr Pharm Des* 2004; **10**(8): 867-77.
285. Klimaszewska-Lata J, Gul-Hinc S, Bielarczyk H, et al. Differential effects of lipopolysaccharide on energy metabolism in murine microglial N9 and cholinergic SN56 neuronal cells. *J Neurochem* 2015; **133**(2): 284-97.
286. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 323-50.
287. Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, et al. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage--mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production. *Mediators Inflamm* 2009; **2009**: 345838.
288. Sierra A, Navascues J, Cuadros MA, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in microglia of the developing quail retina. *PLoS One* 2014; **9**(8): e106048.
289. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol* 2015; **36**(3): 161-78.
290. West AP, Brodsky IE, Rahner C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011; **472**(7344): 476-80.
291. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **286**(2): 292-7.

292. Yun SP, Kam TI, Panicker N, et al. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med* 2018; **24**(7): 931-8.
293. Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Calpain. In: Lennarz WJ, D. LM, eds. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Academic Press; 2013: 353-61.
294. Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, Fainzilber M. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 2005; **45**(5): 715-26.
295. Jiang SX, Slinn J, Aylsworth A, Hou ST. Vimentin participates in microglia activation and neurotoxicity in cerebral ischemia. *J Neurochem* 2012; **122**(4): 764-74.
296. Holland R, McIntosh AL, Finucane OM, et al. Inflammatory microglia are glycolytic and iron retentive and typify the microglia in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun* 2018; **68**: 183-96.
297. Lowry JR, Klegeris A. Emerging roles of microglial cathepsins in neurodegenerative disease. *Brain Res Bull* 2018; **139**: 144-56.
298. Nissinen L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1840**(8): 2571-80.
299. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 119-45.
300. Colton C, Wilcock DM. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; **9**(2): 174-91.
301. Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; **4**(4): 389-98.
302. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; **39**(1): 3-18.
303. Quirino IE, Cardoso VN, Santos R, et al. The role of L-arginine and inducible nitric oxide synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013; **37**(3): 392-400.
304. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; **50**(3): 184-95.
305. Kalkman HO, Feuerbach D. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization. *Pharmacol Ther* 2016; **163**: 82-93.

306. Konnecke H, Bechmann I. The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. *Clin Dev Immunol* 2013; **2013**: 914104.
307. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; **73**(1): 161-95.
308. Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **192**(3): 1175-81.
309. Gijbels K, Proost P, Masure S, Carton H, Billiau A, Opdenakker G. Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res* 1993; **36**(4): 432-40.
310. Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 1995; **201**(3): 223-6.
311. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 2001; **22**(10): 571-9.
312. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 2002; **39**(3): 279-91.
313. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**(12): 931-44.
314. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 1998; **274**(5): R1203-11.
315. Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* 2009; **214**(7): 630-41.
316. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 451-83.
317. Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 2005; **26**(2): 104-10.
318. Park HJ, Oh SH, Kim HN, Jung YJ, Lee PH. Mesenchymal stem cells enhance alpha-synuclein clearance via M2 microglia polarization in experimental and human parkinsonian disorder. *Acta Neuropathol* 2016; **132**(5): 685-701.
319. Ohgidani M, Kato TA, Haraguchi Y, et al. Microglial CD206 Gene Has Potential as a State Marker of Bipolar Disorder. *Front Immunol* 2016; **7**: 676.

320. Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**(1): 50-5.
321. Lee SJ, Evers S, Roeder D, et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 2002; **295**(5561): 1898-901.
322. Chieppa M, Bianchi G, Doni A, et al. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol* 2003; **171**(9): 4552-60.
323. Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009; **214**(7): 562-75.
324. Madsen DH, Leonard D, Masedunskas A, et al. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *J Cell Biol* 2013; **202**(6): 951-66.
325. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18**(17): 2352-63.
326. Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 2002; **71**(4): 597-602.
327. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 2001; **167**(11): 6533-44.
328. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 2005; **105**(6): 2549-56.
329. Quirie A, Demougeot C, Bertrand N, et al. Effect of stroke on arginase expression and localization in the rat brain. *Eur J Neurosci* 2013; **37**(7): 1193-202.
330. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **206**(2): 667-73.
331. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; **25**(12): 677-86.
332. Fadini GP, Cappellari R, Mazzucato M, Agostini C, Vigili de Kreutzenberg S, Avogaro A. Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals. *Acta Diabetol* 2013; **50**(6): 977-82.

333. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006; **80**(6): 1298-307.
334. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, et al. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol* 2010; **185**(4): 2044-50.
335. Knudsen NH, Lee CH. Identity Crisis: CD301b(+) Mononuclear Phagocytes Blur the M1-M2 Macrophage Line. *Immunity* 2016; **45**(3): 461-3.
336. Zhou T, Huang Z, Sun X, et al. Microglia Polarization with M1/M2 Phenotype Changes in rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. *Front Neuroanat* 2017; **11**: 77.
337. Hamill OP, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* 2001; **81**(2): 685-740.
338. Kim DH, Wong PK, Park J, Levchenko A, Sun Y. Microengineered platforms for cell mechanobiology. *Annu Rev Biomed Eng* 2009; **11**: 203-33.
339. Eyckmans J, Boudou T, Yu X, Chen CS. A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Dev Cell* 2011; **21**(1): 35-47.
340. Tyler WJ. The mechanobiology of brain function. *Nat Rev Neurosci* 2012; **13**(12): 867-78.
341. Elkin BS, Azeloglu EU, Costa KD, Morrison B, 3rd. Mechanical heterogeneity of the rat hippocampus measured by atomic force microscope indentation. *J Neurotrauma* 2007; **24**(5): 812-22.
342. Gefen A, Gefen N, Zhu Q, Raghupathi R, Margulies SS. Age-dependent changes in material properties of the brain and braincase of the rat. *J Neurotrauma* 2003; **20**(11): 1163-77.
343. Kruse SA, Rose GH, Glaser KJ, et al. Magnetic resonance elastography of the brain. *Neuroimage* 2008; **39**(1): 231-7.
344. Moore SW, Sheetz MP. Biophysics of substrate interaction: influence on neural motility, differentiation, and repair. *Dev Neurobiol* 2011; **71**(11): 1090-101.
345. Moore SW, Roca-Cusachs P, Sheetz MP. Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell* 2010; **19**(2): 194-206.
346. McCracken PJ, Manduca A, Felmlee J, Ehman RL. Mechanical transient-based magnetic resonance elastography. *Magn Reson Med* 2005; **53**(3): 628-39.

347. Zhang J, Green MA, Sinkus R, Bilston LE. Viscoelastic properties of human cerebellum using magnetic resonance elastography. *J Biomech* 2011; **44**(10): 1909-13.
348. Sack I, Streitberger KJ, Krefting D, Paul F, Braun J. The influence of physiological aging and atrophy on brain viscoelastic properties in humans. *PLoS One* 2011; **6**(9): e23451.
349. Wuerfel J, Paul F, Beierbach B, et al. MR-elastography reveals degradation of tissue integrity in multiple sclerosis. *Neuroimage* 2010; **49**(3): 2520-5.
350. Murphy MC, Huston J, 3rd, Jack CR, Jr., et al. Decreased brain stiffness in Alzheimer's disease determined by magnetic resonance elastography. *J Magn Reson Imaging* 2011; **34**(3): 494-8.
351. Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci* 2010; **33**(11): 503-12.
352. Ruoslahti E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 1996; **6**(5): 489-92.
353. Veznedaroglu E, Van Bockstaele EJ, O'Connor MJ. Extravascular collagen in the human epileptic brain: a potential substrate for aberrant cell migration in cases of temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg* 2002; **97**(5): 1125-30.
354. Comley K, Fleck NA. A micromechanical model for the Young's modulus of adipose tissue. *International Journal of Solids and Structures* 2010; **47**: 2982-90.
355. Yamaguchi Y. Leticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**(2): 276-89.
356. Chafi MS, Karami G, Ziejewski M. Biomechanical assessment of brain dynamic responses due to blast pressure waves. *Ann Biomed Eng* 2010; **38**(2): 490-504.
357. Nicolle S, Lounis M, Willinger R. Shear Properties of Brain Tissue over a Frequency Range Relevant for Automotive Impact Situations: New Experimental Results. *Stapp Car Crash J* 2004; **48**: 239-58.
358. Couper Z, Albermani F. Mechanical response of infant brain to manually inflicted shaking. *Proc Inst Mech Eng H* 2010; **224**(1): 1-15.
359. Pintar FA, Kumaresan S, Yoganandan N, Yang A, Stemper B, Gennarelli TA. Biomechanical modeling of penetrating traumatic head injuries: a finite element approach. *Biomed Sci Instrum* 2001; **37**: 429-34.
360. Zhang J, Pintar FA, Yoganandan N, Gennarelli TA, Son SF. Experimental study of blast-induced traumatic brain injury using a physical head model. *Stapp Car Crash J* 2009; **53**: 215-27.

361. Kaster T, Sack I, Samani A. Measurement of the hyperelastic properties of ex vivo brain tissue slices. *J Biomech* 2011; **44**(6): 1158-63.
362. Bollmann L, Koser DE, Shahapure R, et al. Microglia mechanics: immune activation alters traction forces and durotaxis. *Front Cell Neurosci* 2015; **9**: 363.
363. Harris JP, Capadona JR, Miller RH, et al. Mechanically adaptive intracortical implants improve the proximity of neuronal cell bodies. *J Neural Eng* 2011; **8**(6): 066011.
364. Franze K, Janmey PA, Guck J. Mechanics in neuronal development and repair. *Annu Rev Biomed Eng* 2013; **15**: 227-51.
365. Arani A, Murphy MC, Glaser KJ, et al. Measuring the effects of aging and sex on regional brain stiffness with MR elastography in healthy older adults. *Neuroimage* 2015; **111**: 59-64.
366. Schregel K, Wuerfel E, Garteiser P, et al. Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified in vivo by magnetic resonance elastography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**(17): 6650-5.
367. Streitberger KJ, Sack I, Krefting D, et al. Brain viscoelasticity alteration in chronic-progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 2012; **7**(1): e29888.
368. Chauvet D, Imbault M, Capelle L, et al. In Vivo Measurement of Brain Tumor Elasticity Using Intraoperative Shear Wave Elastography. *Ultraschall Med* 2016; **37**(6): 584-90.
369. Murphy MC, Curran GL, Glaser KJ, et al. Magnetic resonance elastography of the brain in a mouse model of Alzheimer's disease: initial results. *Magn Reson Imaging* 2012; **30**(4): 535-9.
370. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; **7**(3): 263-9.
371. Pittock SJ, Lucchinetti CF. The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist* 2007; **13**(2): 45-56.
372. Streitberger KJ, Wiener E, Hoffmann J, et al. In vivo viscoelastic properties of the brain in normal pressure hydrocephalus. *NMR Biomed* 2011; **24**(4): 385-92.
373. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**(5): 319-31.

374. Rabenstein M, Vay SU, Flitsch LJ, Fink GR, Schroeter M, Rueger MA. Osteopontin directly modulates cytokine expression of primary microglia and increases their survival. *J Neuroimmunol* 2016; **299**: 130-8.
375. Blaschke SJ, Demir S, Konig A, et al. Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia. *Front Cell Neurosci* 2020; **14**: 590500.
376. Goriely A, Geers MG, Holzapfel GA, et al. Mechanics of the brain: perspectives, challenges, and opportunities. *Biomech Model Mechanobiol* 2015; **14**(5): 931-65.
377. Kumar SS, Hsiao JH, Ling QD, et al. The combined influence of substrate elasticity and surface-grafted molecules on the ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* 2013; **34**(31): 7632-44.
378. Hersch N, Wolters B, Dreissen G, et al. The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening. *Biol Open* 2013; **2**(3): 351-61.
379. Abraham JA, Linnartz C, Dreissen G, et al. Directing Neuronal Outgrowth and Network Formation of Rat Cortical Neurons by Cyclic Substrate Stretch. *Langmuir* 2019; **35**(23): 7423-31.
380. Schellenberg A, Jousen S, Moser K, et al. Matrix elasticity, replicative senescence and DNA methylation patterns of mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2014; **35**(24): 6351-8.
381. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 1999; **57**(6): 563-81.
382. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 2001; **33**(3): 256-66.
383. Nelson PT, Soma LA, Lavi E. Microglia in diseases of the central nervous system. *Ann Med* 2002; **34**(7-8): 491-500.
384. Rezaie P, Male D. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci* 2002; **11**(4): 325-74.
385. Eskes C, Juillerat-Jeanneret L, Leuba G, Honegger P, Monnet-Tschudi F. Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor- α release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin. *J Neurosci Res* 2003; **71**(4): 583-90.
386. Ilschner S, Brandt R. The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. *Glia* 1996; **18**(2): 129-40.

387. Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H. Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res* 1991; **545**(1-2): 301-6.
388. Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, et al. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(30): 12530-5.
389. Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janmey PA. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophys J* 2006; **90**(8): 3012-8.
390. Moshayedi P, Costa Lda F, Christ A, et al. Mechanosensitivity of astrocytes on optimized polyacrylamide gels analyzed by quantitative morphometry. *J Phys Condens Matter* 2010; **22**(19): 194114.
391. Jagielska A, Norman AL, Whyte G, Vliet KJ, Guck J, Franklin RJ. Mechanical environment modulates biological properties of oligodendrocyte progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2012; **21**(16): 2905-14.
392. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. DNA-Markierung mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU). *Der Experimentator: Immunologie* 4. Auflage ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014: 202-3.
393. Pepe G, De Maglie M, Minoli L, Villa A, Maggi A, Vegeto E. Selective proliferative response of microglia to alternative polarization signals. *J Neuroinflammation* 2017; **14**(1): 236.
394. Franco R, Fernandez-Suarez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2015; **131**: 65-86.
395. Wes PD, Holtman IR, Boddeke EW, Moller T, Eggen BJ. Next generation transcriptomics and genomics elucidate biological complexity of microglia in health and disease. *Glia* 2016; **64**(2): 197-213.
396. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, et al. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014; **17**(1): 131-43.
397. Gosselin D, Skola D, Coufal NG, et al. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science* 2017; **356**(6344).
398. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 2014; **34**(36): 11929-47.
399. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, et al. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* 2013; **16**(12): 1896-905.

400. Hamzei Taj S, Kho W, Aswendt M, et al. Dynamic Modulation of Microglia/Macrophage Polarization by miR-124 after Focal Cerebral Ischemia. *J Neuroimmune Pharmacol* 2016; **11**(4): 733-48.
401. Rabenstein M, Vay SU, Blaschke S, et al. Crosstalk between stressed brain cells: direct and indirect effects of ischemia and aglycemia on microglia. *J Neuroinflammation* 2020; **17**(1): 33.
402. Ajmone-Cat MA, Mancini M, De Simone R, Cilli P, Minghetti L. Microglial polarization and plasticity: evidence from organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 2013; **61**(10): 1698-711.
403. Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 2009; **210**(1-2): 3-12.
404. Wendeln AC, Degenhardt K, Kaurani L, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* 2018; **556**(7701): 332-8.
405. Lyons A, Griffin RJ, Costelloe CE, Clarke RM, Lynch MA. IL-4 attenuates the neuroinflammation induced by amyloid-beta in vivo and in vitro. *J Neurochem* 2007; **101**(3): 771-81.
406. Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1--42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol* 2001; **113**(1): 49-62.
407. Ye SM, Johnson RW. Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *J Neuroimmunol* 1999; **93**(1-2): 139-48.
408. Ye SM, Johnson RW. An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation* 2001; **9**(4): 183-92.
409. Maher FO, Nolan Y, Lynch MA. Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiol Aging* 2005; **26**(5): 717-28.
410. Nolan Y, Maher FO, Martin DS, et al. Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *J Biol Chem* 2005; **280**(10): 9354-62.
411. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 2004; **73**: 749-89.

412. Helfand BT, Mendez MG, Murthy SN, et al. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell* 2011; **22**(8): 1274-89.
413. Helfand BT, Chou YH, Shumaker DK, Goldman RD. Intermediate filament proteins participate in signal transduction. *Trends Cell Biol* 2005; **15**(11): 568-70.
414. Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, et al. Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* 2006; **364**(5): 938-44.
415. Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H. Cien Anos de Microglia: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci* 2019; **42**(11): 778-92.
416. O'Koren EG, Yu C, Klingeborn M, et al. Microglial Function Is Distinct in Different Anatomical Locations during Retinal Homeostasis and Degeneration. *Immunity* 2019; **50**(3): 723-37 e7.
417. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009; **6**(5): 377-82.
418. Tracey LJ, An Y, Justice MJ. CyTOF: An Emerging Technology for Single-Cell Proteomics in the Mouse. *Curr Protoc* 2021; **1**(4): e118.
419. Sankowski R, Bottcher C, Masuda T, et al. Mapping microglia states in the human brain through the integration of high-dimensional techniques. *Nat Neurosci* 2019; **22**(12): 2098-110.
420. Bottcher C, Schlickeiser S, Sneebouer MAM, et al. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci* 2019; **22**(1): 78-90.
421. Ormel PR, Vieira de Sa R, van Bodegraven EJ, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 4167.
422. Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ. Cytokine transcripts expressed by microglia in vitro are not expressed by amoeboid microglia of the developing rat central nervous system. *Glia* 1999; **25**(3): 304-9.
423. Eder C, Schilling T, Heinemann U, Haas D, Hailer N, Nitsch R. Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *Eur J Neurosci* 1999; **11**(12): 4251-61.
424. Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP. Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* 1998; **22**(2): 180-8.

425. Mertsch K, Hanisch UK, Kettenmann H, Schnitzer J. Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system. *J Comp Neurol* 2001; **431**(2): 217-27.
426. Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 1994; **12**(4): 245-58.
427. Tanaka J, Maeda N. Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp Neurol* 1996; **137**(2): 367-75.
428. Yagi R, Tanaka S, Koike T. Thapsigargin induces microglial transformation from amoeboid to ramified type in vitro. *Glia* 1999; **28**(1): 49-52.
429. Ajami B, Samusik N, Wieghofer P, et al. Single-cell mass cytometry reveals distinct populations of brain myeloid cells in mouse neuroinflammation and neurodegeneration models. *Nat Neurosci* 2018; **21**(4): 541-51.