

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Perinatale Programmierung -
Der Effekt einer Stimulation mit Hyper-Interleukin-6
auf Mikroglia (BV-2 Zellen)**

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

vorgelegt von
Isabel Marie Lanz
aus Bielefeld

promoviert am 25. April 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch
2. Gutachter: Professor Dr. med. C. Warnke

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 Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. med. Inga Bae-Gartz

Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother

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.

Das Studiendesign wurde von Frau Dr. med. Inga Bae-Gartz und Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother (beide Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln) erstellt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Christina Vohlen, Biologielaborantin, durchgeführt worden. Lediglich die Stimulation der Zellen und Asservierung für die molekulargenetischen Untersuchungen wurde ohne meine Mithilfe im Forschungslabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln (Forschungspavillon) von Frau Vohlen durchgeführt.

Alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sowie die statistischen Auswertungen sind von mir mit Unterstützung von Frau Dr. med Inga Bae-Gartz, Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother und Frau Christina Vohlen (Biologielaborantin der Uniklinik Köln) selbst durchgeführt worden.

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 verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 11.11.2022

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Planung und Durchführung des Forschungsprojektes sowie bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich danke Professor Jörg Dötsch für die Betreuung meiner Arbeit und die Förderung des wissenschaftlichen Austauschs.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr.med. Inga Bae-Gartz und Frau Dr.med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und sowohl fachliche als auch persönliche Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ein besonders herauszustellender Dank geht an die Biologielaborantin Christina Vohlen, die mir alles mit viel Geduld und Muße beigebracht hat und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für Einwände und Verbesserungsvorschläge danke ich PhD-Studentin Saida Breuer, die mich mehrfach durch differenzierte Anmerkungen und zweckdienliche Diskussionen unterstützt hat. Ich danke Prof. Thomas Langmann und seinen Mitarbeiter*innen für die wissenschaftliche Kooperation mit Bereitstellung der Zellen sowie notwendiger Quellen und Dokumente.

Ich danke dem Köln Fortune-Stipendiaten-Programm, das mir durch die finanzielle Förderung erlaubt hat, mich auf das Promotionsprojekt zu fokussieren.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich auf meinem Weg über das gesamte Studium hinweg und während der Arbeit an dieser Dissertation mit Rat, Anregungen, Geduld und Ermutigung begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 ZUSAMMENFASSUNG	11
2 EINLEITUNG	13
2.1 Die Rolle der hypothalamischen Inflammation in der Pathogenese von Adipositas	15
2.2 Gliazellen im Gehirn	17
2.2.1 Makroglia	18
2.2.2 Mikroglia und ihre Funktion	18
2.2.3 M1-/M2-Polarisierung von Mikroglia und Marker	21
2.3 BV-2 Zellen	24
2.4 Morphologie und IBA1 Aktivierung	24
2.5 Gliose	24
2.6 Synaptische Plastizität und Marker	25
2.7 Extrazelluläre Matrix und Marker	26
2.8 Zytokine	27
2.8.1 Interleukin-6 und gp130-Signaling	27
2.8.2 Hyper-Interleukin-6	29
2.9 Vorarbeiten	30
2.10 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit	31
3 MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 Zellkultur	33
3.2 Geräte und Software	33
3.3 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	34
3.3.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien	36
3.3.2 Oligonukleotide	38
3.3.3 Antikörper und Immunhistochemie	41
3.3.4 Stamm- und Pufferlösungen	43

3.4	Zellkultur	47
3.4.1	Zelllinie BV-2	47
3.4.2	Weiterkultur	47
3.4.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellernte	47
3.4.4	<i>In vitro</i> Stimulationen mit Hyper-Interleukin-6	47
3.5	Molekularbiologische Methoden	48
3.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
3.5.1.1	Grundlagen	48
3.5.1.2	Quantitative Realtime PCR mit Taqman®-Technologie	48
3.5.1.3	Quantitative Realtime PCR mit SYBR-Green®-Technologie	49
3.5.1.4	RNA-Isolierung	49
3.5.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	50
3.5.1.6	Reverse-Transkription – cDNA-Synthese	50
3.5.1.7	Durchführung qPCR	51
3.5.1.8	Relative Quantifizierung	51
3.5.2	Western Blot	51
3.5.2.1	Grundlagen	51
3.5.2.2	Proteinisolation	52
3.5.2.3	Proteinkonzentration	52
3.5.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
3.5.2.5	Blotten	53
3.5.2.6	Proteinnachweis	54
3.6	Morphologische Methoden	55
3.6.1	Durchlichtmikroskopie	55
3.6.2	Fluoreszenzmikroskopie und Immunzytochemie	55
3.6.2.1	IBA1-Färbung	56
3.6.2.2	Phalloidin-Färbung	58
3.7	Funktionsassays	59
3.7.1	Phagozytose-Assay	59
3.8	Statistische Auswertung	59
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf intrazelluläre Signalkaskaden der BV-2 Zellen	61
4.1.1	pSTAT3	61
4.1.2	pERK	64
4.2	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Polarisierung von BV-2 Zellen	65
4.2.1	M1-Marker	65

4.2.2	M2-Marker	68
4.3	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Synaptischen Plastizität	72
4.4	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Extrazellulären Matrix	76
4.5	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Aktivität von BV-2 Zellen	78
4.6	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Morphologie von BV-2 Zellen	79
4.6.1	Fortsatzlänge und Fortsatzanzahl	80
4.7	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Phagozytoseaktivität von BV-2 Zellen	82
5	DISKUSSION	83
5.1	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf intrazelluläre Signalkaskaden der BV-2 Zellen	83
5.2	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Polarisierung von BV-2 Zellen	86
5.3	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Synaptischen Plastizität	89
5.4	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Extrazellulären Matrix	90
5.5	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Aktivität von BV-2 Zellen	91
5.6	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Morphologie von BV-2 Zellen	93
5.7	Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Phagozytoseaktivität von BV-2 Zellen	94
5.8	Limitationen	94
5.8.1	BV-2 Zellen	94
5.8.2	Methoden	95
5.8.3	Forschungsfeld Perinatale Programmierung	97
5.9	Ausblick	97
6	LITERATURVERZEICHNIS	99
7	ANHANG	114
7.1	Abbildungsverzeichnis	114
7.2	Tabellenverzeichnis	116

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3'	3'-Ende der DNA-Sequenz
5'	5'-Ende der DNA-Sequenz
Abb.	Abbildung
A.d.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
Arg1	Arginase1
β-Actin	beta-Actin
BSA	Bovine Serum Albumine
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm²	Quadratzenimeter
CO	Kontrollgruppe
C_T	Cycle Threshold
Cx3cl1/CX3CL1	Fractalkine
Cx3cr1/CX3CR1	Fractalkine-Rezeptor
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dublecco's modified Eigel's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr1	Early growth response protein 1

ERK	Extrazellulär Signalregulierende Kinasen
EZM	Extrazellulärmatrix
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fresh bovine serum
Foxo1/FOXO1	Forkhead-Box-Protein O1
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
H₂O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HFD	Hoch-Fett-Diät
hIL-6	Hyper-Interleukin-6
Homer1a	Homer protein homolog 1
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HT	Hypothalamus
Hz	Hertz
IBA1	Ionized Calcium-binding Adapter-molecule 1
IF	Immunfluoreszenz
II-1β/IL-1β	Interleukin-1 β
II-4/IL-4	Interleukin-4
II-4/IL-4R	Interleukin-4-Rezeptor
II-6/IL-6	Interleukin-6
II-10/IL-10	Interleukin-10
II10-R/IL-10R	Interleukin-10-Rezeptor
II-13/IL-13	Interleukin-13
iNos/iNOS	Induzierbare NO-Synthase
JAK1/2	Januskinase 1/2
kg	Kilogramm
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid

mA	Milliampere
MHCII	Major histocompatibility complex II
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
Mmp9/MMP9	Matrix-Metallopeptidase 9
mol	Mol
mRNA	Messenger RNA
Myd88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88)
nm	Nanometer
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Nfkb1/NFκB1	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NPY	Neuropeptide Y
p	phosphoryliert
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ppara/PPARα	Peroxisom proliferator-aktivierter Rezeptor alpha
Ppary/PPARγ	Peroxisom proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
Primer for	Primer forward (Orientierung 5'-3')
Primer taq	Sonde mit 5'FAM und 3'TAMRA
Primer rev	Primer reverse (Orientierung 3'-5')
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rel.	relative
repr.	repräsentativ
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase

s.	siehe
S.	Seite
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
sIL-6R	Soluble Interleukin-6-Rezeptor
Socs37/SOCS3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
sog.	sogenannte
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription 6
s.u.	siehe unten
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TB	Trypanblau
TBS	TRIS-Buffered Saline
TBST	TRIS-Buffered Saline-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	Transforming growth factor beta
Timp1/2/TIMP1/2	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1/2
Tlr4/TLR4	Toll-like-receptor 4
Tnfa/TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v.a.	vor allem
vGLUT2	Vesicular glutamate transporter 2
vs	versus
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Die Prävalenz von Adipositas nimmt weltweit in allen Altersgruppen stetig zu und birgt größer werdende Herausforderungen im Umgang mit Komorbiditäten und Folgeerscheinungen. Übergewicht in der Schwangerschaft ist mit einer Prädisposition der Nachkommen sowohl für metabolische Erkrankungen und Adipositas als auch für neuropsychiatrische Erkrankungen assoziiert.

Übergewicht induziert im zentralen Nervensystem durch die Aktivierung von proinflammatorischen Signalkaskaden sowohl eine Hypertrophie und Hyperplasie der Gliazellen, auch bekannt als Gliose, als auch eine chronische Überaktivierung der Mikrogliazellen. Beides verändert die Plastizität der Neuronen und ihrer Synapsen und gilt daher als eine mögliche Ursache für eine gestörte Funktion von Nervenzellnetzwerken. Bisher ließ sich nicht differenzieren, ob es maßgeblich die Hypothalamusneuronen selbst oder aber die Mikrogliazellen sind, die den Prozess der Neuroinflammation letztlich unterhalten. In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass es in den Nachkommen adipöser Mütter zu erhöhten Interleukin-6 (IL-6)-Genexpressionswerten im Hypothalamus kam, sowie zu einem starken Anstieg der IBA-1, einem Aktivierungsmarker der Mikroglia, und pSTAT3 Protein Werte, einer proinflammatorischen Signalkaskade. IL-6 ist ein wichtiges Zytokin in der Regulation von Neuroinflammation. Während der klassische Signalweg der IL-6-Kaskade über einen membranständigen IL6-Rezeptor (IL6Ra) initiiert wird und eher als antiinflammatorisch gilt, beschreibt das IL-6-Trans-Signaling die Aktivierung der intrazellulären IL-6-Signalkaskade über einen löslichen IL-6-Rezeptor (sIL6R) und wird eher als proinflammatorische Komponente im IL-6-Signaling diskutiert.

Die selektive Aktivierung des IL-6-Trans-Signaling wird durch ein Designer-Zytokin, Hyper-Interleukin-6 (hIL-6) genannt, erreicht, das aus einer Fusion zwischen IL-6 und dem sIL-6R besteht und lediglich das Trans-Signaling, nicht aber den klassischen Signalweg aktiviert. Da insbesondere die selektive Aktivierung von Mikrogliazellen mit hIL-6 und deren Auswirkung auf die Mikroglia selbst und die Nervenzellnetzwerkausbildung noch nicht beschrieben ist, wurden die Einflüsse von hIL-6 auf BV-2 Mikrogliazellen nach 4-, 8- und 24-stündiger Stimulation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht. Nach Anwachsen der mit hIL-6 stimulierten BV-2 Zellen und deren Stimulation mit hIL-6 wurden die Effekte auf transkriptionaler sowie translationaler, funktioneller und morphologischer Ebene mittels Immunhistochemie untersucht und analysiert.

Die mit hIL-6 stimulierten BV-2 Zellen wiesen zum Teil Anzeichen einer M1-Polarisierung mit vornehmlich proinflammatorischem Wirkprofil bei jedoch gleichzeitiger gegenregulatorischer Heraufregulierung einiger antiinflammatorischer Marker im Zeitverlauf auf. Unter hIL-6-Stimulation zeigte sich zudem eine Herabregulation wichtiger Marker der synaptischen Plastizität in den BV-2 Zellen, sowie eine Heraufregulation von Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), einem

Marker der Degradierung der Extrazellulären Matrix (EZM). Auch zeigte sich in der hIL-6 stimulierten Gruppe eine herabgesetzte Phagozytoseleistung. Im Hinblick auf die Ramifizierung der Mikroglia zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen der stimulierten und der nicht stimulierten Gruppe.

In Zusammenschau der Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von hIL-6 auf BV-2 Zellen beschrieben und Veränderungen in der Genexpression sowie morphologische und funktionelle Alterationen in den Zellen durch die Stimulation mit hIL-6 aufgedeckt werden. Die Daten deuten darauf hin, dass die BV-2-Zellen durch die Stimulation mit hIL-6 und der konsekutiven Initiierung des Trans-Signaling mit einer vermehrten Aktivierung proinflammatorischer Signalwege, mit der Einbuße wichtiger Funktionen der EZM und mit reduzierter Phagozytoseleistung reagieren, jedoch weiterhin bestrebt sind, durch gegenregulatorische Prozesse eine Gewebshomöostase aufrecht zu erhalten. Ein weiterführender Ansatz könnten eine gezielte molekulare Blockade des IL-6-Trans-Signaling in BV-2 Zellen sein, insbesondere um den genaueren Einfluss der hier herausgestellten Effekte des hIL-6 auf Mikrogliazellen in der Pathogenese der Adipositas zu erforschen. Auch wären weitere Daten vor allem an primären Mikrogliazellen von Nachkommen übergewichtiger und schlanker Mäusemüttern ein interessanter Ansatz.

2 Einleitung

Die Prävalenz von Adipositas bei erwachsenen Frauen im gebärfähigen Alter beträgt derzeit 25-40 Prozent und hat auch im Kindes- und Jugendalter in den letzten Jahren weltweit dramatisch zugenommen.¹ Die derzeitige Prävalenz von Übergewicht unter Kindern und Jugendlichen im Alter von 3-17 Jahren beträgt mehr als 20%.² Dass ein hoher Body-Mass-Index (BMI) in heutiger Zeit eine der wichtigsten Einflussgrößen für die Gesundheit der Bevölkerung darstellt, zeigte sich eindrücklich in der Global Burden of Disease Study der World Health Organization (WHO). Von den 84 Risikofaktoren, die von der Global Burden of Disease Study 2017 ausgewertet wurden, verzeichnet ein hoher BMI eindeutig den größten relativen Anstieg seit 1990. Adipositas qualifiziert sich somit im Hinblick auf die Mortalität als einer der fünf wichtigsten Risikofaktoren.³ Die Verschiebung der weltweit häufigsten Todesursachen von Infektionen und Unterernährung hin zu chronischen, nicht übertragbaren Krankheiten bei gleichzeitig stetig steigender Prävalenz von Adipositas kann als eines der größten Versäumnisse unserer Zeit im Bereich der öffentlichen Gesundheit gesehen werden.^{4,5} Mit der weltweiten Adipositasepidemie gehen aufgrund zahlreicher Komorbiditäten nicht nur eine enorme Gefährdung der Gesundheit des Einzelnen, sondern auch weitreichende Kosten für Gesundheitssystem und Staat einher. Dies unterstreicht einerseits die Relevanz politischer Ansätze zum Wandel, andererseits aber auch die weiterführende Forschung im Bereich der genauen molekularen Zusammenhänge von Übergewicht und seinen Folgen.

Bereits im Mutterleib ist das ungeborene Kind einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt. Neben schon identifizierten Risikofaktoren wie psychischen und genetischen Einflüssen, mangelnder körperlicher Betätigung und hochkalorischer Ernährung spielen auch perinatale Zusammenhänge bei der Entstehung und Aufrechterhaltung chronisch inflammatorischer Prozesse im Rahmen kindlicher Adipositas eine entscheidende Rolle. Maternales Übergewicht während der Schwangerschaft gilt als zunehmender Risikofaktor für die Integrität natürlicher Entwicklungsprozesse und für die Entwicklung zahlreicher Erkrankungen in den Nachkommen. Schon in den 1930er Jahren entstand durch die Erkenntnis, dass Unterschiede in Gewicht und Größe eines Fetus bei seiner Geburt Auswirkungen auf die Gesundheit während des gesamten Lebens haben, eine Neubewertung der Regulation fetaler Entwicklungsprozesse. Die von Baker beschriebene "Fetal Origins"-Hypothese ist Teil der Developmental Origins of Health and Disease-Hypothese, die besagt, dass Veränderungen der mütterlichen Ernährung und, damit verbunden des endokrinen Systems, zu Modulationen führen, die die Physiologie der Nachkommen dauerhaft verändern und dadurch für kardiovaskuläre, metabolische und endokrine Erkrankungen im Erwachsenenalter prädisponieren.⁶ Der fetale Hypothalamus wurde als eine Schlüsselstelle identifiziert, die durch vorübergehende Veränderungen im pränatalen endokrinen System programmiert werden kann.^{6,7} Zusätzlich zu einer vorgeburtlichen lebenslangen Prädisposition für

Komponenten des metabolischen Syndroms, wie etwa Adipositas, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen, beeinflusst mütterliches Übergewicht in der Schwangerschaft auch die neurokognitive und neuropsychiatrische Entwicklung und Gesundheit des Kindes.⁸ In einer klinischen Studie zeigte sich eine Assoziation zwischen maternaler Adipositas in der Schwangerschaft und einer schlechteren Leistung der Nachkommen in kognitiven Testungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.⁸ Die Autoren merken jedoch selbst an, dass hier zahlreiche Störfaktoren beachtet werden müssen. Exemplarisch ist das Aufwachsen in einem sozial-schwachen Umfeld und der damit häufig einhergehende schlechtere Zugang zu Bildung zu nennen.⁸ Somit kann trotz signifikanter Ergebnisse nicht von einem kausalen Zusammenhang gesprochen werden. Dass sich ein gesunder Lebensstil während der Schwangerschaft auch positiv auf die neurokognitive Entwicklung des Kindes auswirken kann, konnte in weiteren experimentellen und klinischen Studien gezeigt werden. So stellt beispielsweise auch sportliche Aktivität der Mutter vor und während der Schwangerschaft eine wichtige Einflussgröße in Bezug auf spätere neurokognitive Leistungen der Kinder dar.⁹⁻¹¹ Die Ausbildung von Kontakten zwischen wachsenden Axonen und ihren Zielzellen ist Teil des Entwicklungsprozesses des Nervensystems, insbesondere der Synapsen. Eine Reihe von synaptischen Kontakten wird verstärkt, andere werden gelöscht. Für diese Entwicklungsschritte ist eine hohe Plastizität notwendig. Dies führt gleichzeitig zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Integrität des Gehirns gegenüber Stimuli während der kritischen Phase der funktionellen Reifung. Studien konnten zeigen, dass eine übermäßige Nahrungsaufnahme, insbesondere von Fettsäuren und Zucker, eine Anhäufung proinflammatorischer hirneigener Immunzellen, sogenannter Mikrogliazellen, im Hypothalamus nach sich zieht und diese Mikrogliazellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der hypothalamischen Energiehomöostase einnehmen.¹² Da die Mikroglia auf Entzündungssignale reagiert, können Stimuli, die eine lokale oder systemische Inflammation in einer kritischen Entwicklungsphase auslösen, lebenslange Folgen haben.¹³ Eine mütterliche Immunaktivität, beispielsweise induziert durch eine erhöhte Konzentration proentzündlicher Botenstoffe wie Interleukin-6 im Rahmen einer Infektion oder von Übergewicht, führt bei trächtigen Mäusen zu deutlichen Verhaltensauffälligkeiten in den Nachkommen.¹⁴ Zudem zeigte sich, dass ein zweiter Stimulus (z. B. Stress) in der weiteren Entwicklung bei Mäusen den Schweregrad der Verhaltensdefizite im Zusammenhang mit Angst, Gedächtnis- und Wahrnehmungsfunktion noch verstärkte.¹⁵ Lernen und Gedächtnis sind in hohem Maße von der Proliferation und Entwicklung neuer Neuronen abhängig – der Neurogenese.¹⁶ Zahlreiche Studien mit verschiedenen Versuchsansätzen zeigen, dass Mikroglia entscheidende Regulatoren der Neurogenese,¹⁷ der synaptischen Plastizität,¹⁸ des Lernens und Gedächtnis sind.¹⁹

Heute untersucht das Forschungsfeld der translationalen Neonatologie potenziell schädliche Einflüsse während der intrauterinen, perinatalen sowie frühen postnatalen Phase, die zu einer langfristigen Beeinflussung zellulärer Prozesse der Entwicklung von Organstruktur und -funk-

tion führen. Dieses als „Perinatale Programmierung“ bezeichnete Phänomen kann als eine Reaktion auf spezifische Herausforderungen für den Säugetierorganismus während eines kritischen Entwicklungszeitfensters, die den Verlauf der Entwicklung mit anhaltenden Auswirkungen auf den Phänotyp der Nachkommen und die Prädisposition für zukünftige Krankheiten verändern, definiert werden. Etliche Ursachen der sogenannten „non-communicable-diseases“, nicht übertragbarer Krankheiten, liegen im Lebensstil begründet. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch auch, dass die Prozesse der perinatalen Programmierung mit der dramatischen Zunahme jener Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Physiologie im Zusammenspiel von Mutter, Fötus und Neugeborenem hat das Potenzial, die Gesundheit zukünftiger Generationen zu verbessern.^{20,21} Langfristiges Ziel ist die Entwicklung präventiver und therapeutischer Maßnahmen.

Im Folgenden soll es um eine potenzielle Programmierung von Mikrogliazellen und deren Folgen gehen.

2.1 Die Rolle der hypothalamischen Inflammation in der Pathogenese von Adipositas

Der Hypothalamus ist das Zentrum von Hunger und Sättigkeit im Gehirn. Komplexe Nervenzellnetzwerke, die sich im Rahmen der Hirnentwicklung zwischen verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten ausbilden, übernehmen bei der Regulation der Energiehomöostase eine entscheidende Rolle.^{22,23} Eine Dysfunktion hypothalamischer Nervenzellnetzwerke verursacht im Tiermodell Übergewicht und eine Störung der Glukoseverwertung. Als Ursache für eine hypothalamische Dysfunktion gilt unter anderem die Adipositas-assoziierte, chronische, unterschwellige Inflammation, „*low-grade Inflammation*“, die im Hypothalamus gliotische Veränderungen und eine gestörte Verschaltung wichtiger regulatorischer Nervenzellnetzwerke bewirken kann. Dieser Prozess verminderter Neurogenese und beeinträchtigter synaptischer Plastizität scheint durch ein multizelluläres Zusammenspiel aufrechterhalten zu werden, bei dem auch die Mikroglia eine zentrale Rolle spielt.²⁴ Vorarbeiten konnten zeigen, dass die chronische Inflammation im Hypothalamus möglicherweise auf eine gesteigerte IL-6-Aktivierung zurückzuführen ist. Dafür ist im Hypothalamus vor allem das IL-6-Trans-Signaling zuständig (siehe unten).²⁵ Welche Effekte das IL-6-Trans-Signaling im zentralen Nervensystem (ZNS) bewirkt, ist nach bisherigen Forschungsergebnissen kontrovers. Einerseits wurde gezeigt, dass das Trans-Signaling schädliche Effekte wie etwa Neurodegeneration, Astroglieose und verminderte Plastizität neuronaler Schaltkreise bewirkt, andererseits zeigten sich aber auch protektive Effekte des IL-6-Trans-Signaling im ZNS.²⁶ Das weiße Fettgewebe als metabolisch aktives Organ unterhält eine low-grade Inflammation durch die Sekretion inflammations-modulierender Adipozytokine wie IL-6 und nimmt somit auch entscheidenden Einfluss auf die bisher diskutierten hypothalamischen Veränderungen.^{27,28} Es ist bekannt, dass die Aktivierung der IL-6-Trans-Signaling Kas-

kade mit konsekutiver Aktivierung von phospho-Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) an der Entstehung von Gliose im zentralen Nervensystem beteiligt ist.^{29,30} IL-6 aktiviert über die STAT3-Signalkaskade die Transkription verschiedener Gene.³¹ Eine pathologische Folge der mit Übergewicht assoziierten low-grade-Inflammation im Hypothalamus ist die Entstehung von Gliose, gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression z. B. des Mikrogliamarkers Ionized-calcium-binding adapter molecule (IBA1). Während eine kurzfristige Aktivierung der Mikrogliazellen als neuroprotektiv gilt, kommt es bei einer längerfristigen Überaktivierung der Mikrogliazellen durch eine chronische, in diesem Falle pathologische Entzündungsantwort zur Degeneration von gesundem Gewebe.³² Im zentralen Nervensystem ist IL-6 entscheidend an der Gliose-Entstehung beteiligt und wird mit verschiedenen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson assoziiert. Darüber hinaus hemmt IL-6 in vitro die Aussprossung hypothalamischer Nervenzellfortsätze.³¹ Dies ist im Hinblick auf die perinatale Programmierung des Hypothalamus durch mütterliche Adipositas besonders interessant, da man weiß, dass Spezies- und Modell-übergreifend die gestörte Ausbildung hypothalamischer Nervenzellnetzwerke in den Nachkommen eine zentrale Folge mütterlicher Adipositas ist.³³ Hierfür lassen sich verschiedene Auslöser diskutieren, wie etwa 1) eine Modulation IL-6-Trans-Signaling-abhängiger inflammatorischer Prozesse und Signalkaskaden, 2) ein direkter Einfluss des IL-6 auf die Plastizität der Neurone selbst oder 3) der Einfluss auf Funktionalität und Morphologie der Mikrogliazellen, durch den sich deren Beitrag zu einer intakten Funktion hypothalamischer Neuronennetzwerke maßgeblich verändert. Entzündungs- oder auch Inflamationsprozesse werden klassischerweise als kurzfristige Antwort des Körpers auf potenziell schädliche Einflüsse von außen beschrieben. Zunehmend rückt auch die langfristige, chronische Inflammation, die schädliche Auswirkungen auf den Organismus hat, ins Zentrum der Aufmerksamkeit. Dabei kommt es im Rahmen einer low-grade Inflammation zur chronischen Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen mit gestörter Zytokin-Produktion (Adipozytokine wie Leptin, IL-6, Adiponectin oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)).³⁴ Die low-grade-Inflammation wird durch ein komplexes Zusammenspiel metabolischer und immunologischer Mediatoren unterhalten.³⁵ Eine hochkalorische Diät führt im Tiermodell zur Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden im Hypothalamus mit konsekutiver Produktion proinflammatorischer Zytokine.¹² Im peripheren Gewebe ist eine hochkalorische Diät eng mit der Infiltration von vor allem klassisch (M1) aktivierten proinflammatorischen Makrophagen verbunden. Ob ein ähnlicher Prozess auch im ZNS stattfindet, ist bisher umstritten.³⁶ Auf zellulärer Ebene entstehen reaktive gliotische Prozesse durch Transformation der Mikroglia. Die Hoch-Fett-Diät (HFD) induzierte reaktive Gliose stellt eine aktive Antwort auf neuronale Verletzung dar und verändert die Plastizität neuronaler Netzwerke, was potenziell zu einer übermäßigen Gewichtszunahme beiträgt.³⁷ Gliazellen scheinen somit durch ihre Vermittlerfunktion von proinflammatorischen Signalen und ihrer modulierenden Wirkung auf hypothalamische Neurone eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Adipositas zu

spielen. Die Aktivierung der Zellen führt zu einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen durch die Gliazellen, die u.a. eine Synapseneliminierung verursacht.³⁸ Die gezielte Blockade von inflammatorischen Signalwegen der M1-Mikroglia verbessert die hypothalamische Leptin- und Insulinsensitivität und begrenzt diät-induzierte-Adipositas.^{39,40} Insgesamt deuten Studien darauf hin, dass ein komplexes, multizelluläres Netzwerk die diätbedingte Gliose im Hypothalamus unterhält.²⁴ Die Gliose selbst kann eine Störung der hypothalamischen Nervenzellnetzwerke bewirken und dadurch eine Störung hypothalamischer Funktionen mit Leptin- und Insulinresistenz auslösen bzw. verstärken.^{24,41} Eine Fülle von Tier- und Humanstudien hat gezeigt, dass die perinatale Exposition gegenüber ungünstigen Stoffwechselbedingungen – sei es mütterliches Übergewicht, Diabetes der Mutter oder maternale Unterernährung – zu einer Prädisposition der Nachkommen für die Entwicklung von Fettleibigkeit und metabolischen Erkrankungen im späteren Leben führen kann.²³ Die perinatale Entwicklung des Hypothalamus ist plastisch und reagiert in diesem kritischen Zeitfenster empfindlich auf Stoffwechselsignale. Jüngere Forschungsarbeiten am Mausmodell haben gezeigt, dass ungünstige Lebensgewohnheiten der Mutter die Entwicklung der Hypothalamusstruktur und folglich auch seiner Funktion beeinträchtigen, was möglicherweise den Stoffwechsel im späteren Leben des ungeborenen Kindes stark beeinflusst.²³ Neuere Studien zeigen zudem einen frühen Anstieg der Mikroglia-Zellzahl und der Expression von Markern der mikroglialen Aktivierung im murinen Hypothalamus nach HFD, was auf einen schädlichen Einfluss der HFD auf die Mikroglia hindeutet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Grad der Veränderung der Mikroglia im Hypothalamus signifikant mit einem steigenden BMI korreliert.^{37,42}

2.2 Gliazellen im Gehirn

Das zentrale Nervensystem besteht aus Neuronen, Makroglia- und Mikrogliazellen. Die Aufgabe der Makro- und Mikroglia besteht vornehmlich in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und Integrität des ZNS. Die Gliazellen machen etwa 50 Prozent der gesamten Hirnzellen aus.⁴³ Neben immunologischen Funktionen unterstützen sie im physiologischen Zustand die regelrechte Funktion der Neurone, modulieren deren synaptische Aktivität und regulieren Verbände gleichgeschalteter Neurone, sogenannte neuronaler Netzwerke. Im Falle einer Pathologie sorgen sie für Abwehr und Genesung.⁴⁴ Lange Zeit war man der Auffassung, dass die Neuronen allein die wichtigste funktionelle Einheit des ZNS bilden und Gliazellen lediglich deren Unterstützung dienen. So beschrieb Virchow die Mikroglia 1858 noch als den „Klebstoff“ des Gehirns.⁴³ In den letzten Jahren wurde jedoch immer deutlicher, dass die einwandfreie Funktion des ZNS nur durch das Zusammenspiel von Neuronen, Makro- und Mikroglia gewährleistet werden kann. Dem zugrunde liegen komplexe Prozesse der Kommunikation zwischen den einzelnen Zellverbänden.^{45,46} Eine 2014 veröffentlichte Review befasst sich mit verschiedenen Aspekten zur Pathologie der Autismus-Spektrum-Erkrankungen.⁴⁷ Die

Autoren fassen Studien zusammen, die beispielsweise darauf hin deuten, dass die gestörte neuronale Funktion und das daraus resultierende eingeschränkte Sozialverhalten als Folge einer gestörten Signalübertragung zwischen Mikroglia und Neuronen entsteht.^{47,48,49}

2.2.1 Makroglia

Zu den Makroglia zählen die Oligodendrozyten, Ependymzellen und Astrozyten. Obwohl das Augenmerk in dieser Arbeit auf der Funktion der Mikroglia liegt, trägt eine kurze Definition der anderen Zellpopulationen zum Verständnis der Funktionalität des ZNS bei. In der Literatur ist insbesondere viel über die Rolle der Astrozyten für die ZNS-Funktionen und deren Interaktion mit der Mikroglia bekannt. Oligodendrozyten sind die Myelin-bildenden Zellen des ZNS. Sie modulieren sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen den Zustand der weißen Substanz. Die Ependymzellen kleiden die Ventrikel aus und dienen der Sekretion und Resorption des Liquors. Die Astrozyten sind maßgeblich an der Regulation der Homöostase im ZNS beteiligt. Wie Mikrogliazellen sind sie in der Lage, Gefahr anzeigende Stoffe und Zelltrümmer zu erkennen.⁵⁰ Auch im puncto synaptische Plastizität besitzen sie eine bedeutende Rolle: Sie integrieren Schaltkreise, indem sie zahlreiche Neuronen und Synapsen umhüllen und tragen zur Aufrechterhaltung der Extrazellulärmatrix bei. Eine Dysfunktion der Astrozyten wird mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht.⁵¹

2.2.2 Mikroglia und ihre Funktion

Mikrogliazellen sind die residenten Makrophagen des zentralen Nervensystems. Sie machen etwa zehn bis fünfzehn Prozent aller Zellen des menschlichen Gehirns aus.⁵² Die Zellen mesodermalen Ursprungs wandern während der Ontogenese in das ZNS ein und nehmen den morphologischen Phänotyp „ruhender“ Mikroglia mit verzweigten Fortsätzen ein.⁵³ Als solche wurden sie erstmals im Jahr 1919 von Pio del Rio-Hortega beschrieben.⁵⁴ Die Einwanderung ins ZNS erfolgt in zwei Phasen. Die erste Phase fällt in das Zeitfenster der fetalen Entwicklung in den ersten beiden Trimestern. Die zweite Phase folgt während der frühen postnatalen Tage. Am Ende der Entwicklung haben Mikrogliazellen alle Regionen des ZNS bevölkert. Jede Hirnregion unterliegt regionalen Unterschieden, weshalb auch die Mikroglia eine heterogene Population darstellt. Analysen zeigten, dass sie in ihrer Entwicklung einem schrittweisen Programm folgen, bei dem die Mikroglia ihre Entwicklung mit derer der Neurone synchronisiert.⁵⁵ Die Aufgaben der Mikroglia sind vielfältig und sie leisten in mehrfacher Hinsicht einen bedeutenden Beitrag zur Gehirnentwicklungs- und funktion (s. Abb. 1). Zu ihren Aufgaben während der Ontogenese gehören Phagozytose, Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die wiederum Neuritenwachstum, Gliogenese und Angiogenese regulieren können. Während der Entwicklung des Gehirns bilden Neuronen eine überschüssige Anzahl von synaptischen

Verbindungen, die im Laufe der perinatalen Phase wieder entfernt werden müssen.⁵⁶ Beim sogenannten „Synaptic Pruning“ („Stutzen“ der Synapsen“) werden Axone und Dendriten der Neurone durch die Mikroglia modifiziert und ungenutzte Synapsen entfernt (s. Abb. 1).

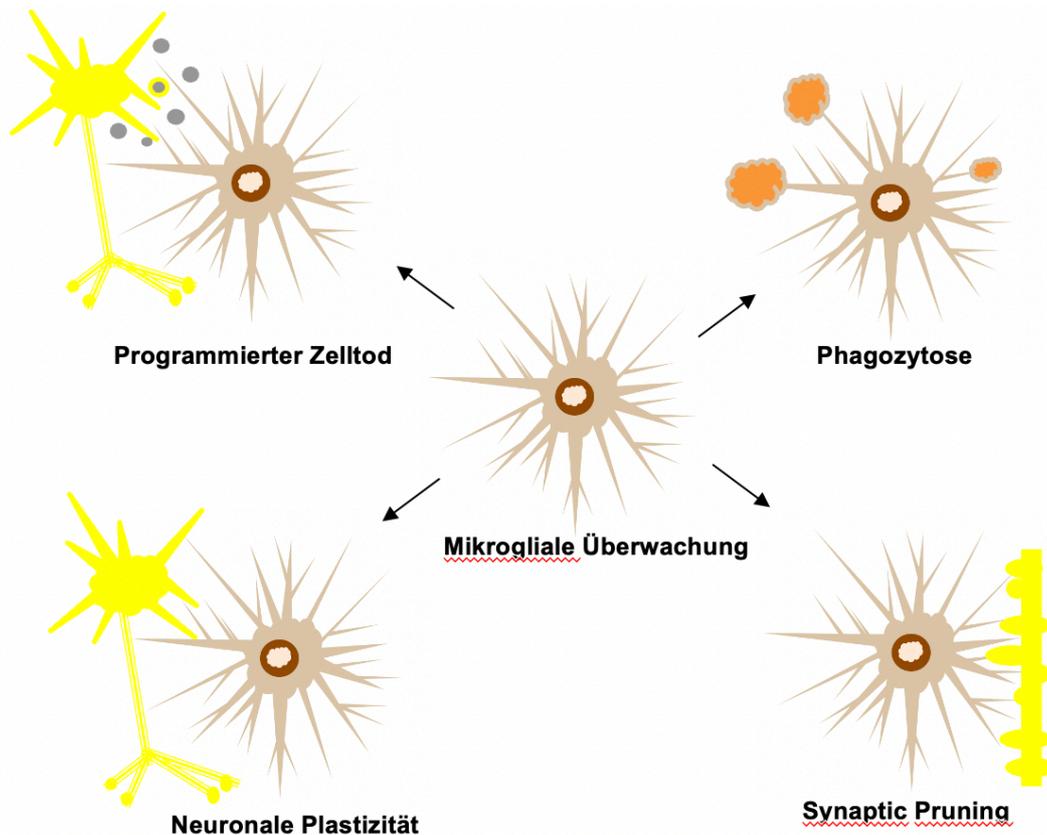


Abbildung 1: Physiologische Aufgaben der Mikroglia im ZNS: Aufrechterhaltung der Homöostase durch Phagozytose, Apoptose, Synaptic Pruning, Regulation neuronaler Plastizität. Modifiziert nach Salter, M. W., & Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature medicine*, 23(9), 1018-1027.

Dies verdeutlicht, dass die Architektur neuronaler Netzwerke maßgeblich auch durch die Mikroglia beeinflusst wird.⁵⁷ Mikrogliazellen im gesunden ZNS weisen eine verzweigte Morphologie mit kleinem Soma und feinen zellulären Fortsätzen auf. Dieser morphologische Zustand war lange Zeit mit dem Ruhezustand der Mikrogliazellen assoziiert. Heute wird weniger von ruhender Mikroglia als von verschiedenen Aktivierungszuständen der Mikroglia gesprochen, da auch der ramifizierte Phänotyp durch die ständige Gewebsüberwachung einer wichtigen Aufgabe nachkommt.⁵⁸ Jeder Form des Verlustes der ZNS-Homöostase in Gestalt von Infektion, Trauma, Ischämie, neurodegenerativen Erkrankungen oder veränderter neuronaler Aktivität kann schnelle und weitreichende Veränderungen in Genexpression, Morphologie und Funktion der Mikrogliazellen hervorrufen. „Aktivierte“ Mikroglia verändert ihre Form von verzweigt zu amöboid (s. Abb. 2) und wandert zum Ort der Läsion.

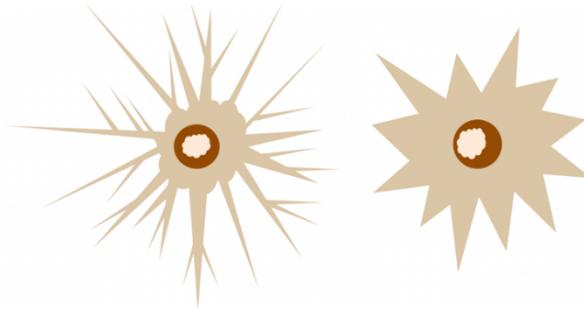


Abbildung 2: Morphologische Zustände der Mikrogliazellen. Links: ruhend, ramifiziert mit schalem Zellkörper, weit verzweigten hochdynamischen Zellfortsätzen zur Gewebsüberwachung und Zell-Zell-Kommunikation. Rechts: aktiviert, amöboid: verdickter Zellkörper, verkürzte Zellfortsätze zur schnellen Motilität und Produktion von Botenstoffen. Modifiziert nach Strunecka, A., Blaylock, R. L., Patocka, J., & Strunecky, O. (2018). Immunoexcitotoxicity as the central mechanism of etiopathology and treatment of autism spectrum disorders: A possible role of fluoride and aluminum. *Surgical Neurology International*, 9.

Man schätzt, dass die ansässige Mikroglia das gesamte Hirnvolumen binnen weniger Stunden abtasten kann.⁵⁸ Die Motilität der Fußfortsätze kann sich in Reaktion auf extrazelluläre Stimuli und neuronale Aktivität drastisch ändern und auch die lokale Zelldichte kann je nach Bedarf durch Proliferation verändert werden.^{59,60} Mikrogliazellen fungieren im adulten Gehirn also als Immuneffektorzellen der angeborenen Abwehr. Durch permanentes Scannen ihrer Umgebung können sie schnell Störungen der Homöostase wahrnehmen und agieren.⁶¹ Sie sind in der Lage, Immunzellen zu rekrutieren, Antigene zu präsentieren, freie Sauerstoffradikale, Stickoxid und Interleukine zu sezernieren und eine sekundäre Entzündungsreaktion zu induzieren.⁶² Der Prozess der mikroglialen Aktivierung ist hochreguliert, da eine überschießende Immunreaktion auch schädliche Folgen für das umliegende Gewebe haben kann. Mikroglia spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen.³² Dass die von aktivierten Mikrogliazellen abgegebenen Substanzen pathologische Prozesse auslösen oder verstärken können, ist Gegenstand intensiver Untersuchungen. Neuere Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass Mikrogliazellen bei der Entwicklung von neuronalen Netzwerken eine entscheidende Rolle spielen. Sie unterstützen die kontinuierliche Vernetzung von Neuronen, Dendriten und Axonen und haben - je nachdem, welche extrazellulären Stimuli sie erhalten - Einfluss auf deren Aktivität. In vitro Experimente konnten zeigen, dass die Differenzierung neuraler Vorläuferzellen der Anwesenheit von Mikrogliazellen bedarf.^{63,43} Auch reguliert die Mikroglia die Zelldifferenzierung in der frühen postnatalen Gehirnentwicklung über die Freisetzung von Zytokinen.⁶³ Eine weitere wichtige Aufgabe der Mikrogliazellen stellt die Phagozytose dar. Sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Gehirn ist die Phagozytose in pathologische und regeneratorsche Prozesse involviert. Während der Entwicklung beseitigen sie apoptotische Zellen und redundante Synapsen. Im Gehirn des Erwachsenen phagozytieren sie überschüssige Neuronen, von denen sie proapoptische Signale erhalten (s. Abb. 2).

Auch im Rahmen der Neurodegeneration ist die Rolle der Mikroglia-Phagozytose in verschiedenen experimentellen Kontexten nachgewiesen worden.⁶⁴ Dass auch die Art der mikroglialen Aktivierung entwicklungs- und umweltbedingten Anpassungen und Stimuli unterliegt ist mehrfach in der Literatur beschrieben. Proliferation und Phagozytoseverhalten der Mikroglia ändern sich im Laufe der Entwicklung vom embryonalen zum neonatalen hin zum postnatalen Stadium und Erwachsenenalter.⁶⁵ Ebenso ist die Fähigkeit, auf interne Signale oder Fremdmaterial zu reagieren durch einen Prozess der Reifung bestimmt.⁶⁶ Da Mikrogliazellen das Gehirn während der frühen Embryonalentwicklung kolonisieren, könnten umweltbedingte und genetische Störungen die mikrogliale Entwicklung, die Fähigkeit zum Synaptic Pruning, die Überwachung der Homöostase und andere Funktionen verändern, die später direkt oder indirekt zur Pathophysiologie neurodegenerativer und neuropsychiatrischer Erkrankungen beitragen.⁶⁷

2.2.3 M1-/M2-Polarisierung von Mikroglia und Marker

Der Zustand aktivierter Mikroglia wird aus immunologischer Sicht in einen M1 und einen M2 Phänotyp unterteilt (s. Abb. 3). Die klassische Kategorisierung in einen pro- und antiinflammatorischen Phänotyp entstammt der Einteilung der Makrophagen. Während der M1-Phänotyp eher zytotoxische Effekte auf die Zelle hat und durch die Freisetzung freier Radikale und proinflammatorischer Zytokine zu einem sekundären Gewebsschaden führt, besitzt der M2-Phänotyp neuroprotektive Eigenschaften. Hierzu zählen die Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine sowie der Prozess der regulierten Phagozytose. Proregenerative M2-Mikroglia exprimieren zudem Arginase1 (Arg1) anstelle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), wodurch der Arginin-Metabolismus von der Produktion von NO auf Ornithin und Polyamine für die Kollagen- und Extrazellulärmatrixsynthese umgestellt wird.⁶⁸ Die beiden unterschiedlichen Phänotypen aktivierter Mikroglia werden in Abb. 3 näher dargestellt. Die Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation gilt seit langem als der Goldstandard für die Aktivierung von Mikroglia. Sie ahmt eine Infektion durch gramnegative Bakterien nach und erzeugt eine massive antimikrobielle Abwehrreaktion. Doch auch in Abwesenheit von Mikroorganismen kommt es auch in Folge eines Traumas, einer Ischämie oder einer chemischen Exposition zu einer in diesem Fall sterilen Entzündungsreaktion.⁶⁹ Mikroglia reagiert auch hier mit der Produktion von M1-assoziierten Faktoren wie z. B. proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, TNF α), Chemokinen und Redoxmolekülen (s. Abb.3).

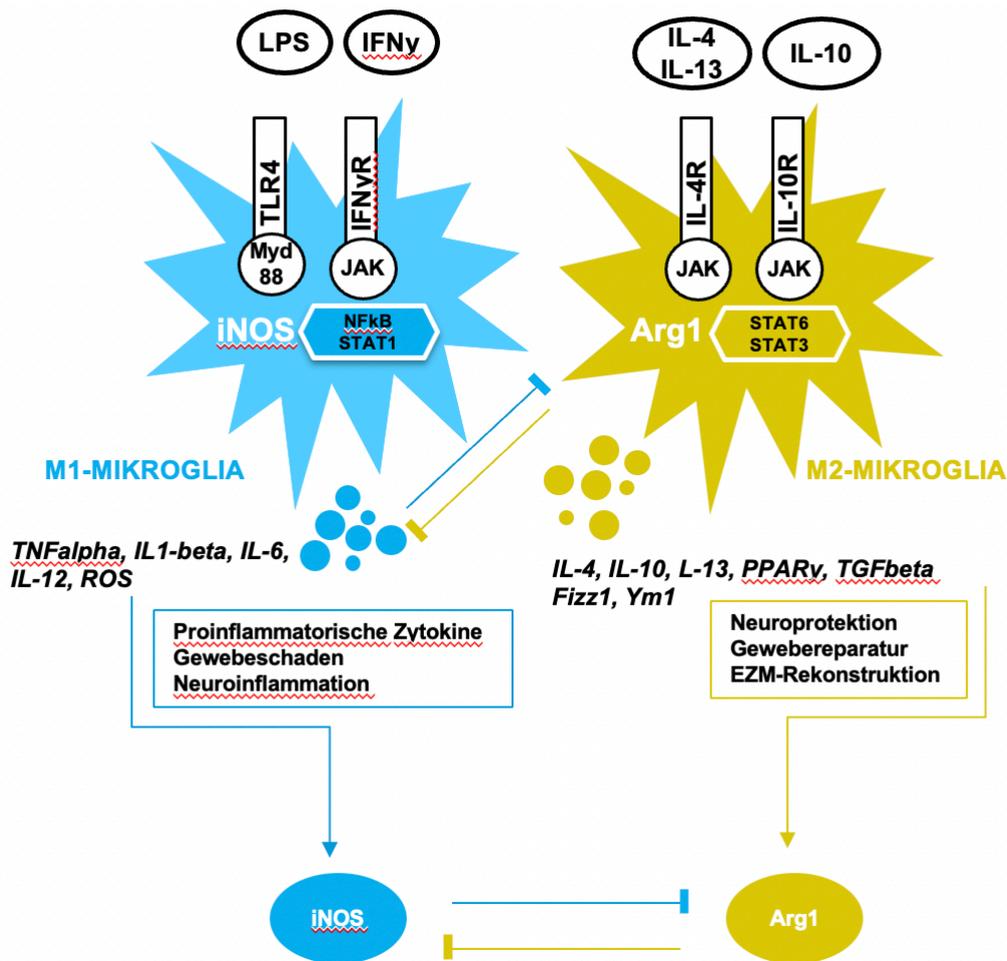


Abbildung 3: M1- und M2-Polarisierung von Mikrogliazellen: Signalwege, Botenstoffe, Effekte. Durch Stimulation mit LPS und IFN γ erfolgt eine M1-Polarisierung der Mikroglia, welche mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Gewebeschaden und Neuroinflammation assoziiert ist. Antiinflammatorische Stimuli (IL-4, IL-10) führen zu einer M2-Polarisierung, einhergehend mit der Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine und neuroprotektiven Eigenschaften. Modifiziert nach Orihuela, R., McPherson, C. A., and Harry, G. J. (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173: 649–665. doi: 10.1111/bph.13139.

Es wird vermutet, dass klassisch aktivierte Mikroglia (M1-polarisierte Mikroglia) an der Dysfunktion neuronaler Netzwerke im ZNS beteiligt sind. Beispielsweise soll die M1-Mikroglia-induzierte Dysregulation der neuronalen Schaltkreise im präfrontalen Kortex zur Entstehung von Depressionen, chronischen Schmerzen und Migräne beitragen. M2-polarisierte Mikroglia hingegen dämpft vermutlich die M1-Mikroglia-vermittelte Neuroinflammation durch die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise Interleukin-10 (IL-10).⁷⁰

Neuere Transkriptom-Sequenzierungen zeigen multiple Polarisationszustände von Mikroglia, die nicht immer klar einem Reaktionstyp zugeordnet werden können.⁷¹ Die duale in vitro Einteilung der Mikroglia in M1- und M2-Typ spiegelt daher nicht die reale in vivo Situation wider, da die mikrogliale Aktivierung ein sehr viel breiteres Spektrum an Phänotypen beinhaltet, die durch

verschiedene Stimuli induziert werden können.⁷² Für beide Phänotypen gibt es charakteristische Marker (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Marker für M1- und M2-Polarisation der Mikrogliazellen.

Subtyp	M1	M2
Rezeptor	TLR4	IL4R
Signalüberträger	Myd88	JAK1/2
Transkriptionsfaktoren	STAT1 NFκB1 p65	PPAR γ , PPAR α c-myc NFκB1 p50
Polarisationmarker	iNOS	Arg1 Ym1 Fizz1
Zytokine	TNF α IL-1 β IL-6	TGF β IL-10, IL-4

Adaptiert nach Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M. V., Celador, I. L., Josserand, J., ... & Fleiss, B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity*, 32, 70-85.

Exemplarisch soll hier auf einige näher eingegangen werden. Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- gamma (PPAR γ) sind nukleäre Rezeptoren, die bei der Immunantwort und im Zellstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen.⁷³ Auch in Mikrogliazellen sind sie hoch exprimiert und regulieren mittels verschiedener Prozesse die Antwort der Mikroglia auf eine Entzündung: Sie hemmen die Synthese von klassischen proinflammatorischen Entzündungsmediatoren und Transkriptionsfaktoren wie Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) und Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-Cells (NFκB1), während sie gleichzeitig die Expression antiinflammatorischer Gene wie Arg1 und IL-4 erhöhen.^{72,74,75} Sie fördern zudem die mikrogliale Phagozytoseleistung. Arg1 ist ein etablierter Marker für die alternative Mikroglia-Aktivierung.⁷⁶ Arg1 hemmt die NO-Produktion durch Konkurrenz mit der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) um das gemeinsame Substrat.⁷⁷ Arg1 ist an der Regulation von Wundheilung und Fibrose beteiligt und kann auch direkt das Überleben von Neuronen unterstützen.^{78,79} Transforming growth factor beta (TGF β) ist ein entzündungshemmendes Molekül, das als Verstärker der alternativen Mikrogliaaktivierung und somit als Regulator der Mikroglia-vermittelten Neuroregeneration gilt.⁸⁰ Fraktalkin (CX3CL1) ist eines der wichtigsten Chemokine, die an der Regulation von neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt sind.^{81,82} Es wird von Neuronen freigesetzt und fungiert als Vermittler in der Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen.⁸³ Auch ist Fraktalkin ein wichtiger Akteur in der frühen Induktion der diätinduzierten hypothalamischen Entzündung, da es die Ansiedlung pro- und antiinflammatorischer Zellen

kontrolliert.⁸⁴ Der Fraktalkin-Rezeptor (CX3CR1) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der im Gehirn hauptsächlich von Mikrogliazellen exprimiert wird.⁸¹ CX3CR1-defiziente Mäuse zeigten in verschiedenen Entwicklungsstadien sowohl eine Abnahme der Dichte von Mikrogliazellen als auch deren verminderte Fähigkeiten beim Prozess des Synaptic Pruning. Infolge verschlechtert sich die Konnektivität und Leistung der synaptischen Übertragung innerhalb der neuronalen Netzwerke.^{85,44} Veränderungen der Mikrogliazahl- oder -funktion während der Entwicklung, z. B. durch das Ausschalten von CX3CR1 führen zu Aberrationen der Neuroplastizität im Erwachsenenalter.⁶⁷ iNOS und c-Fos gelten ebenfalls als wichtige Aktivierungsmarker der Mikroglia.⁸⁶ Bei c-Myc handelt es sich um einen Downstream-Parameter des durch IL-6 induzierten STAT3-Signalwegs.⁸⁷

2.3 BV-2 Zellen

BV-2 Zellen wurden von raf/myc-immortalisierten murinen Mikrogliazellen abgeleitet und sind der am häufigsten verwendete Ersatz für primäre Mikroglia in der Zellkultur. Sie besitzen die morphologischen und funktionellen Eigenschaften primärer Mikroglia. Aufgrund ihrer Herkunft übersteigt die in vitro Stoffwechsel- und Proliferationsrate diejenige primärer Mikrogliazellen.⁸⁸

2.4 Morphologie und IBA1 Aktivierung

Wie bereits oben erwähnt spiegeln sich die verschiedenen Zustände und Funktionen der Mikrogliazellen in ihrer Morphologie wider. Um dies anhand von immunhistochemischen Färbungen zu zeigen, ist IBA1 ein wichtiger Faktor. IBA1 ist ein zytoplasmatisches Helix-Loop-Helix-Protein mit F-Aktin bindender und Aktin-vernetzender Aktivität, das möglicherweise auch an der Motilität und Phagozytoseaktivität der Zellen beteiligt ist.⁸⁹ IBA1 wird im Zytoplasma und in den Fortsätzen der Mikroglia exprimiert und ist während reaktiver Mikrogliaaktivierung hochreguliert.⁸⁹ Da IBA1 einer der ersten Marker ist, die während der frühen Aktivierung hochreguliert werden, dient er insbesondere der Untersuchung von Mikroglia mit niedrigem Aktivierungsstadium.⁹⁰

2.5 Gliose

IL-6 nimmt eine Schlüsselrolle im Prozess der Neuroinflammation ein. Der Begriff Neuroinflammation beschreibt die Aktivierung der ZNS-residenten Immunzellen: der Mikroglia und der Astrozyten. Im Rahmen der Neuroinflammation werden verschiedene Zytokine und Chemokine sowie reaktive Sauerstoffspezies und andere Entzündungsmediatoren freigesetzt. Neuroinflammation ist mit neurodegenerativen Erkrankungen und anderen hirneigenen Störungen wie z. B. Hypoxie/Ischämie, traumatische Hirnverletzungen, Infektionen und epileptische An-

fälle assoziiert. Die Rolle der Neuroinflammation in der Pathophysiologie von ZNS-Erkrankungen wird immer noch kontrovers diskutiert: Einerseits sieht man sie als bloße Folge der neuronalen Degeneration, andererseits aber auch als Verstärker oder gar treibende Kraft jener pathologischen Prozesse. Die beiden Hauptmerkmale der Neuroinflammation sind Mikrogliose und Astrogliose, gekennzeichnet durch Hypertrophie und Hyperplasie der Zellen. Sanders et al. beschrieben die Mikroglia als „Dr. Jekyll und Mr. Hyde des ZNS“: Verletzungen können über die Produktion von trophischen Faktoren eine mikroglia-induzierte Regeneration auslösen, andererseits ist die Mikroglia in der Lage, neurotoxische Faktoren zu sezernieren, deren Folge der neuronale Zelltod ist.⁹¹ Der Begriff der reaktiven Gliose wird verwendet, um die Reaktion endogener Gliazellen auf neuronale Gewebsschäden zu beschreiben. Gliazellen reagieren auf Signale geschädigter Neurone in einer Hirnregion.⁹² Reaktive Gliose und Neuroinflammation sind Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung und anderer neurodegenerativer Erkrankungen.⁶⁷ In einer prospektiven MRT-Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass der Grad der hypothalamischen Gliose prädiktiv für den BMI und die Insulinresistenz bei gesunden menschlichen Probanden war.⁹³

2.6 Synaptische Plastizität und Marker

Synaptische Plastizität lässt sich als eine Veränderung der synaptischen Stärke durch strukturelle oder funktionelle Modifikationen in Form, Dichte, Bildung und Eliminierung von Synapsen definieren.⁹⁴ Modifikationen der synaptischen Stärke resultieren aus dauerhaften oder vorübergehenden morphologischen und funktionellen Veränderungen des synaptischen Apparates.⁹⁵ Die Synaptische Plastizität wird von der funktionellen Einheit der Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten beeinflusst.⁵¹ Veränderungen der Plastizität neuronaler Netzwerke können mit kurzfristigen strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts einhergehen.⁹⁶ Die Bedeutung der Mikroglia für die synaptische Plastizität hängt mit ihrer Fähigkeit zusammen, den funktionellen Zustand von Synapsen und EZM zu erfassen und mit anderen ZNS-residenten Zellen zu kommunizieren.⁹⁷ Durch eine hohe Dichte an Oberflächenrezeptoren ist die Mikroglia in der Lage sowohl physiologische Stimuli wie (Ernährung, körperliche Betätigung, kognitive Stimuli) als auch pathologische Einflüsse zu erkennen.⁶⁴ Mittels dieser Oberflächenrezeptoren beeinflussen sie Prozesse der synaptischen Plastizität und Neurogenese.⁹⁸ In der Literatur wurden bereits zahlreiche Wege diskutiert, wie die Mikroglia die synaptische Plastizität beeinflussen könnte: durch Phagozytose, mechanisch durch Ausbildung und Einziehung ihrer Fußfortsätze, durch postsynaptische Modifikation, durch Produktion und Sekretion von Botenstoffen und EZM-Molekülen oder rezeptorvermittelt durch Fraktaklin.^{99,100,101} Experimente mit in vivo Bildgebung haben gezeigt, dass Mikrogliazellen in ihrem Überwachungszustand ständig die sie umgebenden synaptischen Kontakte abtasten. Diese Kontakte verlängerten sich im Falle pathologischer Zustände wie beispielsweise einer Ischämie von Minuten auf mehrere

Stunden. Die Konsequenz der verlängerten Kontakte ist die anschließende Elimination der betroffenen Synapsen.¹⁰² Gleichzeitig deuten mehrere Studien auf eine Beteiligung der Mikroglia an der Regulation der Synaptogenese im frühen postpartalen Gehirn hin. Durch die Sekretion von Proteinen der EZM, Neurotrophinen - körpereigenen Signalstoffen, die der Kommunikation der Nervenzellen dienen - und Proteasen beeinflussen sie Wachstum und Differenzierung der Synapsen und der neuronalen Netzwerke.^{103,104} Dass Mikrogliazellen die neuronale Aktivität und Plastizität durch Modifikation der Synapsen auch im erwachsenen Gehirn modulieren, konnte bereits mehrfach bewiesen werden.^{105,106} Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mikrogliazellen wichtige Akteure während der Entwicklung des Nervensystems sind. Durch ihr Potenzial, die Entwicklung, Strukturierung, Konnektivität und Funktion neuronaler Netzwerke zu regulieren, beeinflussen sie maßgeblich das strenge Gleichgewicht zwischen Neurogenese und neuronalem Tod.⁶⁴ Da es sich hierbei um ein sehr fragiles Gleichgewicht handelt, wird die Rolle der Mikroglia im Kontext der synaptischen Plastizität auch als dichotom beschrieben. Gerät der Prozess aus dem Gleichgewicht, kann es zu neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen und Erkrankungen kommen.¹⁰⁷ In einer aktuellen Studie konnte am zellulären Modell gezeigt werden, dass es bei Schizophreniepatienten zu einem überschießendem Synaptic Pruning durch Mikrogliazellen kommt.¹⁰⁸ Zudem dienen Mikrogliazellen insbesondere den Prozessen der aktivitätsabhängigen, langfristigen synaptischen Plastizität. Die anhaltende synaptische Plastizität wird allgemein als zelluläre Grundlage für Lernen und Gedächtnis verstanden und wird auch als Langzeitpotenzierung bzw. Langzeitdepression bezeichnet.¹⁰⁹

Als wichtige Marker synaptischer Plastizität sind hier Egr1, Arc, Homer1a, Foxo1, c-Fos und vGLUT2 zu nennen.^{110,111,112}

2.7 Extrazelluläre Matrix und Marker

Die EZM fungiert als funktionelles Gerüst des Gehirns und unterstützt mit ihren molekularen Elementen die synaptische Plastizität und neuronale Funktion.⁵¹ Die EZM bildet sogenannte perineuronale Netzwerke, mit denen sie neuronale Synapsen umhüllt. Dies hat insbesondere Effekte auf die langfristige Plastizität und Gedächtnisbildung. Mikroglia sind in der Lage, die EZM umzubauen und können dadurch wiederum indirekt auf die Plastizität neuronaler Netzwerke einwirken. Beispielsweise setzen sie im Falle eines Schlaganfalls Matrix-Metalloproteinasen (z. B. MMP9) frei, die die EZM degradieren.^{113,114} Hauptkomponenten der EZM sind Proteoglykane, die mit Kollagen, Glykoprotein (z. B. Teascin wie TenascinR) und Hyaluronsäure interagieren, die von Glia und Neuronen synthetisiert werden.⁵¹ Matrix-Metalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle bei den pathophysiologischen Um- und Abbauprozessen der EZM. Sie gehören zur Familie der zinkabhängigen Endopeptidasen, die die Fähigkeit besitzen, Komponenten der EZM zu spalten.¹¹⁵ Zu ihren physiologischen Aufgaben zählen Abwehrfunk-

tionen, Wundheilung und Gefäßneubildung. MMPs werden auch im Kontext der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen diskutiert und spielen insbesondere auch im Kontext der Entzündungsreaktion bzw. der chronischen Entzündung eine entscheidende Rolle.¹¹⁶ Die Überexpression der aktivierten Proteinase führt zur vermehrten Degradierung körpereigener Strukturen. Die Aktivität der MMPs kann auf unterschiedliche Weise durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Modifikationen reguliert werden. Bei der Induktion oder Hemmung spielen Zytokine und andere von Zellen sezernierte Mediatoren eine wichtige Rolle, darunter TNF α und IL-6. Zum Schutz der EZM vor einer überschießenden Aktivität der MMPs existieren zusätzlich spezifische Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinases wie z. B. TIMP1 und TIMP2. Ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Protease und Antiprotease ermöglicht eine koordinierte Gewebshomöostase.¹¹⁷ Als wichtige Marker wurden in der vorliegenden Arbeit neben den Metalloproteinasen auch Bestandteile der EZM wie Syndecan 1 und Syndecan 3 untersucht, die sich bei Auf- und Abbau der EZM verändern.^{118,116}

2.8 Zytokine

Zytokine umfassen eine Gruppe von kleinen Polypeptiden, die eine enorme Vielfalt an potenziellen Wirkungen besitzen. Die meisten Zytokine wirken in sehr niedrigen Konzentrationen und signalisieren entweder auf autokrine oder parakrine Weise, um lokale zelluläre Mechanismen wie Überleben, Wachstum und Differenzierung zu modulieren. Zytokine werden auch als Reaktion auf Krankheiten, Verletzungen und Infektionen schnell hochreguliert und spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebereparatur während akuter pathologischer Zustände. Sie regulieren Dauer und Intensität der immunologischen Reaktion sowie die intrazelluläre Kommunikation. Basierend auf ihrer Wirkung im peripheren Gewebe wurden Zytokine typischerweise als entzündungsfördernd oder entzündungshemmend klassifiziert.¹¹⁹

2.8.1 Interleukin-6 und gp130-Signaling

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Protein, das als Zytokin und Adipozytokin an der Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems beteiligt ist und lokale und systemische Entzündungsreaktionen beeinflusst. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass IL-6 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und den Auswirkungen von Übergewicht spielt. Eine Hochfett-Diät geht mit erhöhten IL-6-Serumspiegeln und dem Überwiegen proinflammatorischer Effekte einher.²⁷ Im Hypothalamus und weißen Fettgewebe erhöht sich durch eine HFD die Expression von IL-6 und induziert eine lokale low-grade Inflammation, die die Energiehomöostase beeinträchtigt.⁴¹ Während IL-6 ursprünglich als ein proinflammatorisches Zytokin galt, werden die pleiotropen Wirkungen von IL-6 auf verschiedene Zelltypen immer mehr kontrovers diskutiert. Beispielsweise zeigt sich, dass IL-6 im ZNS eine dichotome Wirkung hat: Es indu-

ziert sowohl neurotrophe als auch zytotoxische Effekte. Die ersten Hinweise darauf, dass IL-6 auch an Prozessen im ZNS beteiligt ist, ergab sich aus seiner dysregulierten Expression bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie etwa Multipler Sklerose, Aquaporin-4-positiver Neuromyelitis optica, Alzheimer und Morbus Parkinson. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-6 in mehreren physiologischen Prozessen zur Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS agiert. Hierzu zählen die Integrität der Neurone, Astroglionese und neuronale Differenzierung. Seine schädlichen Wirkungen im Sinne einer Neuroinflammation entstehen bei chronischer Aktivierung.¹²⁰ IL-6 übt Einfluss auf drei die Neuroinflammation bedingende Parameter aus: Astrogliose, Mikrogliose und Integrität der Bluthirnschranke. Indem es die Expression von Genen, die an inflammatorischen Prozessen, oxidativem Stress, Apoptose und synaptischer Aktivität beteiligt sind, reguliert, wurde IL-6 zum entscheidenden Akteur der low-grade-Inflammation im ZNS. IL-6 kann seine intrazellulären Signalwege über zwei verschiedene Mechanismen aktivieren.¹²¹ Diese sind zum besseren Verständnis in Abb. 4 bildlich dargestellt. Der klassische Weg geht über den auf Zielzellen exprimierten IL-6-Rezeptor, der mit dem transmembranären Signalrezeptorprotein gp130 verbunden ist und die Downstream Pathways initiiert (s. Abb. 4(a)).¹²² IL-6 kann jedoch über einen anderen Mechanismus auch Zellen aktivieren, die keinen membranständigen IL-6-Rezeptor exprimieren. Bei diesem alternativen Signalweg, dem sogenannten „Trans-Signaling“, bindet IL-6 an eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors, dem soluble IL-6-Rezeptor (sIL-6R) (s. Abb. 4(b)).¹²³ Der Komplex aus IL-6 und seinem löslichen Rezeptor sIL-6R-Komplex kann ebenfalls an das Transmembranprotein gp130 binden und so IL-6-abhängige intrazelluläre Signalkaskaden wie z. B. den JAK/ STAT Signalweg aktivieren.^{124,125} Dass das „Trans-Signaling“ insbesondere im ZNS von Bedeutung ist, zeigt sich beispielsweise an der Erhöhung des sIL-6R bei einer Reihe pathophysiologischer Prozesse im ZNS.¹²² So zeigt ein 2012 veröffentlichtes Experiment eine Erhöhung des sIL-6R im Liquor von Neuromyelitis optica Patienten. Die gemessene Menge an sIL-6R korrelierte demnach mit einer erhöhten Krankheitsaktivität.¹²⁶ Beispielsweise gibt es bei der Neuromyelitis optica vielversprechende therapeutische Ansätze mit dem monoklonalen Antikörper Satralizumab, der sowohl an den sIL-6R als auch an den membrangebundenen IL-6R bindet.¹²⁷ Basierend auf dem natürlich vorkommenden Prozess des Trans-Signalings wurde ein Designer-Zytokin, hIL-6 (hIL-6) genannt, geschaffen, das aus einer Fusion zwischen IL-6 und dem sIL-6R besteht und lediglich das Trans-Signaling, nicht aber den klassischen Signalweg aktiviert.¹²⁸ Auch neurodegenerative und gliotische Veränderungen im ZNS werden primär über ein verstärktes IL-6-Trans-Signaling beeinflusst.^{30,129,130} Wie bereits erwähnt, konnten Vorarbeiten zeigen, dass auch die chronische Inflammation im Hypothalamus auf eine gesteigerte IL-6-Aktivierung zurückzuführen ist.^{131,30,32,132} IL-6 aktiviert über die STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3-) Signalkaskade die Transkription verschiedener Gene.^{31,119} Dass erhöhte IL-6 Spiegel bei der Mutter auch den Fötus beeinflussen, zeigte sich in einer

Studie, in der erhöhte mütterliche Expression ebenfalls zu gesteigerter fetaler Expression des Zytokins führte.¹³³ IL-6 wird eine zentrale Rolle bei der Beeinflussung fetaler Gehirnentwicklung in der perinatalen Phase zugeschrieben.¹⁴ So konnten Brunssen et al. zeigen, dass eine erhöhte perinatale Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-6 mit einer ungünstigen neurologischen Entwicklung des Kindes assoziiert ist.¹³⁴ Im Mausmodell führt eine mehrwöchige HFD zu einer allgemeinen proinflammatorischen Reaktion im Hypothalamus mit erhöhter Genexpression von IL-6.¹³³ Dass IL-6 eine Schlüsselrolle bei der Beeinflussung fetaler Gehirnentwicklung in der perinatalen Phase zukommt, konnte auch an einem Mausmodell zu möglichen Faktoren bei der Pathogenese der Schizophrenie gezeigt werden. Eine Injektion von IL-6 bei tragenden Mäusen führte zu entscheidenden Veränderungen im Verhalten der Nachkommen und in der Transkription von assoziierten Genen. Eine gleichzeitige Verabreichung eines Anti-IL-6-Antikörpers konnte diese Veränderungen und Defizite wieder normalisieren.¹⁴ Eine künstliche mütterliche Immunaktivierung mit konsekutiver Erhöhung von IL-6 führte zu einem erhöhten Körpergewicht bei den Nachkommen.^{24,37} Es bleibt zu klären, über welchen der beiden bekannte Signalwege diese schädlichen Effekte im ZNS vorrangig vermittelt werden und inwieweit es ein ursächlicher Faktor für die Prädisposition zur Entwicklung von Adipositas im späteren Leben darstellt.

2.8.2 Hyper-Interleukin-6

Dass das Trans-Signaling insbesondere im ZNS von besonderer Bedeutung ist, zeigt sich beispielsweise an der Erhöhung des sIL-6R bei einer Reihe pathophysiologischer Prozesse im ZNS. Basierend auf dem natürlich vorkommenden Prozess des Trans-Signaling wurde ein Designer-Zytokin, Hyper-Interleukin-6 (hIL-6) genannt, geschaffen, das aus einer Fusion zwischen IL-6 und dem sIL-6R besteht und lediglich das Trans-Signaling, nicht aber den klassischen Signalweg aktiviert.¹²⁸ Wie bereits erwähnt, steht das klassische IL-6-Signaling eher im Kontext anti-entzündlicher Signale, während das Trans-Signaling in vielen Geweben eher proinflammatorische Effekte vermittelt. So ist das Trans-Signaling bei der Neurodegeneration,³⁰ entzündlichem Dickdarmkrebs,¹³⁵ Arthritis¹³⁶ und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt.¹³⁷ Im Nervengewebe steht das Trans-Signaling im Fokus als zentraler Signalweg im Rahmen neurodegenerativer Veränderungen.³⁰ Über die Rolle in der Pathogenese der Adipositas ist bisher wenig bekannt.

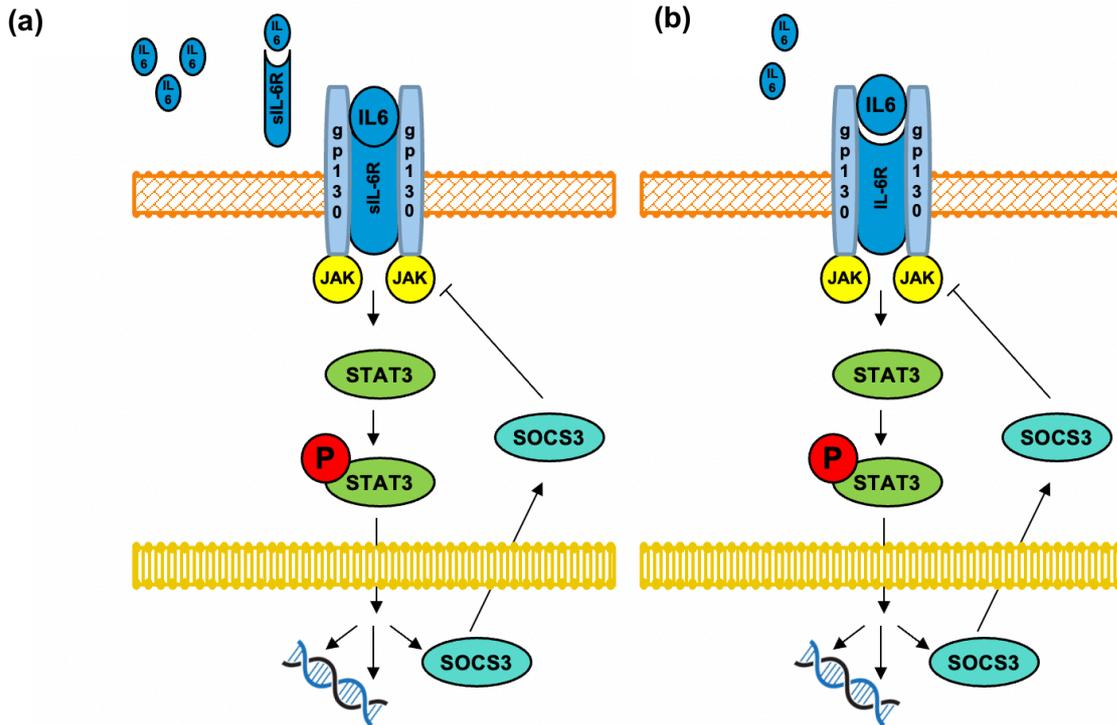


Abbildung 4: IL-6-Trans-Signaling über den löslichen sIL-6-Rezeptor (a) und IL-6 klassischer Signalweg über den membranständigen Rezeptor (b).

2.9 Vorarbeiten

Vor kurzem konnte die Arbeitsgruppe „Metabolische Programmierung“ an einem Mausmodell zeigen, dass mütterliches Übergewicht zur einer erhöhten IL-6-Serum-Konzentrationen und einer Aktivierung der IL-6/STAT3-Signalkaskade im Hypothalamus im Vergleich zu schlanken Kontrollen führt. Ein freiwilliges Laufradtraining während der Schwangerschaft der übergewichtigen Maus konnte die gesteigerte IL-6 Aktivierung wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe senken.¹³³ Parallel zu diesen Effekten, die am Ende der Stillzeit untersucht wurden, zeigten die Nachkommen von übergewichtigen Müttern eine gesteigerte Proteinexpression von IBA1, einem Marker für aktivierte Mikrogliazellen, im Hypothalamus.

Diese Ergebnisse sind ohne Mitarbeit der Autorin der vorliegenden Dissertationsschrift entstanden.

Da die Voruntersuchungen an ex vivo Hypothalami der Mäuse durchgeführt wurden, konnte in den Genexpressions- und Proteinanalysen nicht unterschieden werden, ob die hypothalamischen Neurone selbst oder die Mikroglia für die vermehrte Aktivierung der IL-6 Signalkaskade verantwortlich waren. Zudem waren zu dem Zeitpunkt notwendige immunhistochemische Methoden zur Beurteilung einzelner Zellpopulationen des Hypothalamus in der Arbeitsgruppe noch nicht abschließend vorhanden, sind aber mittlerweile sehr gut etabliert.³³ Für die Fortführung des Projektes ist daher geplant, zum einen immunhistochemische Untersuchungen an ex vivo Explantaten vom Hypothalamus durchzuführen, zum anderen soll parallel die Stimulation

von Mikrogliazellen und hypothalamischen Neuronen durchgeführt werden, um ergänzende Erkenntnisse zur hIL-6 Stimulation auf das Verhalten der einzelnen Zellpopulationen zu erlangen. Dabei soll der Schwerpunkt des vorliegenden Dissertationsprojektes auf der Stimulation von Mikrogliazellen mit hIL-6 und deren Auswirkungen auf Marker der Neuroinflammation (Aktivierung, Polarisierung, EZM-Degradierung, Gliose, synaptische Plastizität) im Zellkulturmodell liegen.

2.10 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

- Stimulation von Mikroglia-Zellen (BV-2 Zellen) mit hIL-6 beeinflusst die Morphologie und immunologische Phänotypisierung der BV-2 Zellen.
- Stimulation von BV-2 Zellen mit hIL-6 hat Einflüsse auf Marker/Regulatoren der Synaptischen Plastizität.

Zur Prüfung dieser Hypothesen wurden BV-2 Zellen (murine Mikrogliazellen) für je 4, 8, bzw. 24 Stunden mit hIL-6 stimuliert und mit einer nicht stimulierten Kontrollgruppe verglichen. Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt (s. Abb. 5).

Die vorliegende Dissertation soll neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen liefern, wie hIL-6 auf Mikroglia Zellen (BV-2 Zellen) *in vitro* wirkt.

Mehrere Arbeiten haben bereits beschrieben, dass mütterliches Übergewicht bzw. mütterliche Überernährung in verschiedenen perinatalen Phasen die Ausbildung und Funktion hypothalamischer Nervenzellnetzwerke beeinflussen kann.¹³³ Eine mechanistische Verbindung zwischen IL-6 und einer gestörten Morphologie und Funktion von Mikroglia und hypothalamischen Nervenzellnetzwerken *in vivo* fehlt bislang gänzlich. Bislang ist unklar, ob die Hypothalamus-Neurone selbst oder aber die Mikrogliazellen zytotoxisch wirken und so degenerative Mechanismen unterstützen. Die durch IL-6 aktivierte STAT3 Signalkaskade bedingt die Transkription verschiedener Gene, die in Folge die low-grade-Inflammation im Hypothalamus und die Entstehung von Gliose aufrechterhalten. Es stellt sich die Frage, ob mütterliche Adipositas möglicherweise über eine Modulation IL-6-abhängiger inflammatorischer Prozesse die Morphologie und Funktion hypothalamischer Nervenzellnetzwerke in den Nachkommen beeinflusst. Um festzustellen, welche Zellen im multizellulären Verband innerhalb des Hypothalamus maßgeblich an der intakten Funktion hypothalamischer Neuronennetzwerke beteiligt sind, ist als Grundlage eine differenzierte und isolierte Betrachtung von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen unter Stimulation notwendig. Daher werden in der hier vorliegenden Dissertation die Einflüsse von von hIL-6 auf Mikrogliazellen (BV-2) im Detail beleuchtet.

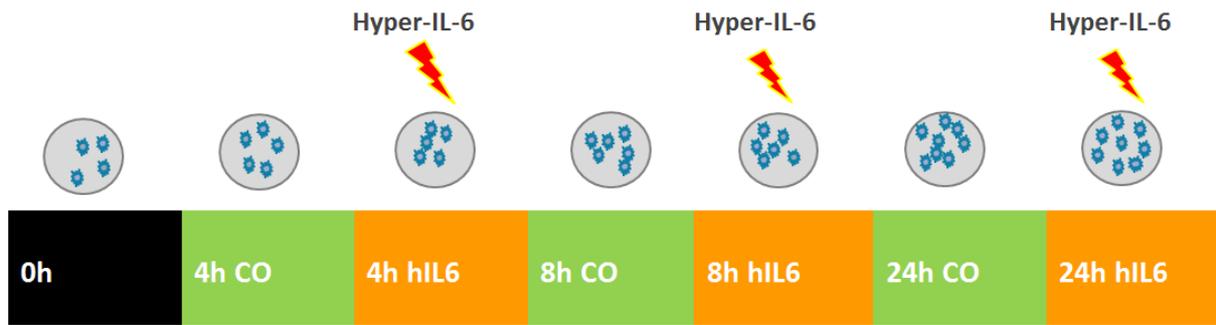


Abbildung 5: Versuchsmodell: BV-2 Zellen wurden für je 4, 8, bzw. 24 Stunden mit hIL-6 stimuliert und mit einer nicht stimulierten Kontrollgruppe verglichen

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Tabelle 2: Verwendete Zellen

Zelltyp	Eigenschaften	Firma, Sitz / Referenz
BV-2 Zelllinie	Zelllinie Mikroglia-ähnlicher Tumor-Mauszellen, induziert mit v-raf/v-myc onkogen tragender Retrovirus (J2)	ATCC, Manassas/Virginia, USA Prof. Thomas Langmann

3.2 Geräte und Software

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Software

Gerät, Software	Firma, Sitz
Absaugpumpe	Hettich Benelux, Geldermalsen, Niederlande
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
cellSens Dimension Software	Olympus, Shinjuku / Tokio, Japan
Doppelgel-Elektrophorese-System PerfectBlue Twin M	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Excel	Redmond/Washington, USA
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43	Olympus, Shinjuku / Tokio, Japan
GraphPad PRISM 9.0	GraphPad Software, San Diego/Kalifornien, USA
Heizblock	Hettich Benelux, Geldermalsen, Niederlande
Image J	Wayne Rasband (NIH)
ImageLab	BioRad, Hercules /Kalifornien, USA
Imager ChemiDoc XRS (Software Image Lab)	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Laborwaage CPA Laborwaage	Sartorius Göttingen, Deutschland
Microplaterereader Nano-Quant-Infinite M200 Pro (Software-I-Control 1.7)	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Gerät, Software	Firma, Sitz
Mikroskop Leitz Dialux 20 EB	Leica Microsystem, Wetzlar, Deutschland
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PEQLAB Power Supply EV231	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Schüttelplatte 3005	GFL, Burgwedel, Deutschland
Semi-Dry Elektrobloetter Perfect Blue™	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterilbank BS48	Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland
Stratalinker UV-Sterilisator	Stratagene, Agilent Technologies, San Diego/ Kalifornien, USA
Taumelschüttler Polymax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Tecan infinite M200 pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermozykler 7500 Real Time PCR System (Software: 7500 Software v 2.0.5)	Applied Biosystem, Forster City/ Kalifornien, USA
Vortexer K1 plus	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Wasserbad WNB 14	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R SD	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3.3 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	Firma, Sitz
BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Blotting Paper Sheets	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Cast-It M Gelgießstand (große Gele 14x16 cm)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Deckgläser (18x18 mm, 15x15 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Skalpelle	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	Firma, Sitz
Falcon Tube 15ml, 50ml	BD Falcon, Franklin Lakes/ New Jersey, USA
Filterspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glasplatte normal, 16x14 cm	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Glasplatte ausgeschnitten, 16x14 cm	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Kamm 16 Zähne, 1,0 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kamm 20 Zähne, 1,0 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Lagerkästen flach mit Raster für 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp Adhesive Film Applicator	Applied Biosystems, Forster City / Kalifornien, USA
Multiwell 6-Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multiwell 24-Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multiwell 96-Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Clear seals	4titude, Dorking, Großbritannien
Parafilm M	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Labsolute/Th. Geyer GmbH&Co KG, Renningen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl nicht gestopft	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitrocellulose Membran ROTI NC 0,45	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spacer 1,2 cm x 10 cm	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Stabpipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.3.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien

Produkt	Firma, Sitz
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamide Mix Gel 30 (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Bovine Serum WB (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Antikörper Diluent Dako	Agilent, Santa Clara/Kalifornien, USA
Aprotinin	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Aqua dest.	aus eigener Herstellung (MilliQ-Anlage)
Aqua bidest.	Aus eigener Herstellung (MilliQ-Anlage)
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Bromphenolblau Natrium-Salz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chlorophorm	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM	Gibco/Life Technologies, Carlsbad/Kalifornien, USA
Dnase-I-Puffer	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
dNTP-Mix (10 mM)	Fermentas, Waltham/Massachusetts, USA
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Little Chalfont, England
EDTA (25 mM)	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt 99,8%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS	Biochrom, Cambridge, UK
Fluorshield with DAPI Mounting Medium	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Glycin, Elphograde	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GoTaq®-qPCR Mastermix	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
HPLC-Wasser	aus eigener Herstellung (Milli-Q-Anlage)
Hyper-Interleukin-6	Prof. Stefan Rose-John, Christian-Albrechts- Universität zu Kiel, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Produkt	Firma, Sitz
GoTaq SYBR-Mix	Promega, Fitchburg/ Wisconsin, USA
Kaliumchloridlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Latex-Partikel (Polystyrol) 1µm	Sigma Aldrich, St. Louis/ Missouri, USA
Leupeptin 1mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Methanol rein	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MMLV – Reverse Transkriptase inklusive Puffer	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Natriumorthovanadat 200mM	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Natronlauge, mind. 32%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P40 (IGEPAL CA-630)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Oligo-dT-Primer (5'TTTTTTTTTTTTTTTT3')	MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland
Pageruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham/ Massachusetts, USA
Penicillin/Streptomycin 1%	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Pepastatin A	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
PFA (Rothi-Histofix)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Platinum qPCR Supermix- UDG with Rox	Invitrogen, Carlsbad/Kalifornien, USA
PMSF	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Polyethylensorbitmonolaurate (Tween20)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Ponceau S Solution	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Randomprimer	Roche, Basel, Schweiz
RNAsin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
RQ1 Rnase-Free DnaseI	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
Salzsäure 1N (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 32% (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Seablock Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham/ Massachusetts, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
TriReagent	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA

Produkt	Firma, Sitz
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Buffered-Saline (TBS)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Triton-X 100	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.3.2 Oligonukleotide

Die Primer und Sonden wurden innerhalb der Arbeitsgruppe Dötsch mit Hilfe der Software Primer Express 3.0 von Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA designed. Die Synthetisierung erfolgte durch MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland.

Tabelle 6: Verwendete Primer und Sonden Taqman Real-Time PCR

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')
Arc	forward	CCAGGAAGCTGATGGCTATGA
	reverse	TGACTCCTGTTCAGGCAGTTCTC
	probe	ATACCGTTAGCCCCTATGCCATCACCC
Arg1	forward	ACCCTGACCTATGTGTCATTTGG
	reverse	TGGTACATCTGGGAACTTTTCCTTT
	probe	ATGCTCACACTGACATCAACACTCCCCTG
β-Actin	forward	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT
	reverse	GCCACCGATCCACACAGAGT
	probe	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC
c-Fos	forward	ATCCGAAGGGAACGGAATAAG
	reverse	CAACGCAGACTTCTCATCTTCAA
	probe	AGCTGACAGATACTCCAAGCGGAGAA
Cx3cr1	forward	TGCCCTTGCTTATCATGAGCTT
	reverse	TCTGGCCTTCTTGCGATTCT
	probe	TGCTACTTCCGCATCATCCAGACGC
Egr1	forward	AAGACACCCCCCATGAAC
	reverse	GTAAGCTCATCCGAGCGAGAA
	probe	CCCATATGCTTGCCCTGTCGAGTCC
Gapdh	forward	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	reverse	TGCCTGCTTCACCACCTTCT
	probe	CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')
Homer1a	forward	GACCCGAACACAAAGAAGAACTG
	reverse	TATTGCCTTTGAGCCATCTAAACT
	probe	CCCACCAGCAAGCATGCAGTTACTGTATC
iNos	forward	CAGTGGAGAGATTTTGCATGACA
	reverse	GGGTCCTCTGGTCAAACCTCTTG
	probe	CACCACAAGGCCACATCGGATTTTAC
Il-1 β	forward	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC
	reverse	GGACAGCCCAGGTCAAAGG
	probe	ACCCCAAAGATGAAGGGCTGCTTCC
Mmp9	forward	TCCCCAAGACCTGAAAACCT
	reverse	GCCCGGGTGTAAACCATAGC
	probe	ACACCCAGCTGGCAGAGGCATACTTG
Ppary	forward	CCCAATGGTTGCTGATTACAAA
	reverse	GCCTGTTGTAGAGCTGGGTCTT
	probe	ACCTGAAGCTCCAAGAATACCAAAGTGCGA
Socs3	forward	CCACCCTCCAGCATCTTTGT
	reverse	TCCAGGAACTCCCGAATGG
	probe	ACTGTCAACGGCCACCTGGACTCCT
Syndecan 1	forward	AAGAGGTTGTCGAGGATGGAACCT
	reverse	TGTTTCAAAGGTGAAGTCTTGTTCTC
	probe	CCAATCAGCTTCCCGCAGGAGAGG
Syndecan 3	forward	TGAGCCAGAGGTGCCAGTAAGT
	reverse	TTCCACAGCCACCACCTCAT
	probe	CTTCAAGAAGAGACCACGCAGCCGG
Tenascin R	forward	AAGCCTGTACAAGATCCGCATAG
	reverse	TGTAGGACATGGCACAGTTGGT
	probe	AAGTTACAATGGCACTGCAGGAGACTCCC
Tgf β	forward	CTGAACCAAGGAGACGGAATACA
	reverse	CACGTGGAGTTTGTATCTTTGCT
	probe	CTTTGATTTCAGCGCTCACTGCTCTTG
Timp1	forward	ACCTGGTCATAAGGGCTAAATTCA
	reverse	CCGGATATCTGCGGCATT
	probe	TTCCCCAGAAATCAACGAGACCACCTT

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')
Timp2	forward	GCCTGAACCACAGGTACCAGAT
	reverse	GTCCATCCAGAGGCACTCATC
	probe	AGTGCAAGATCACTCGCTGTCCCATG
Tlr4	forward	GGTGAGAAATGAGCTGGTAAAGAATT
	reverse	GCAATGGCTACACCAGGAATAAA
	probe	TGCCCCGCTTTCACCTCTGCC
18S	forward	AGATCCCAGACTGGTTCCTG
	reverse	TTGTTGTCTAGACCGTTGGC
	probe	CAGAACCTGGCTGTACTIONTCCCATCC

Tabelle 7: Verwendete Primer und Sonden SYBR Green I Real-Time PCR

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')
β-Actin	forward	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT
	reverse	GCCACCGATCCACACAGAGT
c-Myc	forward	GCCCCTAGTGCTGCATGAG
	reverse	CCACAGACACCACATCAATTTCTT
Foxo1	forward	CAATGGCTATGGTAGGATGG
	reverse	TTTAAATGTAGCCTGCTCAC
GAPDH	forward	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	reverse	TGCCTGCTTCACCACCTTCT
Il-4	forward	GGAGATGGATGTGCCAAACG
	reverse	GCACCTTGAAGCCCTACAG
Il-4R	forward	GACCTCATCTCCATGGTCAACA
	reverse	TGGGTTCCCTTGTAGGTCACATTATAG
Nfkb1	forward	CATCCCGGAGTCACGAAATC
	reverse	GCACAATCTTTAGGGCCATTTT
Tnfa	forward	AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG
	reverse	GCTTGTCACTCGAATTTTGAGAAG
18S	forward	AGATCCCAGACTGGTTCCTG
	reverse	TTGTTGTCTAGACCGTTGGC

3.3.3 Antikörper und Immunhistochemie

Tabelle 8: Verwendete Antikörper Western Blot

Antikörper	kDa	Verdünnung	2.AK-Verdünnung	Firma, Sitz	Bestellnr.
c-FOS Kaninchen- Antikörper	62	1:1000 in Milch	Kaninchen 1:2000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	2250
p42/44 ERK1/2 Kaninchen- Antikörper	42,44	1:1000 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	9102
pp42/44 pERK1/2 Kaninchen- Antikörper	42,44	1:1000 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	4370
GAPDH Kaninchen- Antikörper	37	1:3000 in BSA	Kaninchen 1:5000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	2118
HPRT Kaninchen- Antikörper	24	1:2000 in BSA	Kaninchen 1:5000 in 5% Milch/TBST	Abcam, Cambridge, UK	ab10479
IBA1 Maus- Antikörper	17	1:1000 in BSA	Maus 1:1000 in 5% Milch/TBST	Abcam, Cambridge, UK	ab15690
iNOS Kaninchen- Antikörper	135	1:500 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Novus Biologicals, Littleton / Colorado, USA	NB300-605
PPAR α Maus- Antikörper	52	1:500	Maus 1:2000 in 5% Milch/TBST	Thermo Fisher Scientific, Waltham / Massachusetts, USA	MA1-822
STAT1 Kaninchen- Antikörper	84,91	1:1000 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	9172

Antikörper	kDa	Verdünnung	2.AK-Verdünnung	Firma, Sitz	Bestellnr.
pSTAT1 Kaninchen- Antikörper	91	1:1000 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	9177
STAT3 Maus- Antikörper	79, 86	1:1000 in Milch	Maus 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	9139
pSTAT3 Kaninchen- Antikörper	79, 86	1:1000 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	9145
TGFβ Kaninchen- Antikörper	12, 45-60	1:100 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USA	3709
TNFα Kaninchen- Antikörper	17, 25	1:1000 in BSA	Kaninchen 1:1000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling, Danvers / Massachusetts, USAs	3707
vGAT Kaninchen- Antikörper	55-60	1:2000 in BSA	Kaninchen 1:2000 in 5% Milch/TBST	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland	131003
vGLUT2 Kaninchen- Antikörper	62-67	1:200 in BSA	Kaninchen 1:2000 in 5% Milch/TBST	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland	135402

Tabelle 9: Verwendete Antikörper Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Firma, Sitz	Bestellnummer
Anti-IBA1	1:200 in AK diluent	Fujifilm Wako Chemicals, Neuss, Deutschland	016-20001
Phalloidin (FITC)	1:500 in Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA	P5282

3.3.4 Stamm- und Pufferlösungen

Alle verwendeten Lösungen entsprechen den Standards der AG-Dötsch.

Blockierlösung Westen Blot

- BSA 2%
- Milch 5%
- TBST

BV-2 Kulturmedium

- DMEM high Glucose
- 10% FBS
- 1% Penicillin/Streptomycin

Commasie-Färbelösung

- 0,1% Comassie Brilliant Blue
- 25% Isopropanol
- 10% Essigsäure

Developing Buffer 10x

- 0,5M TRIS
- 2M NaCl
- 50 nM CaCl₂
- 0,2% Brij-35 (30% Lösung)
- pH 8,0 mit HCL

Dnase-Verdau

- Dnase I-Puffer 10x
- Rnase-free-Dnase I (RQ1/Promega)

Laufpuffer (Lämmli-Puffer) 10x

- Glycin 1,92M
- SDS 1%
- TRIS 0,25 M

Mastermix A

- Randomprimer (0,5 µg/µl)
- Oligo-dt-Primer (0,5 µg/µl)
- DEPC A.d.

Mastermix B

- MMLV-buffer 5x
- dNTP-Mix (10mM)
- Rnase-Inhibitor (40U/µl)
- MMLV (200U/µl)
- DEPC A.d.

Platinum qPCR Supermix-UDG with ROX (Invitrogen)

- 12,5µl Platinum Supermix
- 8,5µl Aqua dest.
- 0,5µl Primer taq (2µM)
- 0,5µl Primer for (6µM)
- 0,5µl Primer rev (6µM)

Probenpuffer 3,5x

- 218,75 µl 1M TRIS pH 6,8
- 350 µl Glycerol+Bromphenolblau
- 350 µl 20% SDS
- 81,25 µl Aqua dest

Probenpuffer 5x

- 2-Mercaptoethanol 0,7%
- Bromphenolblau
- Glycin 1,92M
- SDS 10%
- TRIS 0,5M

Renaturing Buffer: 10x

- 25% TritonX-100

RIPA-Puffer (modifiziert)

- 50mM TRIS
- 150mM NaCl
- 1% Igepal
- 2mM EDTA
- 1µg/ml Aprotinin
- 1µg/ml Pepastatin A
- 1µg/ml Leupeptin
- 1mM PMSF
- 1mM NaF
- 1mM Na_3VO_4

Sammelgel (Western Blot)

- Aqua dest.
- Acrylamid 30%
- TRIS 0,5 M pH 6,8
- SDS 10%
- APS 10%
- TEMED

Stop-Solution

- EDTA 25 mM

Stripping Puffer (pH 6,7)

- 2-Mercaptoethanol 0,7%
- SDS 2%
- TRIS 0,05M

SYBR Green qPCR SuperMix

- 10µl iQ SYBR Green Supermix
- 8µl Aqua dest.
- 0,5µl Primer for (10µM)
- 0,5µl Primer rev (10µM)

TBS 10x (pH 7,5)

- NaCl 1M
- TRIS 0,1M

TBS-Tween (TBST)

- TBS 1x
- Tween 20 0,01%

Transferpuffer (Towbinpuffer) 10x

- Glycin 1,92M
- Methanol 10%
- TRIS 0,25M

Trenngel Western Blot (10%)

- Acrylamid 30%
- APS 10%
- SDS 10%
- TEMED 0,004%
- TRIS 1,5M pH 8,0
- Aqua dest.

Trenngel (Zymographie)

- Aqua dest.
- 1mg /1 ml Gelatine (porcine skin)
- Acrylamid 30%
- TRIS 1,5 M pH 8,0
- SDS 10%
- APS 10%
- TEMED

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zelllinie BV-2

BV-2 Zellen wurden in ihrem entsprechenden Kulturmedium (DMEM high Glucose, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin) in einem Feuchtinkubator bei 37°C + 5 % CO₂ kultiviert.¹³⁸ Die Zellen wachsen als adhärenente Monolayer in sterilen Zellkulturflaschen. Die Zellkultur der Zelllinie und primärer Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen (Sterilbank BS48).

Die BV-2 Zelllinie erhielten wir dank der freundlichen Unterstützung von Professor Thomas Langmann von der AG „Experimentelle Immunologie des Auges“ der Augenklinik der Uniklinik Köln.

3.4.2 Weiterkultur

Auf einer 10 cm Platte wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät. Nach Erreichen einer 70-80 % Konfluenz (alle 2-3 Tage) wurden die BV-2 Zellen in einem Verhältnis von 1:20 bzw. 1:40 umgesetzt. Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt, danach folgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden mittels eines sterilen Zellschabers. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Röhrchen überführt, anschließend wurden die Zellen 3 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen erneut entsprechend verdünnt, um in neue Zellkulturflaschen ausgesät zu werden. Wachstum und Zustand der Zellen wurden mit einem Durchlichtmikroskop kontrolliert.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellernte

Um die gewünschte Menge an Zellen (10^6) für das Aussäen für die Stimulationsversuche zu erreichen wurde die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurde zunächst das alte Medium entfernt, dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 10 mL frischem Medium mittels eines sterilen Zellschabers abgeschabt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau (TB) gemischt (180µl TB + 20µl Zellsuspension). 10µL dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Aus dem Mittelwert der Zellzahl der Großquadrate wurde dann die Zellzahl pro mL Suspension berechnet. Zum Ernten wurden die Zellen der stimulierten, wie auch der Kontrollgruppe nach je 0, 4, 8 und 24 Stunden mit 1x PBS gewaschen und in 1,5 ml PBS abgeschabt. Daraufhin wurden die Zellen für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend entweder direkt weiterverarbeitet oder für die Weiterverarbeitung zu RNA und Protein bei -80°C asserviert.

3.4.4 *In vitro* Stimulationen mit Hyper-Interleukin-6

Für die *in vitro* Stimulationsversuche wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 10 cm Platte ausgesät. Die Stimulation erfolgte bei Erreichen einer Konfluenz von 60-70%. Zunächst wurden die Zel-

len mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die hIL-6-Gruppe mit Hyper-Interleukin-6 stimuliert. 1000 ng/ml konzentriertes hIL-6 wurde in PBS gelöst, sodass die Stimulation mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml im Kulturmedium erfolgte. Darauf folgte die Inkubation für 4, 8 bzw. 24 Stunden. Die Kontrollgruppe wurde mit Kulturmedium plus Vehikel (PBS) inkubiert und ebenfalls zu den Zeitpunkten 0, 4, 8 und 24 Stunden geerntet.

Mit dem Ziel, etwas über das Sekretom – die Gesamtheit der von den BV-2 Zellen in die Umgebung ausgeschütteten Botenstoffe – zu erfahren und gegebenenfalls weitere Versuche mit dem Überstand der Zellen durchzuführen, wurde dieser in beiden Gruppen zu allen Zeitpunkten abgenommen und bei -80°C asserviert. Insgesamt wurden vier Versuche (n=V1-V4) durchgeführt. Die Zellkultur wurde durch die Biologielaborantin Christina Vohlen durchgeführt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.5.1.1 Grundlagen

Die PCR ist ein Verfahren, das dazu dient, genau definierte DNA-Sequenzen in vitro zu amplifizieren. Drei Arbeitsschritte ergeben gemeinsam einen vollständigen Zyklus. Die erste Phase stellt die Denaturierung dar, die bei einer Temperatur von 94 °C abläuft. Hier brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren auf und das DNA-Template, das als Doppelstrang vorliegt, wird in zwei Einzelstränge aufgetrennt. In der sich anschließenden Annealing-Phase erfolgt primerabhängig bei unterschiedlichen Temperaturen die Anlagerung der exakt designten synthetischen Oligonukleotid-Primer an die nun einzelsträngige Ziel-DNA-Sequenz. Die dritte Phase dient der Elongation der Template-DNA. Bei 72°C, dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, werden die spezifisch gebundenen Primer komplementär zum DNA-Template synthetisiert. Das Ergebnis ist eine wieder doppelsträngige DNA, die im nächsten Zyklus erneut zu Einzelsträngen aufgeschmolzen wird. Nach etwa 25-40-facher Wiederholung der beschriebenen Zyklen einer PCR kommt es zur exponentiellen Amplifizierung der exakt gleichen Ausgangs-DNA.¹³⁹⁻¹⁴¹ Alle Schritte werden in einem programmierten Thermocycler durchlaufen.

3.5.1.2 Quantitative Realtime PCR mit Taqman®-Technologie

Die Quantitative Realtime PCR (qPCR) dient der schnellen und genauen Quantifizierung der Expression multipler Gene in Echtzeit unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Taqman®-Sonden. Der Methode liegt das Prinzip der PCR zugrunde. Zusätzlich ermöglicht hier jedoch die Fluoreszenz-Messung eine Verfolgung und Quantifizierung der Amplifikationsreaktion. Während der PCR wird kontinuierlich ein Fluoreszenzsignal gemessen, das analog zur Menge des PCR-Produktes ansteigt. Das Prinzip des sogenannten Fluoreszenz-Reso-

nanz-Energie-Transfer (FRET) beruht auf der Annahme, dass jeder Fluoreszenzfarbstoff ein charakteristisches Anregungs- und Emissionsspektrum besitzt. Regt man einen Farbstoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge an, gibt dieser Licht in einer anderen, für diesen Stoff spezifischen, Wellenlänge ab. Der Fluoreszenzfarbstoff fungiert als Reporter, dessen abgegebene Energie von einem Quencher aufgenommen wird. Bei der TaqMan real-time qPCR werden Oligonukleotide verwendet, die an beiden Enden mit Farbstoffderivaten versehen sind (TaqMan-Sonden). Es handelt sich dabei um eine spezifische DNA-Sonde, die zwischen zwei bestimmten Oligonukleotidprimern an die DNA bindet. An ihrem 5'-Ende sind diese Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM, Reporter), und am 3'-Ende mit einem so genannten Quencher (TAMRA) gekoppelt. Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher ist die Lichtemission des Reporterfluoreszenzfarbstoffs normalerweise unterdrückt. Die für die Elongation eingesetzte DNA-Taq-Polymerase besitzt allerdings neben der Fähigkeit die DNA zu synthetisieren auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Sie baut die Sonde ab und trennt so Reporter und Quencher während der Neustrangsynthese räumlich voneinander. Der Quencher kann den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) nicht mehr unterdrücken und es kommt zur Lichtemission. Hierdurch wird im Folgenden der CT-Wert (Cycle threshold = Schwellenwert-Zyklus) ermittelt. Dieser beschreibt den Zeitpunkt, an dem sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Dieser wird für jedes in der qPCR gemessene Gen differenziert bestimmt und gibt Aufschluss über die ursprüngliche Kopienanzahl: Je früher der Schwellenwert erreicht wird, desto mehr Ziel-DNA war in der Probe vorhanden.^{140,142}

3.5.1.3 Quantitative Realtime PCR mit SYBR-Green®-Technologie

Die SYBR-Green® PCR stellt ebenfalls eine Variante der quantitativen PCR dar. Bei SYBR-Green I handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff, der das Maximum seiner Fluoreszenzemission bei 520 nm (grünes Licht) erreicht. SYBR-Green I interkaliert direkt mit der doppelsträngigen DNA-Helix. Durch eine direkte Messung des Fluoreszenzsignals kann vorhandene DNA detektiert werden. Das Signal verstärkt sich proportional zur Anzahl der amplifizierten DNA-Kopien.

3.5.1.4 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den geernteten Zellen erfolgte mit TRIzol. Im ersten Schritt wurden die Zellen durch eine fünfminütige Inkubation mit 500 µl TRIzol bei RT homogenisiert und lysiert. Dieser Schritt dient der Denaturierung sämtlicher Proteine und somit der Vermeidung einer Verunreinigung der RNA. Es folgte die Zugabe von 100 µl Chloroform und das gute Durchmischen des Reaktionsansatzes (Vortexen). Daraufhin inkubierte das Reaktionsge-

misch für 3 Minuten bei RT bevor es für 15 Minuten bei 120000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Nach erfolgreicher Phasentrennung wurde der RNA-haltige Überstand in ein neues Tube pipettiert und mit 250µl Isopropanol versetzt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann erneut zentrifugiert und das Isopropanol anschließend verworfen. Danach wurde das Pellet zweimalig mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde das RNA-Pellet für 30 Minuten getrocknet und dann in RNase freiem Aqua bidest gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

3.5.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Dieser Vorgang dient dem Ausschluss einer eventuellen Verunreinigung durch Proteine und stellt sicher, dass für die Weiterverarbeitung gleiche Mengen an RNA in den Proben vorliegen. Die Proben wurden mit dem Microplaterreader Tecan Nano Quant infinite M200 pro und der dazugehörigen Software gemessen und ausgewertet. Anhand der Extinktion der Probe kann die Konzentration berechnet werden. Mit Hilfe bekannter Absorptionsmaxima konnte eine Verunreinigung durch Proteine (280 nm) ausgeschlossen werden. Die Reinheit der RNA wurde über den Quotienten der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 ermittelt (OD_{260}/OD_{280}), der idealerweise zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte unverdünnt mit RNase-freiem Wasser als Referenz.

3.5.1.6 Reverse-Transkription – cDNA-Synthese

Da für die quantitative Realtime PCR keine RNA eingesetzt werden kann, muss die isolierte RNA mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in eine komplementäre DNA-Kopie umgeschrieben werden. Hierfür wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) verwendet. Damit die Reverse Transkriptase in 5'-3'Richtung einen cDNA-Strang synthetisieren kann, wird ein Oligo-dT-Primer benötigt. Die Polyadenylierung der mRNA am 3'-Ende, ermöglicht es, den Oligo-dT-Primer als Startpunkt für die cDNA-Synthese zu verwenden. Dieser bindet spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA und so kann anschließend Mithilfe einer DNA-abhängigen Polymerase der mRNA-Strang ersetzt werden. Die so synthetisierte doppelsträngige cDNA (complimentary DNA) kann man beispielsweise für die Durchführung der PCR verwenden.¹⁴⁰ Die RNA-Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 15 Minuten mit RNase-free Dnase I und Dnase-Puffer I bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient der Entfernung eventueller cDNA-Reste. Daraufhin wurde die Dnase durch die Zugabe der Stopp-Lösung und eine 15-minütige Erwärmung auf 65°C inaktiviert. Im nächsten Schritt wurde der Mastermix A, der den Oligo-dT-Primer enthält, hinzugefügt. Dieser lagerte sich bei einer Erhitzung

für 5min auf 70°C an die Poly-A-Sequenz der mRNA an. Der eigentliche Prozess der reversen Transkription von mRNA in cDNA erfolgte im letzten Schritt durch die Zugabe des Mastermix B, welcher die reverse Transkriptase und Nukleotide enthält. Das Gemisch inkubiert für eine Stunde bei 37°C. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.5.1.7 Durchführung qPCR

Um die relative cDNA-Expression zu messen, wurden bei der TaqMan-Methode dem bereits vorgemischten Supermix Aqua dest., forward und reverse Primer, sowie die TaqMan-Sonde entsprechend der Anleitung des Herstellers hinzugefügt. Je 22,5µl dieses Mastermix und 2,5µl cDNA wurden in ein Well einer 96 Well-Platte gegeben. Die mit den Proben vollständig beladene Platte wurde mit einer Folie dicht verschlossen und anschließend für drei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Für den Ablauf der qPCR wurde die Platte in den Thermozykler 7500 Real Time PCR System eingesetzt und das Standardprogramm gestartet. Für die SYBR-Green® I-Methode wurden SYBR Supermix, Aqua dest. sowie forward und reverse Primer in einem Reaktionsgefäß zusammengefügt. Ein Well wurde mit je 1µl cDNA und 19µl Mastermix befüllt. Das weitere Vorgehen entspricht der oben beschriebenen Taqman-Methode. Pro Kon-dition wurden 4 Versuche untersucht, sodass sich insgesamt pro gemessenem Gen 28 Proben auf einer Platte befanden. Für ausgewählte Gene wurden die Messungen in 4 weiteren Versu-chen (V5-V8) durchgeführt, um die Stichprobenzahl zu erhöhen. Die Tabellen 6 und 7 zeigen die jeweils verwendeten Primer.

3.5.1.8 Relative Quantifizierung

Um die gewonnenen Daten normalisieren zu können, wurden die vom gemessenen Zielgen erhaltenen Ergebnisse auf die Expressionslevel eines so genannten Housekeeping Genes der gleichen Probe bezogen. Idealerweise sollten diese Referenzgene in den unterschiedlichen Zellen ähnlich exprimiert, ubiquitär vorhanden und nicht reguliert sein. Es wurden drei ver-schiedene Housekeeping-Gene (GAPDH, β -Actin, 18S) gemessen und anschließend statis-tisch auf Normalverteilung und Varianz überprüft. Anhand dieser Analyse wurde bei der Me-thode der qPCR β -Actin als Houeskeeping-Gen ausgewählt. β -Actin erwies sich als statistisch stabilstes Gen und wurde daher für alle qPCRs als Referenzgen festgelegt. Die relative Quan-tifizierung eines jeden Gens erfolgte anschließend mit der delta-delta-CT-Methode.¹⁴³

3.5.2 Western Blot

3.5.2.1 Grundlagen

Der Western Blot stellt ein Verfahren dar, das dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen dient. Zunächst werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung mittels

der SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) entsprechend ihrer molekularen Masse gelelektrophoretisch aufgetrennt. SDS denaturiert und bindet die Proteine, wodurch alle Proteine gleich negativ geladen sind und die Eigenladung vernachlässigt werden kann. Die Proteine unterscheiden sich dann nur noch in ihrem Molekulargewicht. Sie werden auf einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel unter Anlegung von Spannung nach ihrer Kettenlänge, die proportional zur Molekülmasse ist, in Richtung Anode (Pluspol) aufgetrennt. Danach folgt der Schritt des eigentlichen „Blottens“, ein Proteintransfer entlang eines elektrochemischen Gradienten auf eine Membran. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden die Proteine auf der Membran als Trägermatrix immobilisiert. Anschließend erfolgt der Nachweis der Proteine durch indirekte Antikörperbindung, indem die Proteine nach dem Transfer auf die Membran mit einem spezifischen Erstantikörper markiert werden. An diesen bindet dann ein Zweitantikörper, welcher ein Enzym gekoppelt hat, das nach Zugabe eines chromogenen Substrates eine Farbreaktion katalysiert. Durch die Kenntnis, in welchem Bandenmuster die Anfärbung geschieht, werden die Proteine identifiziert.¹⁴⁴ Für diese Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Aktivierung intrazellulärer proinflammatorischer Signalwege/-moleküle mittels Western Blot sowie für die Beurteilung der Proliferation und Polarisierung von Mikroglia bekannter spezifischer Marker (s. Tabelle 1) GAPDH und HPRT wurden als Referenzproteine und Ladekontrolle verwendet. Die Auswertung erfolgt mit ImageLab, Excel und GraphPad Prism 9.0.

3.5.2.2 Proteinisolation

Um Proteinanalysen wie beispielsweise Western Blot Versuche (s.u.) durchzuführen, muss aus den asservierten Zellpellets zunächst Protein isoliert werden. Hierzu wurde das Pellet im ersten Schritt aufgetaut und mit 50 µl RIPA-Puffer versetzt. Das Reaktionsgemisch inkubierte eine Stunde auf Eis und wurde anschließend für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und bei -80°C eingefroren.

3.5.2.3 Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung der einzelnen Proben erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay). Der BCA-Assay beruht auf einer Reduktion von an die Peptidbindungen der Aminosäuren gebundenem Kupfer, an das wiederum Bicinchoninsäure bindet. Durch die Bindung entsteht ein Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. Eine ELISA-Patte wurde mit den Proben in 1:10 Verdünnung beladen. Jedes Well wurde mit 10µl Probe und 200µl Working Reagent befüllt. Das Reaktionsgemisch inkubierte 30 Minuten bei 37°C. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.5.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor dem eigentlichen Blot wurden die einzelnen Proteine mit Hilfe einer Gelelektrophorese der Molekülgröße nach aufgetrennt. Die entstehenden Komplexe erhalten eine gleichmäßig verteilte negative Ladung, mithilfe derer gewährleistet werden kann, dass die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel lediglich noch von ihrer relativen Molekülmasse bestimmt wird. Die zu untersuchenden Proteine wandern bei der SDS-Gelelektrophorese entlang eines elektrischen Feldes durch das Trenn- und Sammelgel.

Die einzelnen Bestandteile des Gießstands (Glasplatten, Kämme, Spacer) wurden mit 70%-igem Ethanol gereinigt und entsprechend der Herstelleranleitung zusammengesetzt. Zunächst wurde passend zur Größe der zu untersuchenden Proteine ein 10%-iges Trenngel in das vorbereitete Doppelgel-Elektrophorese-System eingefüllt. Nach dessen Aushärtung (Polymerisation) wurde ein 4%-iges Sammelgel gegossen. Die Verwendung beider Gele dient dazu, eine schärfere Bandentrennung zu erreichen. Das Sammelgel besitzt einen anderen pH-Wert und größere Poren. Es erlaubt den Proteinen, schnell und ohne Auftrennung bis zur Grenzfläche zum Trenngel zu wandern. Dort verringert sich ihre Geschwindigkeit und die Auftrennung erfolgt nun nach der Proteingröße. Die Funktion des Gels entspricht der eines Siebs: Während kleinere Proteine leicht durch die Maschen des Gels wandern, werden größere Proteine eher zurückgehalten. Dieses Prinzip führt zu dem charakteristischen Muster unterschiedlicher Banden.¹⁴⁵ Die genaue Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele ist unter Punkt 2.4.3 aufgeführt. Die in das Sammelgel eingesetzten Kämme dienten der Ausbildung von Taschen für das Proteingemisch. Um eine einheitliche Proteinkonzentration sicherzustellen, wurde eine genau ermittelte Menge an Aqua dest. in den Reaktionsgefäßen vorgelegt. Daraufhin wurden die Proben mit 5-fach konzentriertem SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, gevortext und für zehn Minuten bei 70°C im Thermomixer erhitzt. Der vorbereitete Gießstand wurde mit 1x Lämmli-Puffer (Lauffpuffer) befüllt und die Proben mittels Kapillarspitzen in die vorgeformten Taschen gegeben. Zur Abschätzung der Größe von Proteinen wurde parallel zu den eigentlichen Proben in die erste und letzte Tasche ein Marker mit Proteinen bekannter Größe geladen. Nach Anlage eines elektrischen Feldes wurde für das Durchlaufen des Sammelgels zunächst eine Spannung von 80V über 45 Minuten gewählt. Anschließend wurde die Spannung für drei Stunden auf 120V erhöht. Nachdem die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und die Apparatur auseinandergelassen. Das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen, das Trenngel in den Transferpuffer überführt.

3.5.2.5 Blotten

Der Vorgang des Blottens beschreibt die Übertragung der Proteine eines SDS-Gels auf eine adsorbierende Membran.¹⁴⁴ Für den Proteintransfer wurden Filterpapiere und eine Nitrocellulose-Membran in der Größe des Trenngels vorbereitet. Die Membran wurde für zwei Minuten

in kaltem MilliQ-Wasser eingelegt. Filter und Membran wurden daraufhin mit dem Transferpuffer übergossen und kaltgestellt. Nach Ablauf der Elektrophorese erfolgte die Umlagerung des Gels auf die aktivierte Membran. Auf der Anode wurden in eben dieser Reihenfolge zwei Filterpapiere, die Membran, das Trenngel und erneut zwei Filterpapiere platziert. Bei dieser Schichtung galt es vor allem Luftblasen und Verunreinigung durch Fremdproteine zu vermeiden. Bevor der Semi-Dry-Elektroblotter mit Druck verschlossen wurde, wurden die Schichten noch mit dem übrigen Transferpuffer übergossen. Bei einer Stromstärke von $1,3 \text{ mA/cm}^2$ erfolgte über zwei Stunden der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Membran. Hierbei wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die Membran. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben sie an der Membran haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol sorgt dafür, dass das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen wieder herausgewaschen wird. Dadurch können die Proteine renaturieren und erneut ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur einnehmen. Die Membran wurde nach dem Blottvorgang mit Ponceau-Rot-Lösung angefärbt, zweifach mit Aqua dest. gewaschen und entsprechend der Marker-Banden in Streifen geschnitten. Es folgt der Blockiervorgang (siehe unten).

3.5.2.6 Proteinnachweis

Zur Bestimmung der Identität von Proteinen werden spezifische Antikörper benötigt. Ein antigenspezifischer Primärantikörper bindet an Epitope des gesuchten Proteins. Um zu verhindern, dass die Antikörper an freie Bindungsstellen der Membran haften, müssen diese zuvor blockiert werden. Der Blockiervorgang erfolgte mit einem für Antikörper nicht erkennbaren Protein (Milchpulver, BSA). Die einzelnen Membranabschnitte wurden für 45 Minuten mit Blockierlösung bei Raumtemperatur auf den Schüttler gegeben. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf dem Taumel-Schüttler. Mit dem Ziel, unspezifisch gebundene Antikörpermoleküle abzuwaschen wurden am Folgetag zunächst über 30 Minuten insgesamt drei Waschungen der Membranstreifen mit TBST vollzogen. Es folgte die Beladung der Membran mit dem Zweitantikörper. Dieser inkubierte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Im Anschluss folgten erneut 3 Waschungen mit TBST, um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper ist Enzym-konjugiert. Er erkennt spezifische Bereiche des Primärantikörpers, meist dessen antikörperbindende Domäne, den sog. Fc-Teil, und katalysiert eine Chemielumineszenzreaktion. Zur Detektion der Proteinbanden wurden je $200 \mu\text{l}$ der beiden ECL Reagenzien auf die Membranstreifen aufgebracht und für eine Minute inkubiert. ECL dient als Substrat für die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase und macht die Proteine so durch Lichtemission indirekt sichtbar. Zur Visualisierung der Banden wurden der ChemiDoc Imager und die dazugehörige Software verwendet. Die Belichtungszeit galt es je nach Antikörper individuell zu bestimmen. Als Bela-

dungskontrollen diente GAPDH. Sollte ein weiterer Proteinnachweis auf selbiger Membran erfolgen, wurden die Membranstreifen mit einem Reagenz aus Stripping-Puffer und 2-Mercaptoethanol für 30 Minuten im 55°C Wasserbad inkubiert. Dieser Vorgang diente der Entfernung des Antikörperkomplexes. Bevor die Beladung mit einem neuen Antikörper durchgeführt werden konnte, mussten die Waschungen mit TBST und der Blockiervorgang wiederholt werden. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels der Software ImageLab und Excel. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 aufgeführt.

3.6 Morphologische Methoden

Die unterschiedlichen Aktivierungszustände von Mikrogliazellen spiegeln sich in ihrem morphologischen Erscheinungsbild wider. Um die morphologischen Änderungen unter der Stimulation mit hIL-6 zu dokumentieren, erfolgten verschiedene Färbungen und mikroskopische Methoden.

3.6.1 Durchlichtmikroskopie

Bereits in der Durchlichtmikroskopie mit dem Leitz Optilux Mikroskop im Rahmen der Zellkultivierung fielen zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen Unterschiede in der Morphologie der Zellen auf.

3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie und Immunzytochemie

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen können bestimmte Antigene spezifisch dargestellt werden. Es gibt die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz (IF). Bei der direkten Immunfluoreszenz fluoresziert der gegen das Ziel-Antigen gerichtete primäre Antikörper selbst. Im Falle der indirekten IF fluoresziert der sekundäre AK, der gegen den primären AK gerichtet ist. Es gilt zu beachten, dass der sekundäre Antikörper gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet ist. Das verwendete Olympus BX43 Fluoreszenzmikroskop besitzt die Kanäle grün, rot, blau. Dementsprechend wurden diese Farben für die Färbungen verwendet. Ziel war es, mittels der immunhistochemischen Färbungen die morphologischen Veränderungen unter der Stimulation von IL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu dokumentieren. Zur Bestimmung des Aktivierungszustandes der BV-2 Zellen in den jeweiligen Gruppen erfolgte eine IBA1 (Ionized Calcium Binding adapter molecule) -Färbung. Bei IBA1 handelt es sich um ein Kalzium bindendes Protein, das als Marker für den Aktivierungszustand von Mikroglia gilt.⁸⁹ Zur genaueren Beurteilung der Morphologie mitsamt den Fortsätzen der BV-2 Zellen erfolgte zusätzlich noch eine Phalloidin-Färbung. Phalloidin färbt Aktin an und dient somit der optimalen Darstellung des Zytoskeletts. Die Färbungen erfolgten auf den Plättchen der zuvor in 24-Well-Platten kul-

tivierten Zellen. Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und der cellSens Dimension Software durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach verschiedenen Methoden (s.u.) mittels der Software Image J. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 aufgeführt.

3.6.2.1 IBA1-Färbung

Nachdem die Kultur bei Raumtemperatur für 5 Minuten aufgewärmt wurde, erfolgten über 15 Minuten insgesamt drei Waschungen mit PBS auf dem Schüttler. Daraufhin wurden die Coverslides mit 0,3% Triton-X-100 in PBS für 30 Minuten permeabilisiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungskomponenten mit Sea Block Buffer für 2 Stunden, wurden die Proben mit dem primären IBA1-Antikörper inkubiert. Dieser wurden zuvor in einer Verdünnung von 1:200 in Antikörper-Diluent gelöst. Eine Negativkontrolle wurde nur mit Antikörper-Diluent ohne den Primärantikörper versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurden die Proben nach intensivem Waschen in PBS bei RT für zwei Stunden mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Die Coverslides wurden anschließend erneut dreimalig in PBS gewaschen, in Aqua dest. eingetaucht und abschließend in Fluoroshield-Eindeckmedium mit DAPI zur Anfärbung der Zellkerne eingedeckt. Um eine Abschwächung der Fluoreszenz zu vermeiden, wurde die Schritte bei weitgehender Dunkelheit durchgeführt und die Proben in lichtundurchlässigen Kästen gelagert. Für die morphometrische Analyse wurden Fluoreszenzbilder mit der Olympus BX43F und der cellSens Dimension Software sowohl in 40-facher als auch in 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Für alle Aufnahmen wurde eine möglichst gleiche Belichtungszeit ausgewählt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software, ergänzt mit dem Olympus viewer plugin.

3.6.2.1.1 Intensitätsmessung

Die Bilder in 40-facher Vergrößerung wurden genutzt, um in Image J eine Intensitätsmessung der IBA1-Färbung durchzuführen. Diese erfolgte anhand eines in der Arbeitsgruppe etablierten Protokolls.³³ Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurden alle Proben identisch behandelt und die Bilder zeitnah im Anschluss an die Färbung am Mikroskop aufgenommen. Zudem wurde eine für alle Proben vergleichbare Belichtungszeit am Mikroskop gewählt. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Image J und dem OlympusViewer Plugin. Es wurde zunächst die gleiche Helligkeit für alle zu vergleichenden Proben eingestellt. Daraufhin wurde die Zellzahl mittels des Multipoint-Tools anhand der DAPI positiven Zellkerne ermittelt und zudem durch das Übereinanderlegen der Farbkanäle überprüft, ob die DAPI positiven Zellen gleichzeitig auch mit dem Primärantikörper markiert waren. Daraufhin wurde manuell ein Threshold festgelegt, der dem Programm ermöglicht, Vordergrund und Hintergrund voneinan-

der zu unterscheiden. Anhand des Thresholds erfolgte die Definition der zu bestimmenden Fläche, der sog. Region of Interest (ROI), indem man mithilfe der Funktion „Create selections“ den relevanten Vordergrund auswählte und anschließend in den ROI-Manager aufnahm. Mittels der Analyse-Funktion des Programms wurde die Zellfläche gemessen. Insgesamt wurden Messungen aus 7 am Mikroskop aufgenommenen Bildern statistisch ausgewertet.

3.6.2.1.2 Z-Stacks

Um die Fortsätze der Mikrogliazellen möglichst in ihrer gesamten Ausprägung nachverfolgen zu können, wurden die Aufnahmen in 100x Vergrößerung mittels sogenannter Z-Stacks durchgeführt. Bei dieser Methode wurde mittels der cellSens Dimension Software alle 0,5 μm ein Bild aufgenommen. So erreicht man eine mehrdimensionale Betrachtung der vollständigen Ausprägung der Fortsätze.¹⁰² Das Blickfeld wurde in der DAPI-Ansicht ausgewählt, anschließend der Kanal für die IBA1-Färbung eröffnet. Im cellSense Dimension Programm wurde anhand der Funktion *Set Scale* in einem Bild der IBA-1-Färbung exemplarisch ein Maßstab eingebracht, der für die folgenden Bilder als Grundlage diente. Mittels des festgelegten Maßstabs konnte aus den im Bild detektierten Pixel in Image J eine μm -Länge berechnet werden. Die Verfolgung und Messung der Fortsätze erfolgte zunächst manuell durch ein Längenmaß-Tool in Image J. Anhand des vorher bestimmten Maßstabs in Image J kann das Programm die gemessene Länge von Pixel in μm umsetzen. Es erfolgte einer Auszählung der Gesamtanzahl der Zellen, der Anzahl der Fortsätze und der Länge der Fortsätze.

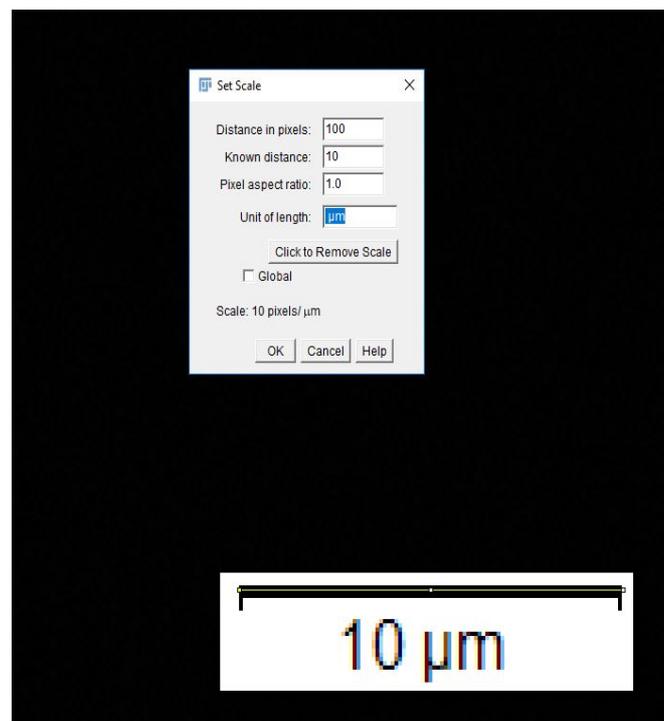


Abbildung 6: Maßstab in ImageJ (Set Scale-Funktion) zur Bestimmung der Fortsatzlänge der BV-2 Zellen

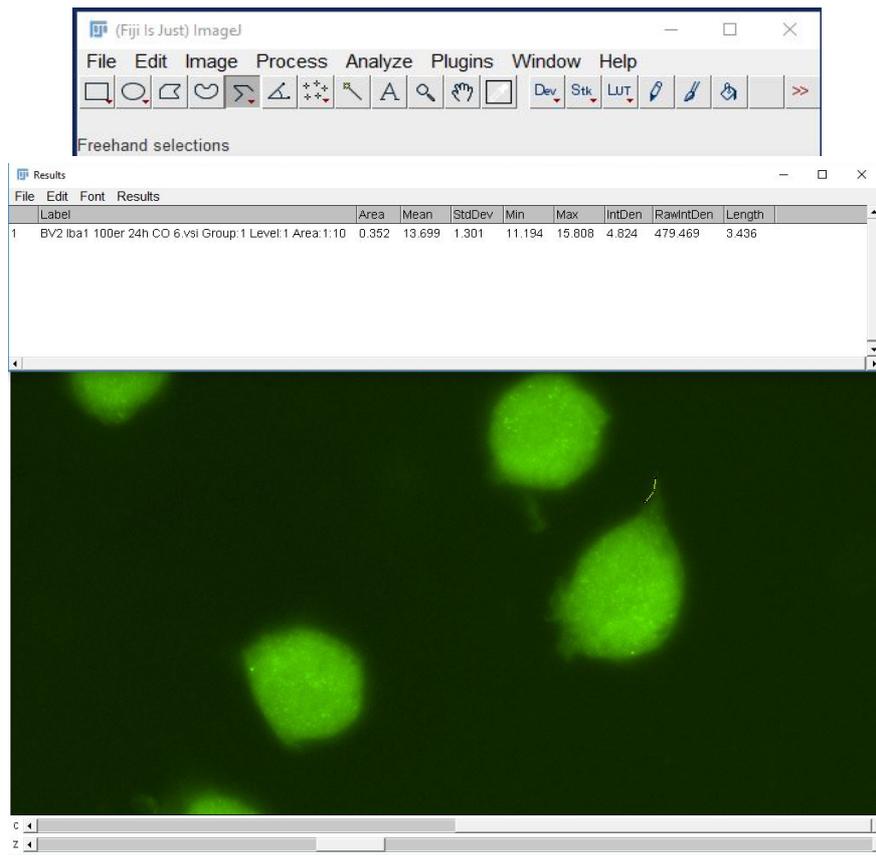


Abbildung 7: Beispiel Fortsatzvermessung mittels manuellem Längenmaßtool und ROI-Manager (ImageJ)

3.6.2.2 Phalloidin-Färbung

Zur genaueren Darstellung des Zytoskeletts und somit der Fortsätze der BV-2 Zellen erfolgte eine Färbung mit Phalloidin. Phalloidin ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*). Durch seine Bindung an F-Aktin wirkt es stark stabilisierend auf die Aktinfilamente. Wird nun ein fluoreszierender Farbstoff (FITC) an Phalloidin gebunden, kann das Aktin enthaltende Zytoskelett mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Zellen auf den sterilen Deckplättchen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X in PBS für 15 Minuten mit darauffolgender erneuter Wäsche in PBS. Phalloidin (FITC) 0,5 mg/ml in Methanol wurde mit PBS 1:500 verdünnt. Darauf folgte die Inkubation mit Phalloidin (FITC) für 15 Minuten bei RT und Dunkelheit. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit Fluorshield-Eindeckmedium eingedeckelt und lichtdicht verschlossen bei 4°C asserviert. Die Aufnahmen wurden in 40-facher Vergrößerung mit dem Olympus BX43 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

3.7 Funktionsassays

Die Experimente auf RNA-Ebene zeigten unterschiedliche Genexpressionen der Zellen gemäß ihren unterschiedlichen Stimulierungen. Um einen Effekt der Stimulation mit hIL-6 auch auf translationaler und funktionaler Ebene zeigen zu können, wurden die BV-2 Zellen beider Versuchsgruppen (hIL-6 vs. CO) mittels funktioneller Assays auf Änderungen in ihrer phagozytotischen Aktivität untersucht.

3.7.1 Phagozytose-Assay

Um eine geänderte Phagozytoseaktivität unter dem Einfluss von Hyper-Interleukin-6 zu zeigen, wurde ein Phagozytose-Assay mit blauen Latex-Beads durchgeführt.¹⁴⁶ Zunächst wurden BV-2 Zellen in einer Konzentration von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen pro Well auf UV-sterilisierten Coverslides in einer 6-Well Platte ausgesät und über Nacht in ihrem entsprechenden Medium kultiviert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel (2 ml) und die Inkubation mit 100 ng/ml Hyper-Interleukin-6 und der entsprechenden Kontrolle für zwei Stunden. Im Anschluss wurden 1 μ l/ml bzw. 2 μ l/ml blaue Latex Beads (1 μ m) aus Polystyren pro Well ins Medium hinzugegeben. Nach einer 6-stündigen Inkubation wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit frischem Medium gewaschen. Anschließend wurde die Partikelaufnahme mittels Durchlichtmikroskopie dokumentiert. Hierzu wurde ein Übersichtsbild in 20-facher Vergrößerung und je 5 Bilder unterschiedlicher Ausschnitte in 40-facher Vergrößerung aufgenommen und ausgewertet. Es wurden fünf Bildausschnitte in zwei unabhängigen Versuchen ausgezählt. Die Auswahl der Bildausschnitte erfolgte stets nach dem gleichen zufälligen Muster, sodass sie einen Gesamteindruck eines jeden Wells wiedergeben. Als positiv und somit in ihrer Phagozytoseaktivität hochreguliert wurden Zellen gewertet, die mindestens 10 Beads phagozytiert hatten. Die statistische Auswertung der positiven Zellen/Gesamtzellzahl im Bildausschnitt erfolgte nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung mittels parametrischem T-Test (CO vs. hIL-6).

3.8 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 9.0 durchgeführt. Der Ergebnisse wurden zunächst mit Hilfe des Grubbs-Tests auf relevante Ausreißer überprüft. Um statistische Vergleiche zwischen allen Gruppen durchzuführen, wurden der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test bzw. die Two-Way ANOVA angewendet. Bei signifikant verändertem Kruskal-Wallis-Test oder Two-Way ANOVA, wurde für den Vergleich zweier Gruppen untereinander zu einem Zeitpunkt anschließend der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet. Bei ausreichend großer Stichprobenanzahl (siehe Phagozytoseassay, Immunhistochemie) wurden die Datensätze mittels D'Agostino-Pearson-Test zunächst auf Normalverteilung geprüft. Vergleiche zweier normalverteilter Datensätze wurden im An-

schluss mit parametrischem T-Test auf Signifikanz geprüft. Der in der Two-Way ANOVA ermittelte Row Factor beschreibt die Veränderungen über den Zeitverlauf, der Column Factor den Interventionseffekt, sprich die Veränderung durch die Stimulation mit hIL-6. Im Ergebnisteil werden diese in der Legende unter den Graphen als „Zeit“ und „Intervention“ mit entsprechend erreichten Signifikanzniveaus angegeben. Die Werte werden als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung) dargestellt. Die Signifikanz (*) wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Gene und Proteine werden gemäß der allgemeinen Nomenklatur im Kapitel „Material-und Methoden“ sowie im Kapitel „Ergebnisse“ wie folgt geschrieben: Gene werden klein geschrieben, Proteine groß. In Einleitung und Diskussion erfolgt die Schreibweise in Anlehnung an die in der Literatur am häufigsten anzutreffende.

4 Ergebnisse

4.1 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf intrazelluläre Signalkaskaden der BV-2 Zellen

4.1.1 pSTAT3

In der hIL-6-stimulierten Gruppe zeigte sich die Menge an phosphoryliertem (p)STAT3/STAT3 im Vergleich zur Kontrollgruppe an den Zeitpunkten 4h und 24h deutlich erhöht (s. Abb. 8(a), (c)). Das totale STAT3 bezogen auf GAPDH ebenso wie das phosphorylierte STAT3 bezogen auf GAPDH zeigten keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 8(b),(d)).

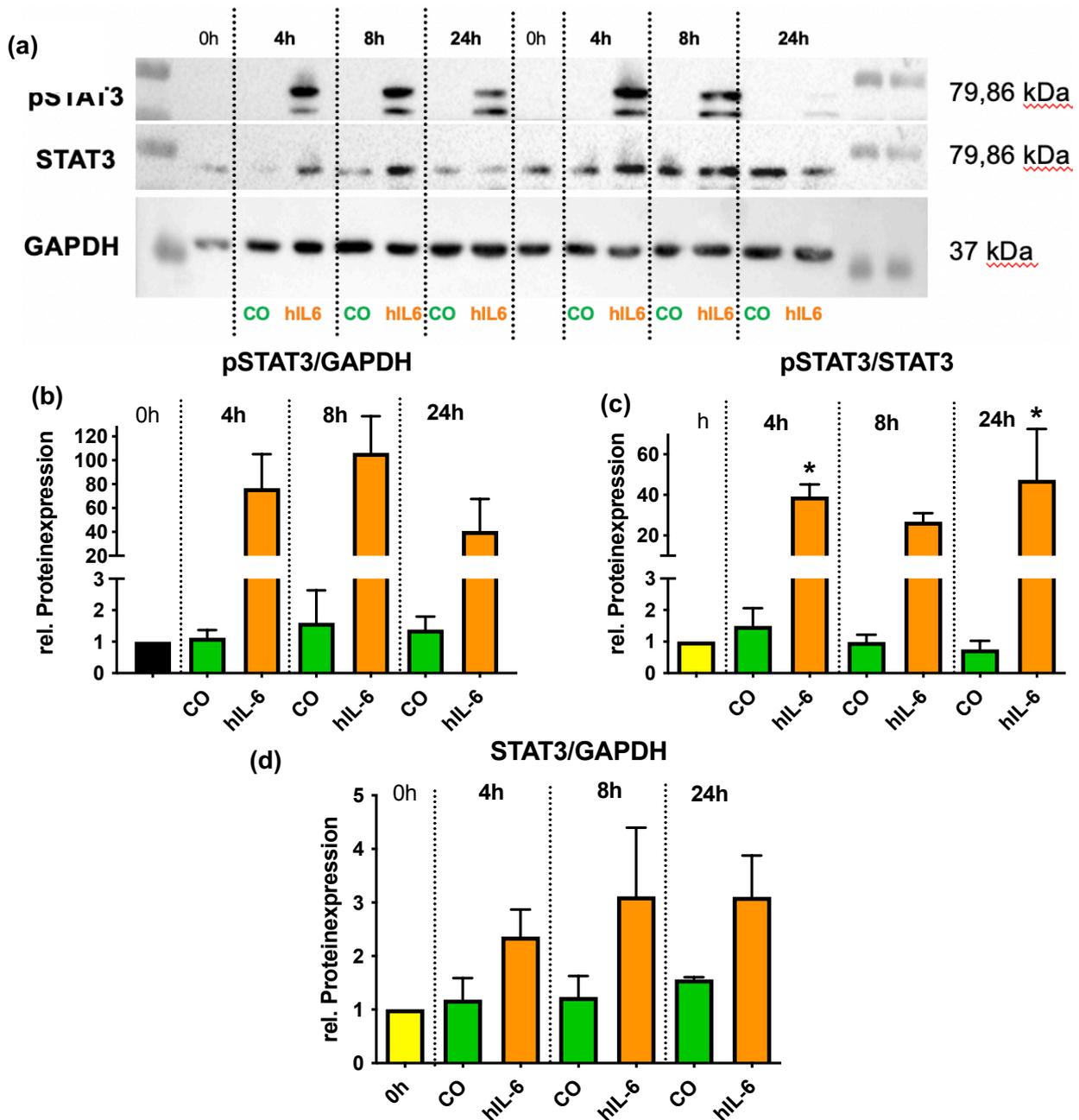


Abbildung 8: Gesamtmenge und Phosphorylierungsstatus von STAT3 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6), (a) Repräsentative Western Blot-Analyse von phosphoryliertem und totalem STAT3, (b) Relative Proteinexpression von pSTAT3/GAPDH, Kruskal-Wallis-Test: **, (c) Relative Proteinexpression von pSTAT3/STAT3, Kruskal-Wallis-Test: ** u. Mann-Whitney-U-Test: 4h*, 8h ns, 24h*, (d) Relative Proteinexpression von STAT3/GAPDH, Kruskal-Wallis-Test: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$).

Auf Genexpressionsebene zeigte sich für Socs3, einem Down-Stream Target von pSTAT3, ebenfalls eine große Erhöhung der relativen mRNA Expression in der hIL-6 stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten (4h, 8h, 24h, s. Abb. 9). Socs3 stieg im Verlauf in der hIL-6 Gruppe initial stark an (4h), fiel bei 8h ab und stieg bei 24h erneut

leicht an und zeigte nicht nur eine relevante Veränderung durch die Intervention, sondern auch über die Zeit in der Two-Way ANOVA.

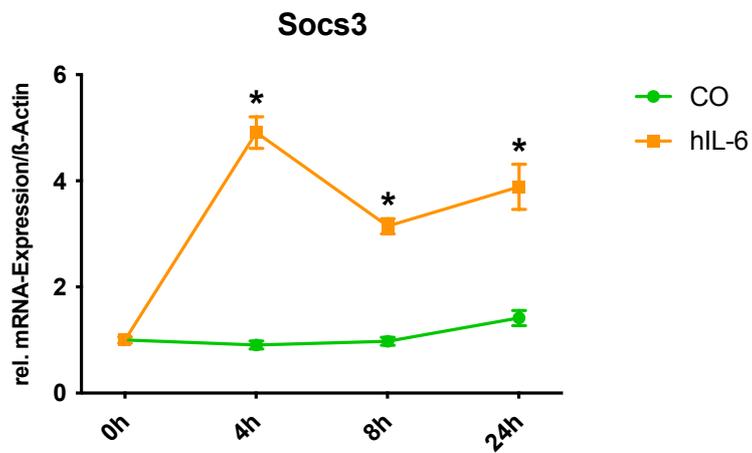


Abbildung 9: Relative mRNA-Expression von Socs3 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit **, Intervention ****, Mann-Whitney-U-Test: 4h*, 8h*, 24h* (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, *=p<0,05, ****=p<0,0001)**

4.1.2 pERK

Die Analyse der Einflüsse von Hyper-IL6 auf die phosphorylierte und unphosphorylierte Form von ERK erbrachte keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 10(d)).

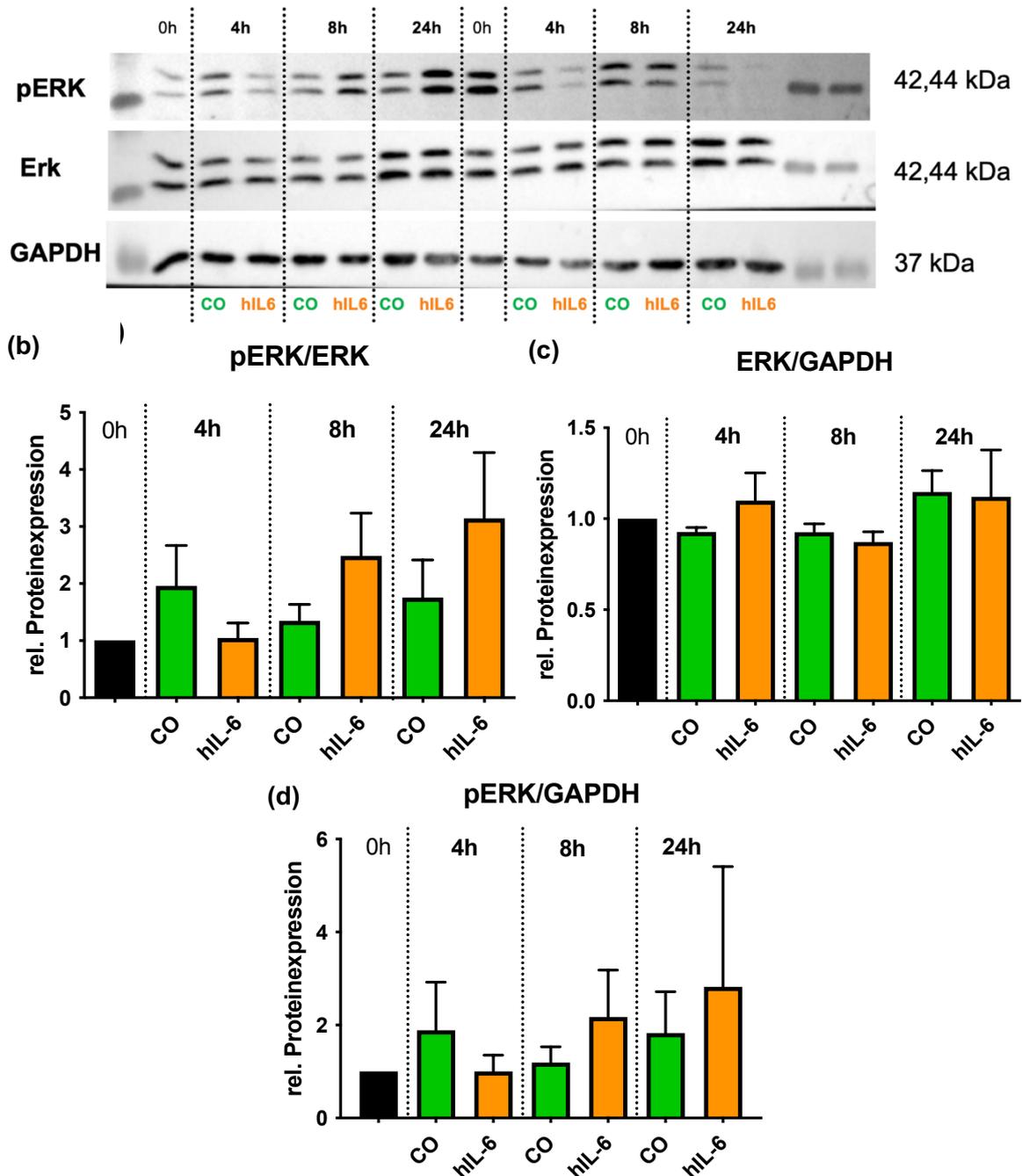


Abbildung 10: Gesamtmenge und Phosphorylierungsstatus von ERK in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6), (a) Repräsentative Western Blot-Analyse von phosphoryliertem und totalem ERK, (b) Relative Proteinexpression von pERK/ERK Kruskal-Wallis-Test: ns, (c) Relative Proteinexpression von ERK/GAPDH Kruskal-Wallis-Test: ns, (d) Relative Proteinexpression von pERK/GAPDH Kruskal-Wallis-Test: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant).

4.2 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Polarisierung von BV-2 Zellen

Es wurden verschiedene Marker für die M1-bzw. M2-Polarisation untersucht, die im Folgenden dargestellt werden (s. Einleitung 2.2.3).

4.2.1 M1-Marker

Die rel. mRNA -Expression von Il-1 β zeigte sich in der hIL-6 stimulierten Gruppe nach initialem Anstieg zum Zeitpunkt 4h deutlich erhöht in im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 11). Im Verlauf fiel die Expression ab, näherte sich dem Level der Kontrollgruppe an (8h) und sank dann unterhalb die Expressionsmenge der Kontrollgruppe (24h). Die Two-Way ANOVA dokumentiert eine deutliche Veränderung über den Zeitverlauf (s. Abb. 11).

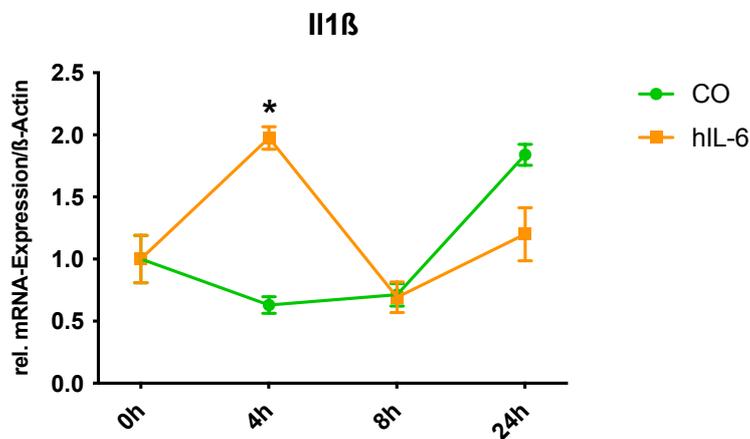


Abbildung 11: Relative mRNA-Expression von Il1 β in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit **, Intervention ns u. Mann-Whitney-U-Test: 4h*, 8h ns, 24h ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, *= $p < 0,05$, ****= $p < 0,0001$).**

In der Genexpression von Nfkb1 zeigten sich keine relevanten Veränderungen, weder durch die Intervention noch über die Zeit (s. Abb. 12).

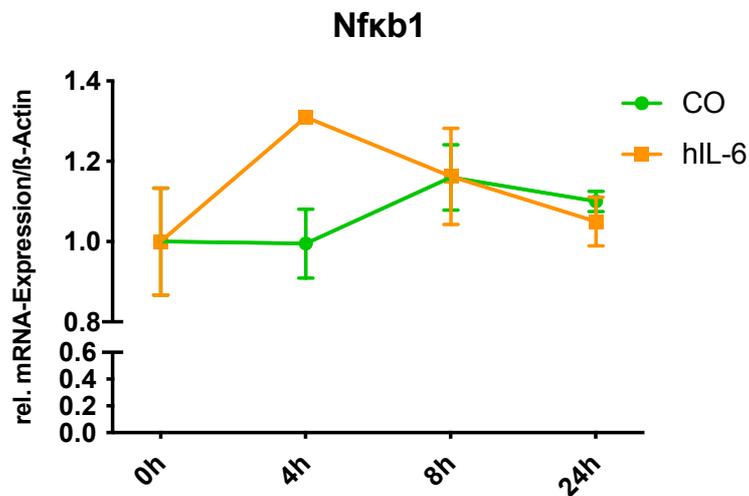


Abbildung 12: Relative mRNA-Expression von Nfkb1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant).

Die Genexpression von Tlr4 stieg im Zeitverlauf in der stimulierten Gruppe an, was auch in der Two-Way ANOVA sichtbar war, zeigte jedoch keine Veränderungen durch eine Stimulation mit hIL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 13).

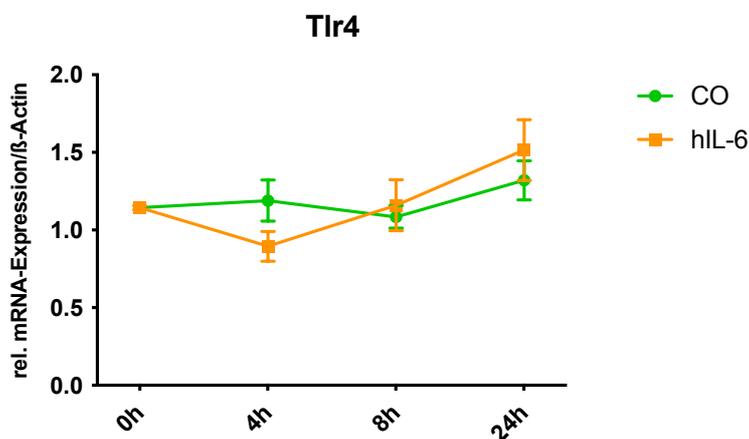


Abbildung 13: Relative mRNA-Expression von Tlr4 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit *, Intervention ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, *=p<0,05).

Die rel. mRNA-Expression von Tnfa stieg in der hIL-6 stimulierten Gruppe initial (4h) stark an. Zum Zeitpunkt 8h fiel die Expression von Tnfa in der stimulierten Gruppe wieder ab und näherte sich dem Expressionslevel der Kontrollgruppe an. Bei 24h zeigte sich erneut ein leichter Anstieg der in der hIL-6 stimulierten Gruppe, gegenüber der Kontrollgruppe. Die Tnfa mRNA

Expression war sowohl im Zeitverlauf als auch durch die Intervention in der Two-Way ANOVA stark beeinflusst (s. Abb. 14).

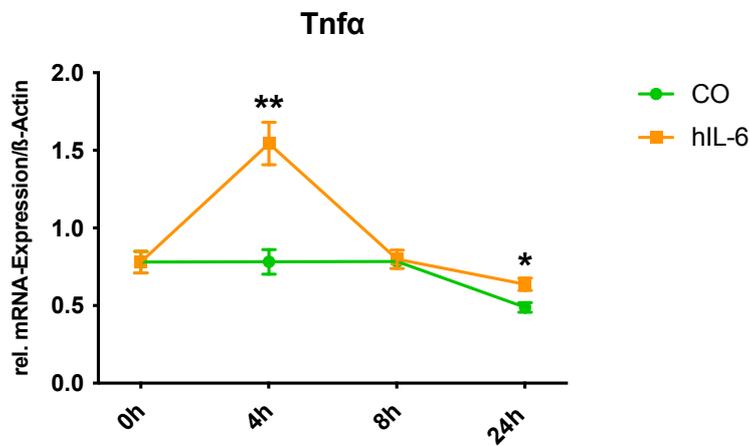


Abbildung 14: Relative mRNA-Expression von Tnfa in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit ** Intervention **** u. Mann-Whitney-U-Test: 4h**, 8h ns, 24h* (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ****= $p < 0,0001$).**

Die rel. mRNA-Expression von iNos, einem wichtigen Aktivierungsmarker für Mikroglia (Referenz) stieg initial (4h) deutlich an, fiel dann leicht ab (8h) und stieg dann im Vergleich zur Kontrollgruppe erneut deutlich an. Die Genexpression von iNos war zu allen Zeitpunkten (4h, 8h, 24h) in der hIL-6 stimulierten Gruppe deutlich erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 15). In der Two-Way ANOVA zeigte sich für den Zeitverlauf und die Intervention ebenfalls ein deutlicher Unterschied.

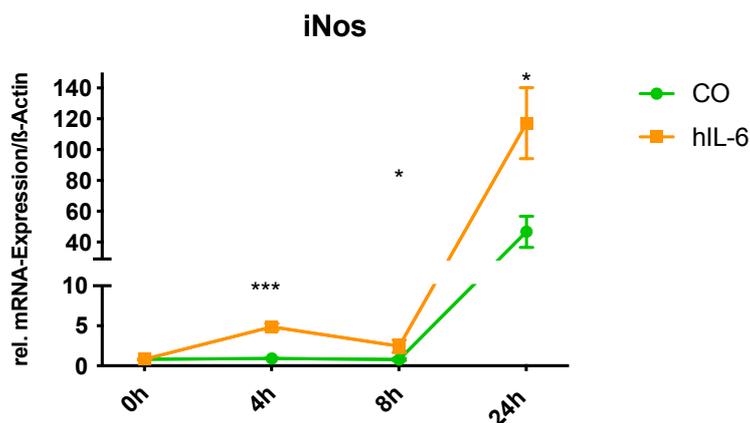


Abbildung 15: Relative mRNA-Expression von iNos in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit ** Intervention ** u. Mann-Whitney-U-Test: 4h***, 8h*, 24h* (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p = 0,001$, ****= $p < 0,0001$).**

4.2.2 M2-Marker

Die rel. mRNA Expression von Arg1 stieg über den Zeitverlauf kontinuierlich in beiden Gruppen leicht an. Die Two-Way ANOVA dokumentiert eine deutliche Veränderung über den Zeitverlauf zwischen den beiden Gruppen ergaben sich jedoch keine Unterschiede für die mRNA Expression von Arg1 durch die Stimulation mit hIL-6 (s. Abb. 16).

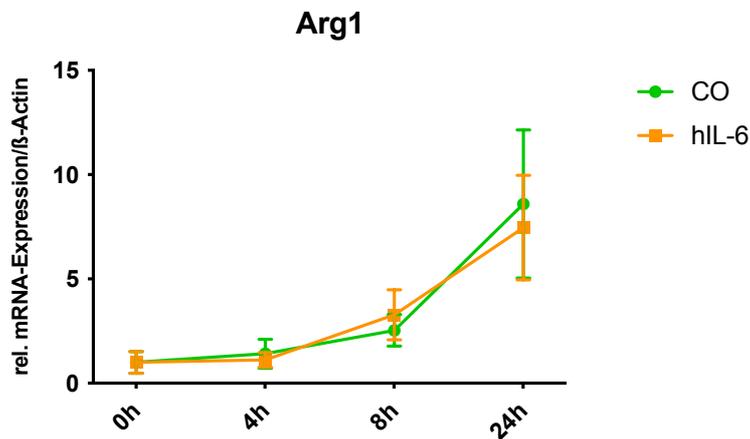


Abbildung 16: Relative mRNA-Expression von Arg1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit *, Intervention ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, ***= $p < 0,001$).**

Für die Genexpression von c-Myc ergaben sich keine signifikanten Unterschiede durch die Intervention mit hIL-6 oder über die Zeit (s. Abb. 17).

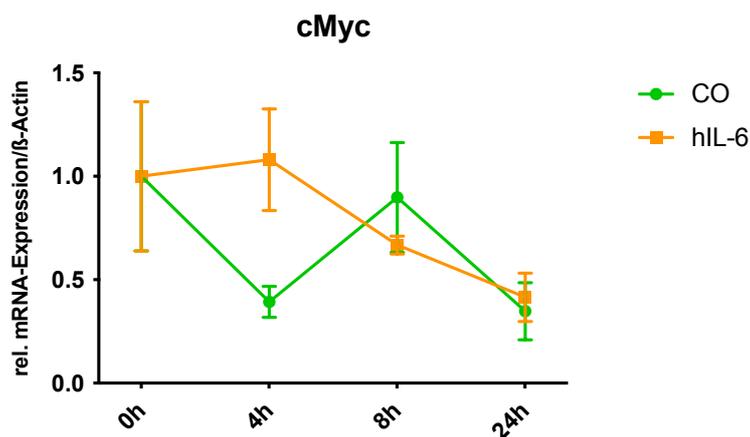


Abbildung 17: Relative mRNA-Expression von c-Myc in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant).

Die rel. mRNA-Expression von IL-4 fiel zum Zeitpunkt 4h in der stimulierten Gruppe stark ab und stieg im Verlauf (8h, 24h) erneut leicht an. Die Genexpression zeigte sich an allen Zeitpunkten in der stimulierten Gruppe reduziert verglichen mit den Expressionslevels der Kon-

trollgruppe. Zum Zeitpunkt 24h zeigte sich der größte Unterschied zwischen den Gruppen durch die Intervention (s. Abb. 18).

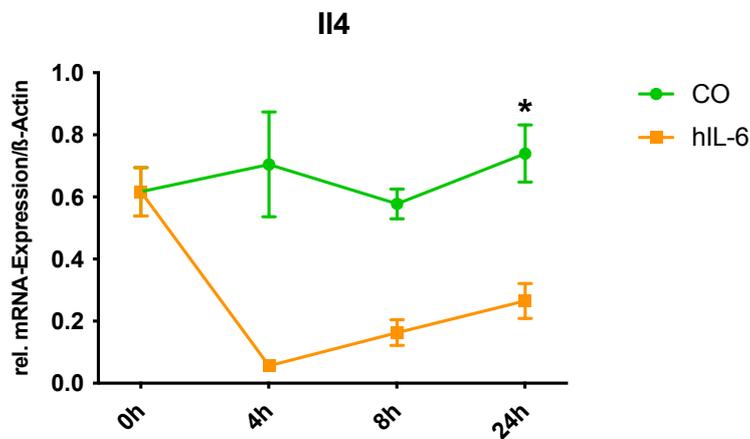


Abbildung 18: Relative mRNA-Expression von IL-4 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit ns, Intervention ****, Mann-Whitney-U-Test: 4h ns, 8h ns, 24h* (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, * $p=0,05$, **** $p<0,0001$).

Die Genexpression des IL-4-Rezeptors (IL4R) stieg zu Beginn (4h) deutlich an, erreichte bei 8h ein Plateau und fiel dann erneut ab (24h), was in der Two Way ANOVA einen $p<0.05$ für die Zeit ergab. Die Genexpression des IL4R zeigte sich an allen Zeitpunkten in der stimulierten Gruppe hochreguliert gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 19). In der Two Way ANOVA ergab sich ein statistischer Unterschied für die Intervention, welcher sich im Mann-Whitney-U T-Test nicht bestätigte (s. Abb. 19).

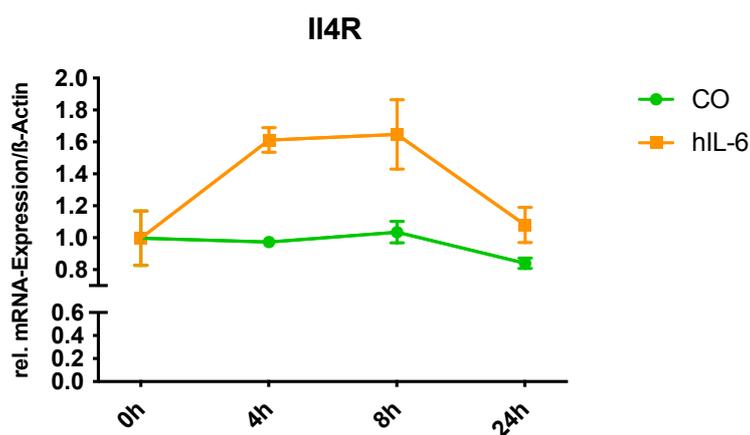


Abbildung 19: Relative mRNA-Expression von IL4R in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit *, Intervention *** (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, * $p=0,05$, ***= $p<0,001$).

Die Genexpression von Ppar γ fiel in der hIL-6 stimulierten Gruppe kontinuierlich über die Zeit ab, was sich auch in der Two-Way ANOVA abbildete. Ppar γ zeigte sich an allen Zeitpunkten in der stimulierten Gruppe deutlich herunterreguliert gegenüber den Expressionsleveln der Kontrollgruppe. Der größte Unterschied wurde zum Zeitpunkt 4h erreicht (s. Abb. 20).

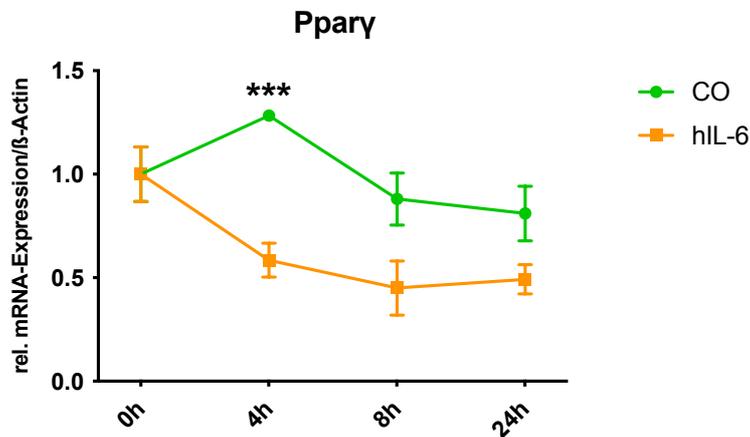


Abbildung 20: Relative mRNA-Expression von Ppar γ in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit **, Intervention *** u. Mann-Whitney-U-Test: 4h***, 8h ns, 24h ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns= nicht signifikant, ** $p < 0,01$, *** $p = 0,001$).

Die relative Proteinexpression von TGF β zeigte für die einzelnen Zeitpunkte keine statistisch relevanten Unterschiede durch die Stimulation mit hIL-6. Der P-Value Summary der Kruskal-Wallis-Analyse zeigte einen Wert $p < 0.05$ an, für die anschließenden Einzelmessungen ergaben sich keine Signifikanzen (s. Abb. 21(b)).

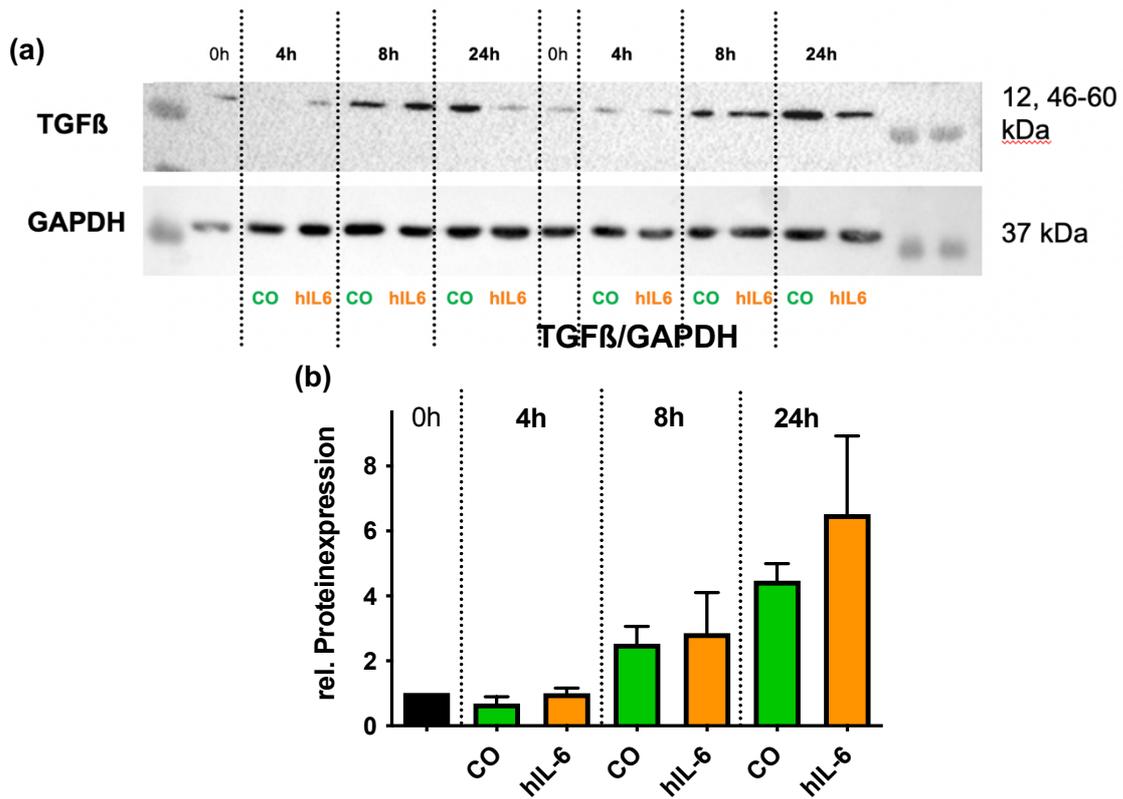


Abbildung 21: Relative Proteinexpression von TGFβ in BV-2 Zellen nach 4h, 8h und 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6), (a) Repräsentative Western Blot-Analyse von TGFβ, (b) Relative Proteinexpression von TGFβ/GAPDH, Kruskal-Wallis-Test: * (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, $*=p<0,05$).

4.3 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Synaptischen Plastizität

Die mRNA-Expression von Arc stieg in beiden Gruppen initial an (4h), fiel dann ab (8h) und stieg wieder leicht an (24h). In der Two-Way ANOVA zeigte sich eine Veränderung in der Zeit, aber keine Veränderung durch die Intervention mit hIL-6. (s. Abb. 22).

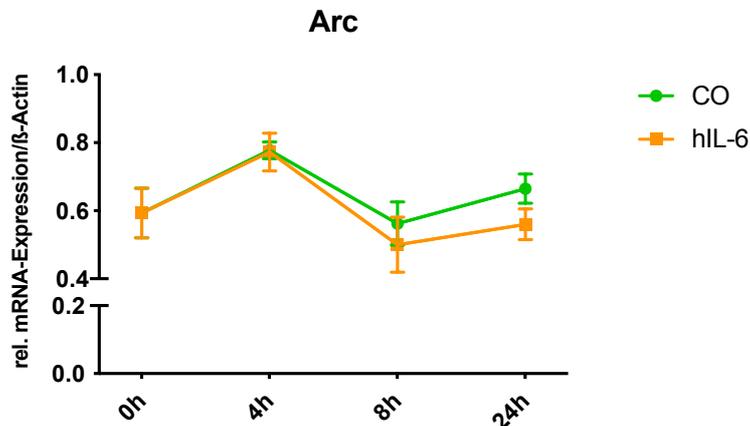


Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von Arc in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit **, Intervention ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, **= $p < 0,01$).

Die rel. mRNA Expression von Homer1a war nicht verändert (s. Abb. 23).

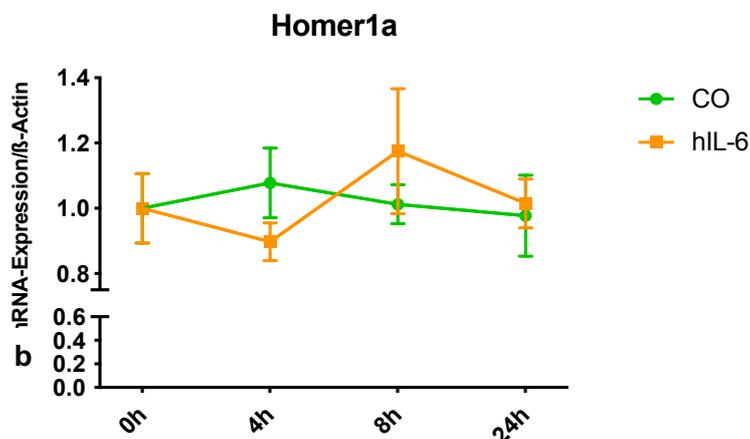


Abbildung 23: Relative mRNA-Expression von Homer1a in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant)

Die Genexpression von Cx3cr1 zeigte nach 4h einen Anstieg und fiel im Verlauf ab. Es zeigte sich zum Zeitpunkt 4h in der stimulierten Gruppe eine gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöhte Expression, die dann zum Zeitpunkt 8h und 24h unter die Genexpressionslevel der Kontrollgruppe abfiel (s. Abb. 24). In der Two-Way ANOVA zeigte sich eine statistische Veränderung über die Zeit, jedoch nicht durch die Intervention mit hIL-6.

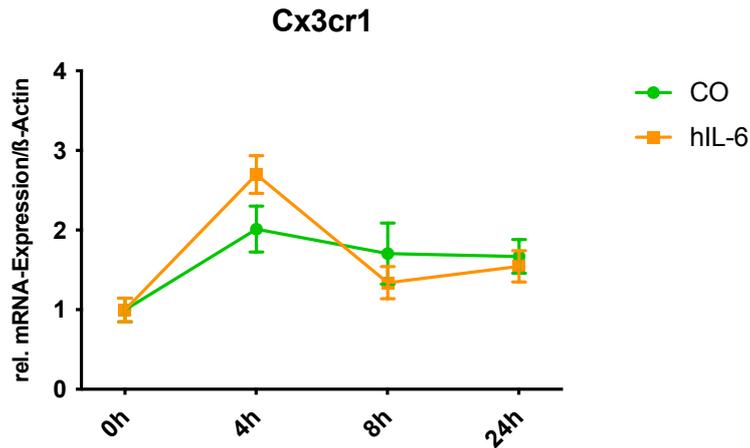


Abbildung 24: Relative mRNA-Expression von Cx3cr1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit **, Intervention ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, ****= $p < 0,001$)**

Die Genexpression von Foxo1 fiel zunächst (4h, 8h) leicht ab und stieg bis zum Zeitpunkt 24h erneut an. Das Expressionslevel von Foxo1 erwies sich zu allen Zeitpunkten in der stimulierten Gruppe herabreguliert gegenüber der Kontrollgruppe. Am Zeitpunkt 8h zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen im Mann-Whitney T-Test. In der Two-Way ANOVA zeigte sich ein Unterschied für die Zeit und die Intervention mit hIL-6 (s. Abb. 25).

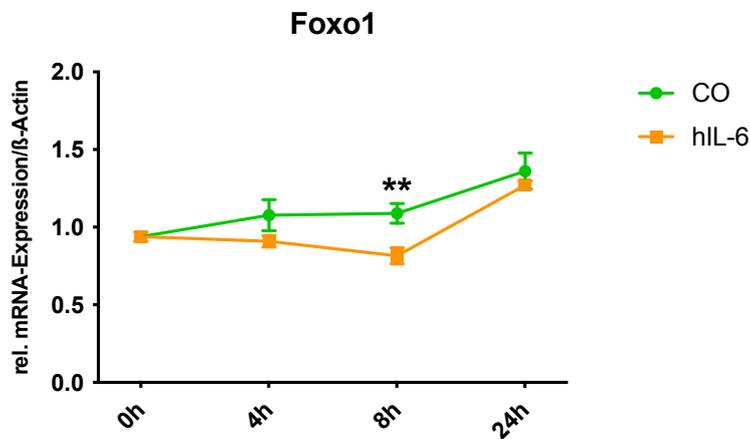


Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von Foxo1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit ** Intervention ** u. Mann-Whitney-U-Test 4h ns, 8h**, 24h ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, **= $p < 0,01$, ****= $p < 0,0001$).**

Die Genexpression von c-Fos stieg initial (4h) stark an und fiel im Verlauf (8h, 24h) deutlich ab. Die Expression von c-Fos erwies sich zu allen Zeitpunkten in der stimulierten Gruppe als deutlich heraufreguliert gegenüber der Kontrollgruppe. In der Two-Way ANOVA zeigte sich eine statistisch relevante Veränderung für den Zeitverlauf und für die Intervention mit hIL-6 (s. Abb. 26).

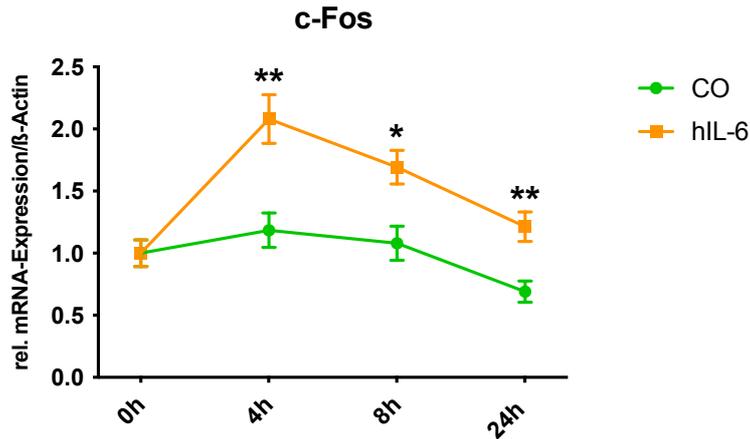


Abbildung 26: Relative mRNA-Expression von c-Fos in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit **** Intervention **** u. Mann-Whitney-U-Test: 4h**, 8h*, 24h** (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, *=p<0,05, **=p<0,01, ****=p<0,0001).

Die mRNA Expression Egr1 war zu allen Zeitpunkten in der stimulierten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe herunterreguliert. Zu den Zeitpunkten 8h und 24h zeigten sich große Unterschiede zwischen hIL-6-stimulierter Gruppe und Kontrollgruppe (s. Abb. 27). Die Genexpression beider Gruppen, fiel bei 24h im Vergleich zu 8h deutlich ab. In der Two-Way ANOVA zeigte sich eine statistisch relevante Veränderung für den Zeitverlauf und für die Intervention mit hIL-6.

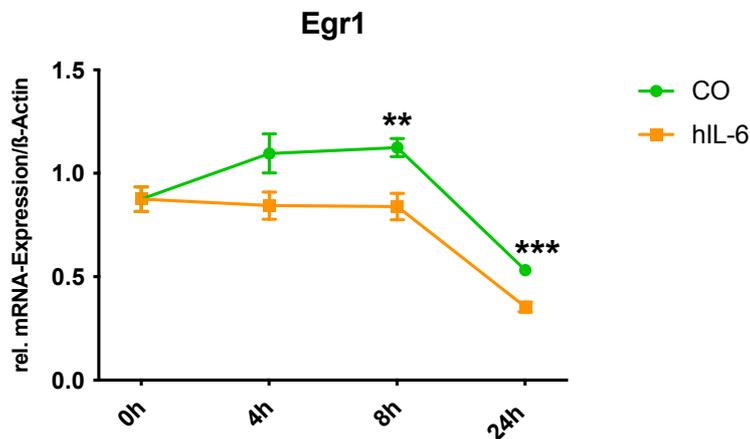


Abbildung 27: Relative mRNA-Expression von Egr1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: Zeit **** Intervention **** u. Mann-Whitney-U-Test: 4h ns, 8h**, 24h*** (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns= nicht signifikant, **=p<0,01, ***=p<0,001, ****=p<0,0001).

In der Proteinexpression von vGLUT2 zeigte sich die P-Value Summary im Kruskal-Wallis Test mit p<0.05 verändert. In den anschließenden Einzelmessungen mittels Mann-Whitney Test für

die jeweiligen Zeitpunkte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede durch die IL-6 Stimulation (s. Abb. 28 (b)).

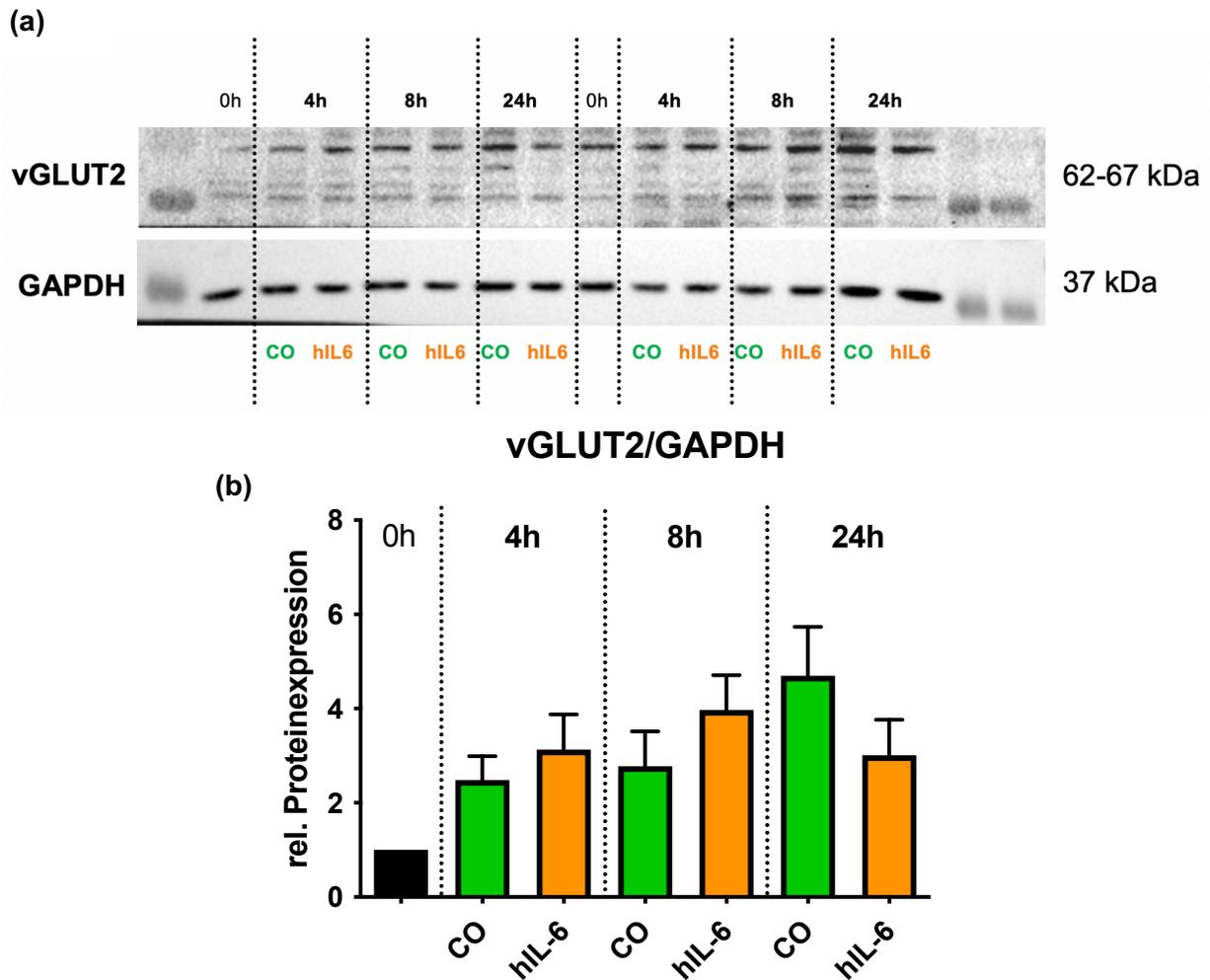


Abbildung 28: Relative Proteinexpression von vGLUT2 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h und 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6), (a) Repräsentative Western Blot-Analyse von vGLUT2, (b) Relative Proteinexpression von vGLUT2/GAPDH, Kruskal-Wallis-Test: * (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, $*=p<0,05$).

4.4 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Extrazellulären Matrix

Die Genexpression von Mmp9 stieg in der hIL-6 stimulierten Gruppe initial (4h) stark an und fiel im Zeitverlauf (8h, 24h) ab. Mmp9 erwies sich zum Zeitpunkt 4h als relevant erhöht in der hIL-6 stimulierten Gruppe. Im Zeitverlauf nahm die Genexpression ab und näherte sich an den Zeitpunkten 8h und 24 dem Expressionslevel der Kontrollgruppe an. In der Two-Way Analyse ergaben sich ein $p < 0.001$ für die Zeit und die Intervention mit hIL-6. (s. Abb. 29).

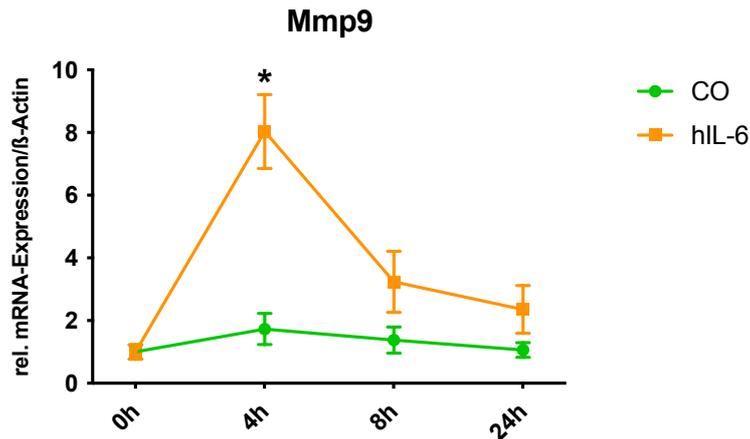


Abbildung 29: Relative mRNA-Expression von Mmp9 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6). Two-Way ANOVA: Zeit **** Intervention **** u. Mann-Whitney-U-Test: 4h*, 8h ns, 24h ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, * $p < 0,05$, ****= $p < 0,0001$).

Die Genexpression von Timp1 zeigte sich am Zeitpunkt 4h deutlich erhöht in der hIL-6 stimulierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Im Verlauf nahm die Genexpression ab und näherte sich an den Zeitpunkten 8h und 24 dem Expressionslevel der Kontrollgruppe an (s. Abb. 30(a)).

Die Genexpression von Timp2 wies zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen stimulierter Gruppe und Kontrollgruppe auf (s. Abb. 30(b)).

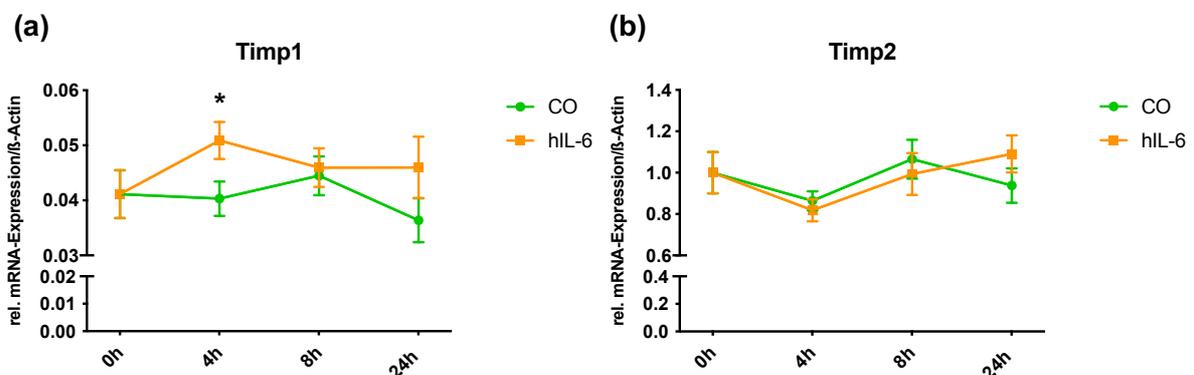


Abbildung 30: Relative mRNA-Expression von (a) Timp1 und (b) Timp2 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, * $p < 0,05$).

Die Genexpression von Syndecan1 und Syndecan3 zeigte zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der stimulierten und nicht stimulierten Gruppe (s. Abb. 31(a), 31(b)).

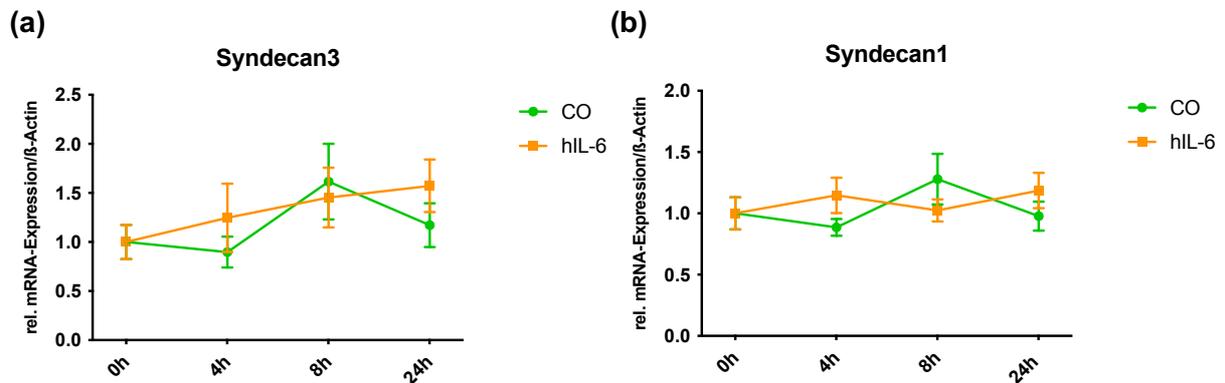


Abbildung 31: Relative mRNA-Expression von (a) Syndecan1 und (b) Syndecan3 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant).

Die Genexpression von TenascinR zeigte keinen relevanten Unterschied in der hIL-6 stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 32).

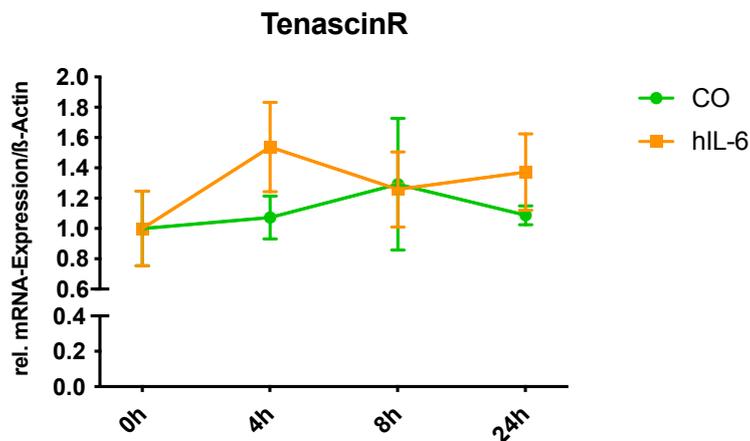


Abbildung 32: Relative mRNA-Expression von TenascinR in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6) Two-Way ANOVA: ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant).

4.5 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Aktivität von BV-2 Zellen

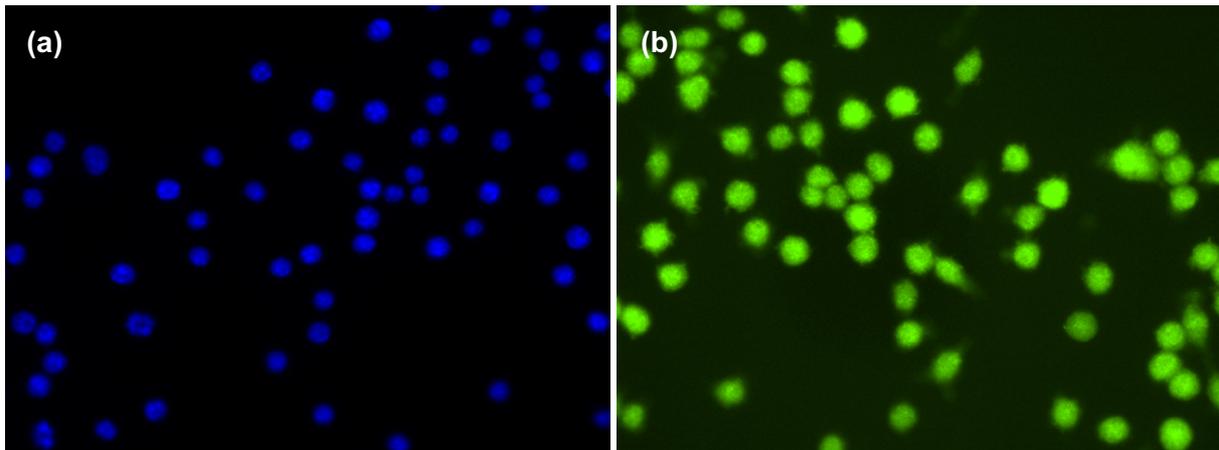


Abbildung 33: Immunhistochemische Intensitätsmessung: (a) BV-2 Zellen Visualisierung der Zellkerne DAPI-Färbung (blau) in 40x-Vergrößerung, (b) BV-2 Zellen IBA1-Färbung (grün) in 40x-Vergrößerung

Die Intensitätsmessung der IBA1-Färbung ergab eine deutlich reduzierte Intensität in der hIL-6 stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Intensität stieg initial (4h, 8h) an und fiel bis 24h deutlich ab (s. Abb. 34(a)) und zeigte in der Two-Way ANOVA eine Veränderung in Zeit und Intervention. Die IBA1 Intensitätsmessung bezogen auf die Fläche und die Zellzahl ergab keinen Unterschied. Nur im Zeitverlauf ergab sich für beide Gruppen eine Abnahme der Intensitätsmessung, was in der Two-Way ANOVA sichtbar wurde (s. Abb. 34(b)).

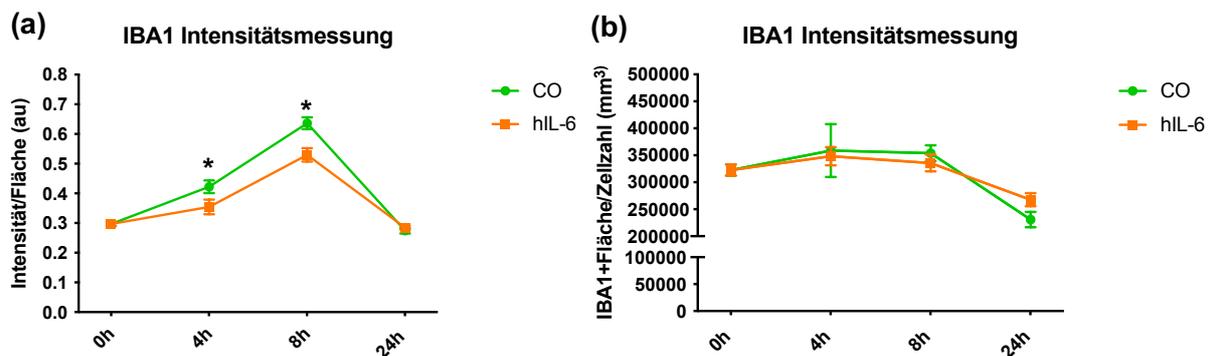


Abbildung 34: IBA1-Intensitätsmessung als Maß der Aktivierung der BV-2 Mikrogliazellen. (a) Intensität/Fläche (au) 2-Way-ANOVA: Zeit **** Intervention **, Mann-Whitney-U-Test: 4h*, 8h*, 24h ns, (b) IBA1 positive Fläche/Zellzahl (mm^3) 2-Way-ANOVA: Zeit **, Intervention ns (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ****= $p < 0,0001$)

4.6 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Morphologie von BV-2 Zellen

Das Zytoskelett übernimmt vielfältige Aufgaben und bedarf daher der Fähigkeit einer ständigen dynamischen Anpassung. Auch die Morphologie der Mikrogliazellen ändert sich mit ihren unterschiedlichen Aktivierungszuständen.¹⁴⁷ Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Einteilung in ruhende, ramifizierte und aktivierte, amöboide Zellkörper in der Literatur weit verbreitet (s. Abb. 2). Während den ramifizierten Mikrogliazellen eine insgesamt eher neuroprotektive Funktion der Überwachung und Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS und dessen Integrität zugeschrieben wird, kann der amöboide, aktivierte Phänotyp wie bereits erwähnt in unterschiedliche Subtypen mit pro-oder antiinflammatorischen Wirkprofil eingeteilt werden.¹⁴⁸

Die Anfärbungen mit Phalloidin und IBA1 mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie dienten der genaueren Darstellung des Zytoskletts und möglicher Morphologieänderungen der BV-2 Zellen unter hIL-6-Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.6.1 Fortsatzlänge und Fortsatzanzahl

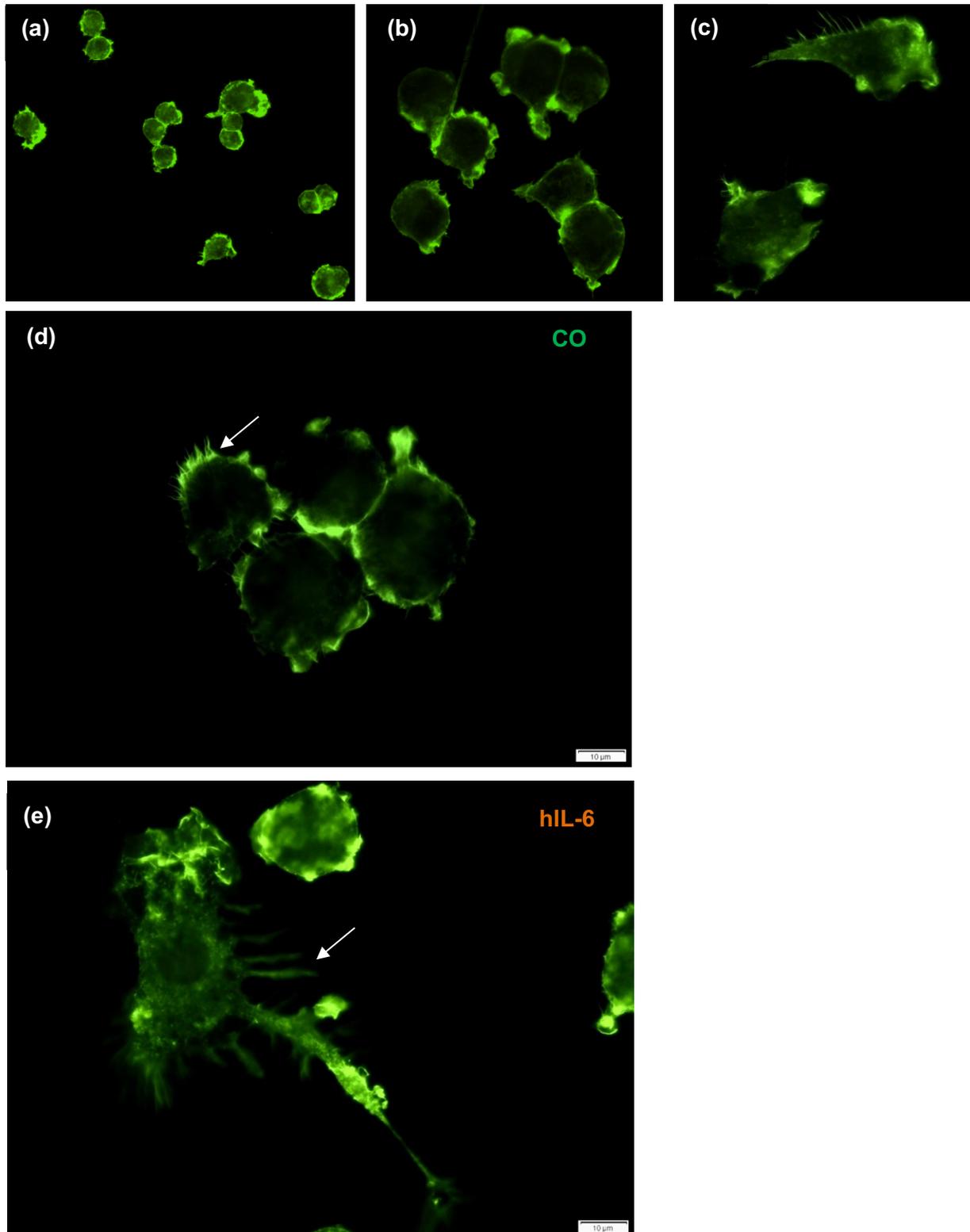


Abbildung 35: Effekt von hIL-6 auf die Ramifizierung (weiße Pfeile) von BV-2 Zellen nach 24h Inkubation mit hIL-6. (a) Anfärbung der Aktinfilamente mit Phalloidin-Färbung, Übersichtsaufnahme in 40x-Vergrößerung, (b, c) Phalloidin-Färbung 100x-Vergrößerung, (d) repräsentative IBA1-Färbung 100x-Vergrößerung 24h CO, (e) repr. IBA1-Färbung 100x-Vergrößerung 24h hIL-6. Der Skalierungsbalken repräsentiert eine Länge von 10 μm (CO=Kontrollgruppe, hIL-6= stimulierte Gruppe).

Die Gesamtfortsatzlänge pro Zelle fiel bei 4h in beiden Gruppen zunächst ab und stieg bis zum Zeitpunkt 8h erneut an. Nach 24-stündiger Inkubation war die Fortsatzlänge in der hIL-6 Gruppe relevant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, sowohl die Gesamtfortsatzlänge pro Zelle als auch pro Anzahl der Fortsätze (s. Abb. 36(a), (b)). In der Kontrollgruppe zeigte sich ein deutlicher Abfall der Gesamtfortsatzlänge pro Zelle bei 24h, was ebenfalls Grund für die erreichte statistische Signifikanz sein kann.

Die Anzahl der Fortsätze (siehe Abb. 36 (c)) zeigte bei 4 und 8h keine Unterschiede. Während die Fortsatzanzahl nach 4h und 8h in beiden Gruppen ähnliche Ausprägung hatten, fiel nach einer längeren Inkubation (24h) mit hIL-6 eine deutlich erhöhte Fortsatzanzahl gegenüber der Kontrollgruppe auf.

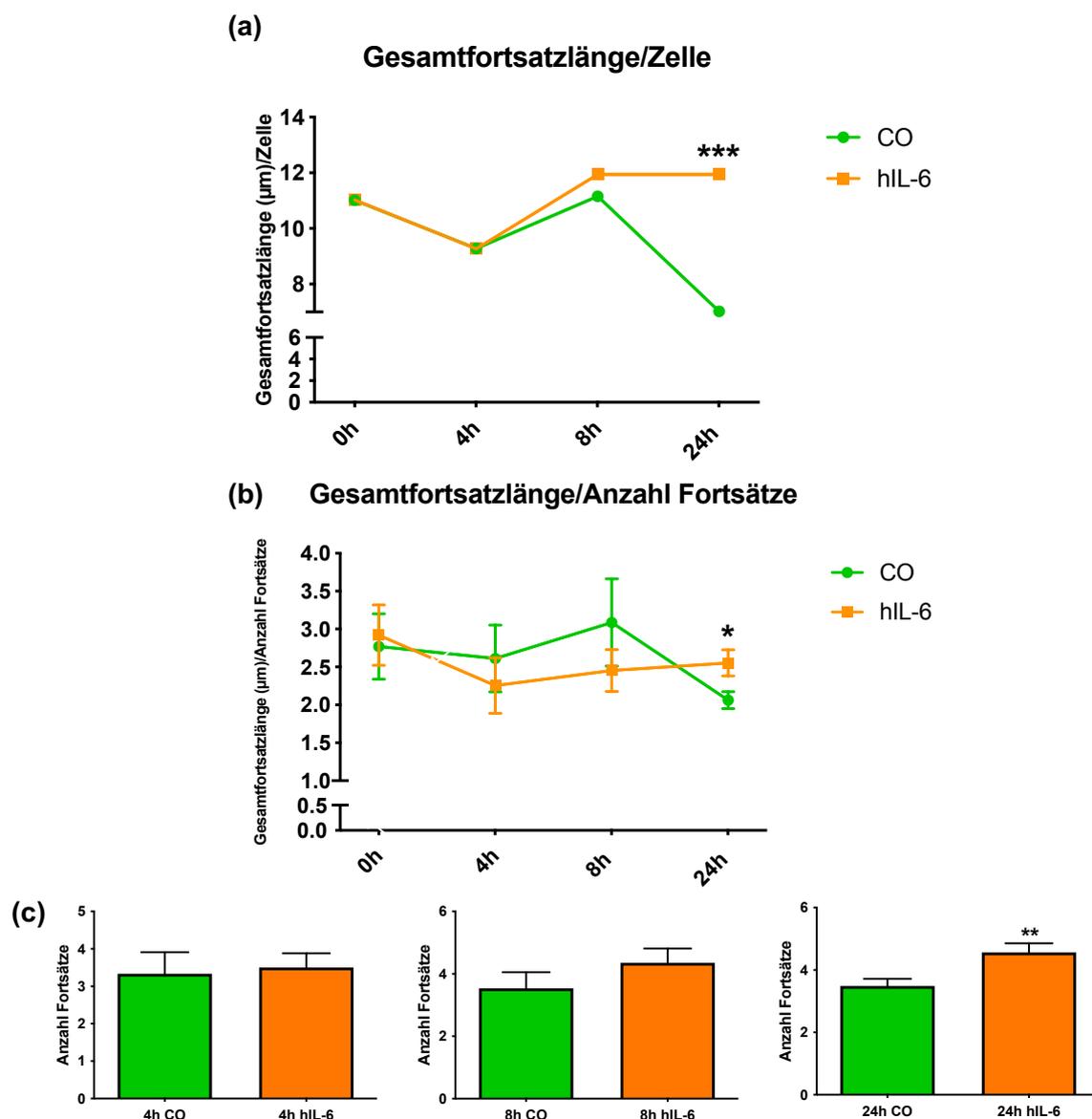


Abbildung 36: Ramifizierung von BV-2 Zellen unter hIL-6-Stimulation vs. Kontrollgruppe:
 (a) Two-Way ANOVA Gesamtfortsatzlänge (µm)/Zelle: ns u. Mann-Whitney-U-Test nach 4h, ns, 8h ns, 24h***, (b) Two-Way ANOVA Gesamtfortsatzlänge (µm)/Anzahl Fortsätze: ns u. Mann-Whitney-U-Test nach 4h ns, 8h ns, 24h*, (c) Mann-Whitney-U-Test Anzahl Fortsätze nach 4h ns, 8h ns, 24h**, (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, ns=nicht signifikant, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001)

4.7 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Phagozytoseaktivität von BV-2 Zellen

Die Phagozytoseaktivität wurde mittels der Aufnahme von blau gefärbten Beads über eine Zeitspanne von 6 Stunden gemessen. Als positive Zellen gelten Zellen, die mit mehr als 10 Beads gefüllt sind.

Die Partikelaufnahme (Phagozytoseaktivität) erwies sich in der hIL-6 stimulierten Gruppe als signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 37(a), (b) und Abb. 38).

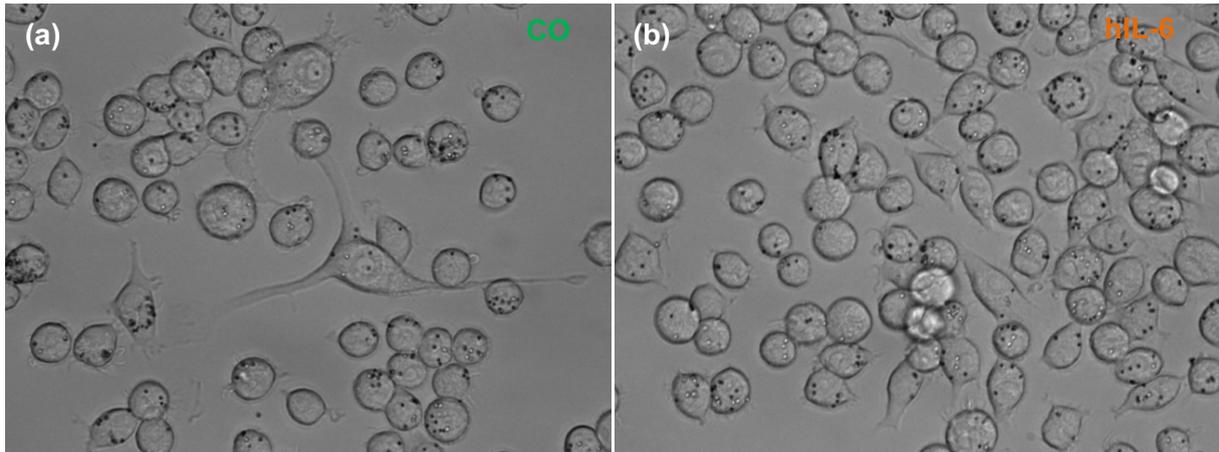


Abbildung 37: Effekte von hIL-6 auf das Phagozytoseverhalten von BV-2 Mikrogliazellen. Deutlich reduzierte Partikelaufnahme in der hIL-6 stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. (a) Kontrollgruppe 40x-Vergrößerung (b) hIL-6 stimulierten Gruppe 40x-Vergrößerung. (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe)

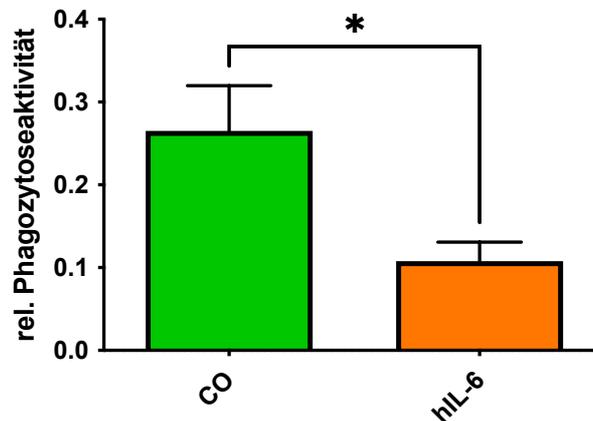


Abbildung 38: Phagozytoseaktivität von BV-2 Zellen unter hIL-6-Stimulation vs., Kontrollgruppe: Positive Zellen entsprechen Zellen, die mit mehr als 10 Beads gefüllt sind. Parametrischer T-Test Positive Zellen/Anzahl Zellen im Gesichtsfeld: *, (CO=Kontrollgruppe, hIL-6=stimulierte Gruppe, $*=p<0,05$)

5 Diskussion

5.1 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf intrazelluläre Signalkaskaden der BV-2 Zellen

Welche Zellen ursächlich für die chronische Inflammation im Hypothalamus sind, welche Faktoren zur Gliogenese führen und welche Zellen und Signalwege an deren Entstehung beteiligt sind, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Es wurde bereits gezeigt, dass Neuronen und Astrozyten gut auf hIL-6, nicht aber auf IL-6 allein reagieren, was darauf schließen lässt, dass das Trans-Signaling für die Vermittlung der IL-6-Effekte in diesen Zellen entscheidend ist.^{149,150} Mikrogliazellen hingegen reagieren auch über den klassischen Signalweg gut auf IL-6. Bisher ist in der Literatur wenig beschrieben, wie genau sich das durch hIL-6 induzierte Trans-Signaling auf BV-2 Mikrogliazellen auswirkt. Zwar zeigten Lin und Levison, dass kultivierte Mikroglia auch auf IL-6 allein mit einer robusten STAT3-Aktivierung reagieren können, die Modulation bestimmter Antworten jedoch den sIL-6R erfordert und daher Trans-Signaling vermittelt ist.¹⁵¹ Dies unterstreicht die Komplexität der mikroglialen Antwort auf IL-6 und legt die Annahme nahe, dass ein und dieselbe Zelle unterschiedlich auf das klassische bzw. auf das Trans-Signaling reagiert.³⁰ Insgesamt können wir im vorliegenden Forschungsprojekt zahlreiche Effekte in den BV-2 Zellen als Reaktion auf das hIL-6 feststellen, die im Folgenden dargelegt werden sollen. In der hier vorliegenden Dissertation zeigte sich, dass die mit hIL-6 stimulierten Zellen zum Teil Anzeichen einer M1-Polarisierung mit vornehmlich proinflammatorischem Wirkprofil bei jedoch gleichzeitiger gegenregulatorischer Heraufregulierung einiger antiinflammatorischer Marker im Zeitverlauf aufwiesen. Unter hIL-6 Stimulation zeigte sich zudem eine tendenzielle Herabregulation wichtiger Marker der synaptischen Plastizität in den BV-2 Zellen sowie eine Heraufregulation von Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), einem Marker der Degradierung der Extrazellulären Matrix (EZM). Auch zeigte sich in der hIL-6 stimulierten Gruppe eine herabgesetzte Phagozytoseleistung. Im Hinblick auf die Ramifizierung der Mikroglia zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen der stimulierten und der nicht stimulierten Gruppe, was im Folgenden diskutiert wird.

Anhand des durchgeführten Experiments kann auf Proteinexpressionsebene mittels Western Blot ein „Proof of Concept“ erfolgen: Eine Stimulation mit hIL-6 führt über das Trans-Signaling zur vermehrten Aktivierung des STAT3-Signalweges in BV-2 Zellen (siehe S. 63 Abb. 8(a-d)). Zudem ist SOCS3 als Downstream-Parameter und Regulator des negativen Feedback der STAT3-Signalkaskade zu allen Zeitpunkten in der stimulierten Gruppe deutlich hochreguliert (s. s. 64 Abb. 9).¹³¹ Es ist mehrfach beschrieben, dass STAT3 eine entscheidende Rolle bei der Gliogenese im ZNS spielt. Gu et al zeigten, dass die Inhibition von STAT3 in vitro direkt die Neurogenese induziert und die Astroglialgenese in neuralen Stammzellen hemmt.¹⁵² Im Mausmodell zeigten Mäuse mit systemischer Produktion von humanem IL-6/sIL-6R, nicht aber

von IL-6 allein, neurologische Symptome in Verbindung mit der Entwicklung von Gliose im ZNS.¹⁵³ Auch wird eine vermehrte Aktivierung von STAT3 mit der Entstehung von Depression im Mausmodell in Verbindung gebracht.¹⁵⁴ Unsere Ergebnisse deuten auf eine Induktion der Gliogenese durch hIL-6 aufgrund einer Aktivierung des STAT3-Signalwegs hin.¹⁵² Durch Gliose kommt es zur Beeinträchtigung der Funktion und Plastizität neuronaler Netzwerke. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele, in denen durch proinflammatorische Stimuli aktivierte Mikroglia die Neurogenese hemmt.¹⁵⁵ Zunehmend mehr Studien zeigen jedoch auch, dass aktivierte Mikroglia für die Neurogenese von Vorteil sein kann.^{156,157}

Die Variabilität der Auswirkung der Mikroglia auf die Neurogenese könnte zum einen von der unterschiedlichen Polarisierung der Mikroglia, zum anderen aber auch vom Stimulus allein abhängen.⁶³ Auch hat sich gezeigt, dass die Funktionen von STAT3 zeitabhängig sind. In sehr frühen Stadien trägt STAT3 entscheidend zur Gliogenese bei, während es in späteren Stadien das neuronale Überleben unterstützt.¹⁵⁸ Da unser Versuchsmodell nur kurzfristige Effekte zeigt, kann über die Folgen der Langzeitaktivierung von STAT3 keine Aussage getroffen werden. In der Literatur werden zudem die zytoplasmatischen und nukleären Funktionen von STAT3 unabhängig voneinander gesehen.¹²⁰ Zwar wird IL-6, insbesondere das Trans-Signaling, vermehrt mit Gliogenese und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht, jedoch gibt es auch Studien, die darauf hinweisen, dass hIL-6 und das Trans-Signaling ebenso regenerative und neurotrophe Effekte haben kann.¹²⁰ So konnten Islam et al. feststellen, dass es neben der Gliogenese verschiedener Gliazellen auch zur Hochregulierung verschiedener neuronaler Subtypen kam. Eine Studie zu vollständigem Querschnitt am Mausmodell zeigte kürzlich eine funktionelle Erholung nach einmaliger hIL-6-Applikation in den sensorischen Kortex.¹⁵⁹ In diesem Zusammenhang ist das hIL-6 eher als allgemeiner Differenzierungsfaktor anzusehen, der die Neuro- und Gliogenese vermittelt. Der sIL-6-Rezeptor könnte als zentraler Regulator von Regenerationsprozessen fungieren. Beide Prozesse scheinen durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege abzulaufen. Während die Neurogenese über den MAPK/CREB-Signalweg vermittelt wird, induziert der STAT3-Signalweg die Gliogenese.¹⁵² Die Aktivierung des STAT3-Pathways kann als eine Art sich selbst verstärkender Prozess gesehen werden, da konsekutiv auch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α eine STAT3-Aktivierung bewirken und so die Zytokin-vermittelte Astrogliogenese induzieren.¹⁶⁰ Eine Kombination von hIL-6- und einer pSTAT3-Blockade könnte in diesem Fall als therapeutischer Ansatz dienen.¹²⁰ In der Literatur finden sich außerdem Ansätze, in denen eine lösliche Form des gp130-Proteins den Komplex aus IL-6/sIL-6R unter physiologischen Bedingungen bindet und damit selektiv das Trans-Signaling blockiert. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte hierdurch gezeigt werden, dass das Trans-Signaling maßgeblich an der Aufrechterhaltung proinflammatorischer Prozesse in Mikroglia und Neuronen beteiligt ist. Auch das könnte ein therapeutisches Target darstellen.¹⁶¹ Bei der Gliogenese handelt es sich um einen

multizellulären Prozess, an dem eine Vielzahl verschiedener Zellen, Botenstoffe und Signalwege beteiligt sind. Die Effekte, die IL-6 zugeschrieben werden, sind vermutlich auch durch Koexpression anderer proinflammatorischer Faktoren bestimmt. Zudem ist zu vermuten, dass auch der Zeitpunkt der Exposition während der Entwicklung von Relevanz ist.¹³⁴ In der Literatur finden sich deutliche regionale Unterschiede in der Wirkung von IL-6 auf das ZNS.¹⁶² Dies unterstreicht, dass es nicht möglich ist, IL-6 nur positive bzw. nur negative Eigenschaften im ZNS zuzuweisen. Vielmehr übt IL-6 je nach Gewebe, Entwicklungszustand, Einwirkungsdauer und Kofaktoren in der Umgebung sehr unterschiedliche Einflüsse aus.²⁹

Im Gegensatz zu einem normal funktionierenden ZNS, in dem Neuronen und Mikroglia und Astrozyten in einer symbiotischen Beziehung miteinander stehen, gehen Mikroglia und Astrozyten durch einen Zustand chronischer Entzündung von einem basalen in einen reaktiven Zustand über, in dem sie die Neuronen nicht mehr schützen, sondern sie schädigen.¹⁶³ Diät-induzierte Entzündungen im Hypothalamus sind durch eine Ansammlung von Astrozyten und aktivierter Mikroglia gekennzeichnet. Bisher ist unklar, wer die Entzündung vorrangig unterhält. Es gibt Hinweise darauf, dass der Cross-Talk zwischen Mikroglia und Astrozyten die Entzündungsreaktion verstärkt und die Produktion neurotoxischer Faktoren synergistisch erhöht.¹⁶⁴ Ob den Astrozyten im Prozess der chronischen Inflammation ähnlich pleiotrope Funktionen wie den Mikrogliazellen zukommen, ist bislang nicht vollends geklärt.²⁹ Es gibt Studien, die zeigen, dass Astrozyten eine neuroprotektive Rolle ausüben, indem sie die Aktivität von Mikrogliazellen vermindern.^{165,166} Beispielsweise konnte die Induktion von NO durch die Anwesenheit von Astrozyten in gemischter Gliakultur verhindert werden. Der Crosstalk zwischen den verschiedenen Zellpopulationen und den ausgeschütteten Mediatoren bestimmt, ob das Ergebnis mikroglialer Aktivierung neuroprotektiv oder neurotoxisch ist.¹⁶⁷ Werden Mikrogliazellen auf Astrozyten-Monolayern kultiviert, verästeln sie sich und zeigen eine große morphologische Ähnlichkeit mit überwachender Mikroglia. Somit beeinflusst die Zugabe von Astrozyten zur kultivierten Mikroglia deren Morphologie und vermutlich auch deren Funktion erheblich.⁹² Dieser Aspekt ist in der hier untersuchten Reinkultur nicht abbildbar. Ebenso wie die Rolle von hIL-6 muss auch die Gliogenese differenziert betrachtet werden. Neben den zahlreichen erwähnten schädlichen Folgen der Gliogenese im Rahmen von Neurodegeneration und neuronaler Plastizität hat diese auch eine relevante physiologische Funktion im Sinne der Verhinderung der Ausbreitung einer lokalen Infektion, Reparatur von Gewebsschäden und letztendlich der Wiederherstellung der Homöostase.²⁹ Obwohl die Jak/STAT3-Pathways eine bedeutende Rolle in der Zytokin-Aktivierung spielen, aktiviert jedes Zytokin auch zahlreiche andere Signalwege. Somit weist die isolierte Betrachtung eines Signalwegs Schwierigkeiten auf. Da Jak und STAT3 nicht nur durch IL-6-Stimulation, sondern auch als Reaktion auf andere pro- und antiinflammatorische Zytokine aktiviert werden, benötigt es genauere Kenntnis über die STAT-abhängigen, aber auch die STAT-unabhängigen IL-6-Signalwege und deren Inter-

ferenzpunkte. Statt einer isolierten Betrachtung wäre zukünftig vielmehr eine Betrachtung des Crosstalks zwischen einerseits verschiedenen Signalwegen, die durch eine Kombination von Zytokinen aktiviert werden, und andererseits des Crosstalks zwischen Signalwegen, die von einem einzelnen und selben Zytokin initiiert werden, notwendig.¹⁶⁸ Bei pERK, ebenfalls einem relevanten Signalweg für die proinflammatorischen Effekte von IL-6,¹⁶⁹ zeigten sich keine relevanten Veränderungen in der hier vorliegenden Studie, lediglich eine leichte Erhöhung in der stimulierten Gruppe nach 8h und 24h (s. S. 64 Abb. 10(a-d)). Obwohl es erwiesen ist, dass erhöhte IL-6-Spiegel bei der Mutter eine entscheidende Rolle für die neurokognitive Entwicklung des Kindes spielen,^{170,171} bleiben spezifische Wirkungen von IL-6 auf das sich entwickelnde Gehirn offen oder gar kontrovers: So zeigte eine Studie am Mausmodell, dass eine subdurale Injektion von IL-6 am postnatalen Tag 4 weder kurz- noch langfristig zu neuroinflammatorischen Reaktionen führte.¹³⁴

5.2 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Polarisierung von BV-2 Zellen

Die Ergebnisse hinsichtlich der M1-/M2-Polarisierung unterstreichen die Hypothese, dass Mikrogliaaktivierung nicht notwendigerweise mit einer Polarisierung in ausschließlich einen M1- oder M2-Phänotyp einhergehen muss. Das durch hIL-6 induzierte Genexpressionsprofil zeigt kein eindeutig pro- oder antiinflammatorisches Muster, da eine Vielzahl von Genen mit vielfältigen und teils gegensätzlichen Funktionen durch hIL-6 hochreguliert wird. Zwar kommt es durch die Stimulation mit hIL-6 zur Hochregulation zahlreicher M1-Marker, gleichzeitig kommt es aber auch zur vermehrten Expression einiger M2-Marker. Vielmehr scheint es sich um einen dynamischen und reversiblen Prozess zu handeln, der im Rahmen von Pathologien oder aber auch als transienter Zustand im Sinne der Homöostase im ZNS auftreten kann. Ähnlich wie bei peripheren Makrophagen haben moderne Transkriptom-Analysen von muriner Mikroglia gezeigt, dass die Reaktionsphänotypen nicht dem M1-/M2-Muster entsprechen.¹⁷² In einem Mausmodell traumatischer Hirnverletzungen wurde gezeigt, dass Mikroglia zu unterschiedlichen Zeitpunkten gleichzeitig sowohl M1- als auch M2-Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren.¹⁷³ Es ist daher kritisch anzumerken, dass es sich bei der M1-/M2-Hypothese um eine duale und somit auch stark vereinfachte Sicht auf die möglichen Aktivierungszustände von Mikroglia handelt. Es muss davon ausgegangen werden, dass es *in vivo* noch zahlreiche graduelle Abstufungen ihrer Funktion, Morphologie und Aktivierung gibt.⁶⁸ Phänotypische Marker für die Polarisationszustände wurden mit Hilfe von *in vitro* Modellen etabliert. Die Definition spezifischer Phänotypen *in vivo* ist aufgrund verschiedener Umwelt- und gewebsspezifischer Stimuli, die die Polarisierung beeinflussen, deutlich schwieriger.¹⁷⁴ Neuere Ansätze, die die transkriptionellen, proteomischen und epigenetischen Eigenschaften von Mikroglia in spezifischen Kontexten untersuchen, beginnen konsistente Reaktionsmuster aufzudecken.^{67,147} In experimentellen Versuchsmodellen neurodegenerativer Erkrankungen oder von ZNS-Verlet-

zungen konnte gezeigt werden, dass eine dysregulierte Proliferation der Mikrogliazellen sich schädlich auf die Neurone auswirkt. Die Proliferation wurde in diesen Studien durch M1-aktivierende Stimuli induziert. Neben proinflammatorischen M1-Markern sezernierten die proliferierenden Mikrogliazellen gleichzeitig jedoch auch vermehrt IL-4, das den schädigenden Einfluss abschwächen konnte.^{175,176} Im hier vorliegenden Experiment konnte gezeigt werden, dass das durch das hIL-6 induzierte Trans-Signaling ebenfalls zur Ausschüttung der proinflammatorischen M1-Marker TNF α (s. S. 67 Abb. 14), iNOS (s. S. 67 Abb. 15), und IL-1 β (s. S. 65 Abb. 11) führt, dennoch aber auch eine Hochregulierung des IL-4R in der stimulierten Gruppe (s. S. 69 Abb. 19) stattfindet. Ob dies ein direkter Effekt des Trans-Signaling ist, oder aber durch andere regulative, beispielsweise autokrine Signale der Mikrogliazellen induziert ist, bleibt unklar. Ebenso, inwiefern Effekte auf das endogen von den BV-2 Zellen produzierte IL-6 zurückzuführen sind. Insgesamt lässt sich die verstärkte Expression Marker beider Phänotypen jedoch im Sinne der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase durch die Mikrogliazellen interpretieren. Die primäre Antwort wird durch einen initialen Stimulus bestimmt, kann jedoch durch sich verändernde Stimuli, Dauer der Einwirkung eines Stimulus und Gewebereaktion moduliert werden.¹⁵⁷ Konkurrierende Stimuli können gleichzeitig auftreten und einen sowohl pro-als auch antiinflammatorischen Typ zur selben Zeit hervorrufen. In der gleichzeitigen Erhöhung pro- und antiinflammatorischer Marker der BV-2 Zellen durch die hIL-6 Stimulation zeigt sich, dass es sich bei der mikroglialen Aktivierung um einen dynamischen Prozess handelt. IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das Teil der Kommunikation zwischen Glia und Neuronen ist. Tao et al. konnten mittels der Behandlung einer Kultur primärer Hypothalamusneurone mit dem Überstand LPS-behandelter BV-2 Zellen zeigen, dass BV-2 Zellen IL-1 β ins Kulturmedium freisetzen und die Aktivität der hypothalamischen Neurone regulieren.¹⁷⁷ Durch hIL-6 kam es im hier durchgeführten Experiment nach 4h zu einer deutlichen Hochregulation des IL- β , die nach 24h wieder abklang (s. S. 65 Abb. 11). Die Hochregulation von IL- β kann als proinflammatorische Reaktion, aber auch als simple „Aktivierung“ der Mikrogliazellen interpretiert werden.¹⁷⁸ Die hier vorliegenden Ergebnissen aus den qPCR-Untersuchungen machen im Einklang mit der Literatur deutlich, dass sich weniger die isolierte Betrachtung als vielmehr eine Kombination von Markern für einen Aktivierungszustand empfiehlt.⁶⁸ Es ist davon auszugehen, dass Mikroglia von einem M1-Phänotyp zu einem eher regulatorischen, antiinflammatorischen M2-Phänotyp übergehen können. Die Hypothese der sogenannten „dunklen Mikroglia“¹⁷⁹ beschäftigt sich damit, ob die jeweiligen Phänotypen unterschiedlichen Subpopulationen angehören, die in verschiedenen Phasen einer Entzündungsreaktion unterschiedliche Aufgaben erfüllen¹⁸⁰ oder ob sie in Abhängigkeit der Umgebungssignale zwischen funktionellen Phänotypen wechseln können.¹⁸¹ Außerdem gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass eine metabolische Umprogrammierung bei der Regulation einer Art angeborenen Entzündungsreaktion eine Rolle spielen könnte.⁶⁸ Als weiterer M2-Marker zeigte sich PPAR γ

in der hIL-6 stimulierten Gruppe deutlich herunterreguliert gegenüber der Kontrollgruppe (s. S. 70 Abb. 20). Im Kontext neuropsychiatrischer Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass PPAR γ eine bedeutende Rolle bei der Mikrogliaaktivierung und bei der Abschwächung von Neuroinflammation spielt.¹⁸² In Anlehnung an diese Ergebnisse wäre daher von einer eher proinflammatorischen Wirkung des hIL-6 induzierten Trans-Signalings auf die Funktion der BV-2 Zellen auszugehen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen aus einer Studie, in der BV-2 Zellen mit IL-6 und sIL-6R stimuliert wurden.¹⁸³ Die Tatsache, dass einige proinflammatorische Marker in der stimulierten Gruppe im Zeitverlauf abnehmen, antiinflammatorische dafür zunehmen, steht in Einklang mit den Beobachtungen in in vitro Experimenten mit Mikroglia unter LPS-Stimulation¹⁵⁵ und lässt sich ebenfalls vor dem Hintergrund des Bestrebens der Zellen nach einem Gleichgewicht zum Schutz des Gewebes interpretieren. Demnach hätte das hIL-6 kurzfristig einen proinflammatorischen Effekt, der aber über den Zeitverlauf nicht überwiegt. In der Literatur ist man sich zunehmend einig, dass beide Mikroglia-Phänotypen ihre Funktion und Berechtigung haben, weshalb weniger die Unterdrückung eines bestimmten Phänotyps, sondern vielmehr das richtige Verhältnis beider Phänotypen angestrebt werden sollte. Zudem müsste ein genaueres Augenmerk auf die Zeiträume, in denen die jeweiligen Phänotypen auftreten und auf Veränderungen im sie umgebenden Mikromilieu gelegt werden. Die Untersuchung der Regulationsmechanismen der mikroglialen M1/M2-Polarisation ist ein vielversprechender Ansatz.¹⁸⁴ So konnten Xiong et al. zeigen, dass eine Behandlung mit IL-4 die M2-Mikroglia-Polarisation erhöht und die Ergebnisse einer zerebralen Ischämie verbessert.¹⁸⁵ In der Proteinexpression von TGF β (M2-Marker) zeigt sich lediglich ein leichter Anstieg über den Zeitverlauf, aber kein deutlicher Unterschied zwischen der stimulierten Gruppe und der Kontrollgruppe (s. S. 71 Abb. 21). Das Trans-Signaling scheint somit auf die TGF β -Signalkaskaden wenig Einfluss zu nehmen. Obwohl sich im hier vorliegenden Versuch nur geringfügige Unterschiede in der Genexpression von TLR4 und NF κ B zwischen den beiden Gruppen zeigen (s. S. 66 Abb. 12, 13), sind sie dennoch mehrfach als entscheidend für die Modulation der mikroglialen Aktivierung und Neuroinflammation beschrieben worden.¹⁸⁶ Die Stimulation von TLR4 aktiviert den NF κ B1-Signalweg, der eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von M1-Mikroglia spielt und die Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α induziert.¹⁸⁷ Die hier gezeigte Erhöhung von TNF α (s. S. 67 Abb. 14) scheint also in dem Fall über eine andere Signalkaskade induziert zu werden. NF κ B1 ist zudem ein Regulator der MMP9-Genexpression.¹⁸⁸ Als weiterer M1-Marker zeigt sich iNOS unter der hIL-6-Stimulation deutlich erhöht (s. S. 67 Abb. 15). Hier muss jedoch aufgrund der ausgeprägten Erhöhung unter hIL-6 auch ein Messfehler in Betracht gezogen werden. Andere Arbeiten mit der BV-2 Zelllinie, anderen Mikroglia-Zelllinien und primärer Mikroglia unter proinflammatorischer Stimulation (LPS) zeigen ebenfalls stark erhöhte iNOS- und MMP9-Expressionslevel.^{189,190,191} Dies stimmt mit unseren Ergebnissen unter hIL-6-Stimulation überein. Gleichzeitig ist iNOS

jedoch auch ein Aktivierungsmarker für Mikroglia und es wurden auch Formen der Mikrogliaaktivierung ohne begleitende Erhöhung der Expression proinflammatorischer Zytokine beobachtet. Dies ist ein weiterer Aspekt der Heterogenität mikroglialer Aktivierungsmechanismen und Phänotypen und eine Erklärung für die nur sehr selektive Auf- und Abregulation der jeweiligen Marker.¹⁸⁶ Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass die schädlichen Effekte der Mikroglia nicht nur durch erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine, sondern auch durch zahlreiche weitere Faktoren vermittelt werden.¹⁹² In vielen Fällen wird es sich wahrscheinlich nicht um ein "entweder/oder", sondern um ein "sowohl als auch" handeln. Zusammenfassend könnte dies bedeuten, dass Mikroglia sowohl auf eine veränderte Mikroumgebung im Gehirn reagieren als auch neurologische Pathologien direkt beeinflussen. Die Fähigkeit der Mikroglia sich an die Hirnumgebung anzupassen⁹⁰ legt nahe, dass die Funktion der Mikroglia maßgeschneidert ist, so dass Verallgemeinerungen zwischen Mikroglia während der Entwicklung, im normalen Erwachsenenalter oder bei verschiedenen pathologischen Zuständen nur schwer möglich sind.¹⁹³

5.3 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Synaptischen Plastizität

Dass Mikrogliazellen die Entwicklung des ZNS und die synaptische Plastizität neuronaler Netzwerke im Erwachsenenalter beeinflussen, wurde mehrfach nachgewiesen.⁶⁷ Einige Marker der synaptischen Plastizität in den BV-2 Zellen zeigen sich auf transkriptioneller Ebene verändert, andere nicht. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei der synaptischen Plastizität um einen multizellulären Prozess handelt, der im Rahmen einer Monokultur nur schwer beurteilt werden kann. Beispielsweise konnten Paolicelli et al. im Mausmodell zeigen, dass ein fehlender Chemokinrezeptor CX3CR1 eine verminderten Anzahl an Mikrogliazellen und konsekutiv verzögertem Synaptic Pruning in der Entwicklungsphase des Gehirns hervorruft.⁸⁵ Dies führt zu unreifen neuronalen Netzwerken. Der Chemokinrezeptor zeigte sich in unseren Untersuchungen kaum verändert (s. S. 73 Abb. 24). Dies könnte daran liegen, dass seine Expression nicht durch das IL-6-Trans-Signaling beeinflusst wird oder daran, dass in der Reinkultur der BV-2 Zellen der Stimulus durch das von den Neuronen ausgeschüttete CX3CL1 fehlt. Die Marker Arc und Homer1a, beide relevant im Rahmen der Aktivierung und Modifikation exzitatorischer Synapsen,¹¹⁰ zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (s. S. 72 Abb. 23, 24). Foxo1 und Egr1 als Marker der synaptischen Plastizität³³ waren hingegen in der stimulierten Gruppe deutlich herabreguliert gegenüber der Kontrollgruppe (s. S. 73 Abb. 25, S. 74 Abb.27), c-Fos deutlich hochreguliert in der stimulierten Gruppe (s. S. 74, Abb. 26). C-Fos gilt ebenfalls als Aktivierungsmarker für Mikroglia.⁸⁶ Da es sich hier um wichtige Marker der synaptischen Plastizität handelt, stellt sich die Frage, ob es durch das hIL-6 induzierte Trans-Signaling zu einer verminderten Fähigkeit der Mikrogliazellen zur Modulation der neuronalen Netzwerke kommt. Auf translationaler Ebene wurde lediglich vGLUT2 untersucht. Da sich hier keine Veränderungen

zeigten (s. S. 75 Abb. 28), wurde von der Untersuchung weiterer Transporter oder GABAerger Synapsen abgesehen. Buss et al. konnten zeigen, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des fetalen Gehirns spielt und erhöhte Serumwerte von IL-6 beim Kind zu Störungen des zellulären Überlebens, der Proliferation und Differenzierung, des axonalen Wachstums und der Synaptogenese führen können.¹⁹⁴ Eine Erhöhung von IL-6 führte in Studien zu einer funktionellen und strukturellen Beeinträchtigung in neuronalen Netzwerken der Nachkommen und in der Folge zu einer veränderten kognitiven Entwicklung in den Nachkommen.^{195,196,171}

Um die Komplexität des ZNS besser zu verstehen, sollten sich zukünftige Experimente auf das funktionelle Zusammenspiel der vielen zellulären und molekularen Komponenten der synaptischen Plastizität konzentrieren.⁵¹ Neben der bereits erwähnten Rolle der Astrozyten leisten auch die Oligodendrozyten durch Interaktion mit EZM-Molekülen einen Beitrag zur synaptischen Plastizität und neuronalen Aktivität.¹⁹⁷ Die einzelnen Zellen üben einen starken Einfluss aufeinander aus. Insbesondere für Astrozyten finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele, die ihren Einfluss auf die Mikrogliazellen beweisen. Sie modulieren deren Zellproliferation und Migration und konnten in der Co-Kultivierung potenziell schädigende Effekte wie etwa Expression von iNOS in den Mikroglia abschwächen.^{198,199,200} Bildung und Funktion des Nervensystems werden maßgeblich durch lebenslange dynamische und bidirektionale Interaktionen zwischen Neuronen, Makro- und Mikroglia bestimmt.²⁰¹ Die singuläre Betrachtung der Mikroglia dieser Studie ist daher eine mögliche Erklärung für die teils geringfügigen Veränderungen bei den Markern der synaptischen Plastizität. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass Mikrogliazellen die Reifung oder Funktion von Neuronen und die synaptische Funktion durch die Freisetzung von entzündlichen Zytokinen und Molekülen wie Interleukinen oder TNF α modulieren, die wiederum auch die synaptische Reifung und Plastizität regulieren.⁶⁷ Die zuvor beschriebene vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine der BV-2 Zellen unter hIL-6-Stimulation lässt sich unter dem Aspekt der synaptischen Reifung demnach in einem anderen Licht sehen. Das Trans-Signaling scheint insgesamt einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Plastizität der BV-2 Zellen zu haben. Hier konnten durch den Verlust der für die Plastizität wichtigen Faktoren Foxo1 und Egr1 eher nachteilige Effekte gezeigt werden, was jedoch weiterer Untersuchungen auch auf transkriptioneller Ebene bedarf.

5.4 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf Marker der Extrazellulären Matrix

Bis auf eine deutliche Hochregulierung von MMP9 unter der hIL-6-Stimulation (s. S. 76 Abb. 29) zeigten sich keine starken Veränderungen bei den Markern der EZM. Die Hochregulation von TIMP1 (s. S. 76 Abb. 30(a)) als Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen steht im Einklang mit der Hochregulation von MMP9 bzw. lässt sich als Antwort darauf interpretieren. Im Rahmen des Strebens nach Homöostase kommt es zum Auf- und Abbau extrazellulären Materials. Insgesamt scheint das durch hIL-6 induzierte Trans-Signaling einen geringen Einfluss auf die

molekularen Prozesse der EZM der BV-2 Zellen zu haben. Eine mögliche Erklärung für die geringfügige Veränderung der EZM-Marker auf Genexpressionsebene könnte sein, dass in der hier vorliegenden Studie lediglich Mikrogliazellen allein und kein Zellverband aus Glia und Neuronen untersucht wurde. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass erhöhte MMP9-Level mit der Entstehung von geistiger Behinderung bzw. eingeschränkter kognitiver Entwicklung assoziiert sind.¹¹⁴ Da MMP9 in der Lage ist die EZM zu spalten, kann ein erhöhter MMP9-Spiegel den Verlust und die Reorganisation von perineuronalen Netzen fördern. Dies sind spezialisierter Strukturen der EZM, die für die synaptische Stabilisierung im sowohl sich entwickelnde als auch im erwachsenen Gehirn verantwortlich sind.

5.5 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Aktivität von BV-2 Zellen

Sowohl Inaktivität als auch Überaktivität der Mikroglia können verschiedene Konsequenzen nach sich ziehen und einen Krankheitsprozess in der Konsequenz eindämmen oder verschlimmern.²⁰² Anhand des Beispiels der Alzheimer-Erkrankung lässt sich die dichotome Rolle der Mikroglia beispielhaft darlegen: Während die Fähigkeit zur Phagozytose und deren Hochregulation sich durch den Abbau der A β -Plaques, die die Krankheit auslösen, eher positiv auf deren Verlauf auswirkt, haben die von der Mikroglia ausgeschütteten proinflammatorischen Mediatoren einen schädlichen Effekt.¹⁵⁷ In Studien mit entzündungshemmenden Medikamenten milderte die Unterdrückung der Entzündungsreaktion durch Mikroglia die Symptome der Alzheimer-Erkrankung im Mausmodell.²⁰³ Dass eine IL-6-Blockade therapeutische Erfolge erzielen kann, zeigt sich am Beispiel der Aquaporin-4-positiven Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankungen.²⁰⁴ IL-6 mediiert hier die autoimmunologischen Prozesse.²⁰⁵ iNOS ist ein wichtiger Marker mikroglialer Aktivierung. Im hier durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression von iNOS durch hIL-6-Stimulation induziert wird (s. S. 67 Abb. 15). Die Literatur legt jedoch nahe, dass der proinflammatorisch Signalweg nicht durch das Trans-Signaling allein, sondern auch durch den klassischen IL-6-Signalweg ausgelöst wird. Kaplin et al. zeigten, dass eine in vivo Verabreichung von IL-6 über die Aktivierung von JAK-STAT zur Expression von iNOS in Mikrogliazellen führt. Die damit einhergehende NO-Produktion führte zur Degeneration von Axonen.¹⁶² Auch das in dieser Studie durch hIL-6 stark hochregulierte c-Fos (s. S. 74 Abb. 26) gilt als Aktivierungsmarker der Mikroglia. Über seine Wirkung im Rahmen der Gliogenese und der synaptischen Plastizität ist bisher wenig bekannt. Ebenfalls von Relevanz für das bessere Verständnis des Aktivierungsprozess von Mikrogliazellen scheint die Regulierung des Aktivierungsindikator-Proteins IBA1. IBA1 dient als früher Aktivierungsmarker für Mikrogliazellen. In der IBA1-Intensitätsmessung Intensität pro Fläche zeigt sich eine reduzierte Intensität von IBA1, sprich eine verminderte Aktivierung der Mikroglia in der hIL-6 stimulierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (s. S. 78 Abb.33(a)). Gleichzeitig ergibt die IBA1-Intensitätsmessung bezogen auf IBA-positive Fläche pro Zellzahl kaum Un-

terschiede zwischen beiden Gruppen (s. S. 78 Abb. 33(b)), was darauf schließen lässt, dass es keinen deutlichen hIL-6 induzierten Aktivierungsunterschied gibt. Da es sich bei IBA1 um einen Marker handelt, der besonders in der Frühphase der Aktivierung der Mikrogliazellen hochreguliert ist, könnte der geringe Unterschied zwischen den Gruppen an Charakteristika der BV-2 Zelllinie liegen. Es ist bekannt, dass die BV-2 Zellen per se einen wesentlich höheren basalen Aktivitätszustand als primäre Mikrogliazellen haben.²⁰⁶ IBA1 färbt alle Mikrogliazellen und dient daher nicht der Identifizierung ihrer Polarität.²⁰⁷ Eine Studie fand eine allmähliche Zunahme der Expression des IBA1-Proteins Tage nach Axotomie des Nervus facialis, was darauf hindeutet, dass IBA1 eine Rolle bei der Regulierung der Funktion von aktivierter Mikroglia spielt und sich diese graduell abbilden lässt.²⁰⁷ Dieser Aspekt wiederum würde vermuten lassen, dass die Zeitpunkte im hier gewählte Versuchsmodell zu kurz sind, um den Verlauf der Aktivierung anhand von IBA1 abzubilden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass IBA1 in der Lage ist, die phagozytotische Aktivität der Mikrogliazellen zu modulieren.²⁰⁸ Eine verminderte Intensität von IBA1 in der hIL-6 stimulierten Gruppe könnte also auch im Einklang mit der gefundenen herabgesetzten Phagozytoseaktivität der stimulierten Gruppe stehen (s. S. 82 Abb. 38). Allgemein gesprochen kann und soll die Aktivierung der Mikroglia zum Abklingen der Entzündung und zur Wiederherstellung der Gewebshomöostase führen. Die langfristige Exposition jedoch gegenüber wiederholten oder langanhaltenden Reizen kann zu dauerhaften Veränderungen der Mikroglia führen. Eine solche „geprimte Mikroglia“, die mit chronischer Inflammation wie auch der im Hypothalamus assoziiert ist, ist überempfindlich. Dies führt zu einer übertriebenen und verlängerten Zytokinantwort auf proinflammatorische Stimuli. Das Niveau der Entzündungsreaktion kann durch wiederholte proinflammatorische Stimuli ansteigen und so zu einem Priming der Mikroglia führen.²⁰⁹ Zum anderen können die Mikrogliazellen auf sich wiederholende Stimuli einen Zustand der „Toleranz“ entwickeln, in dem sie nur noch eine abgeschwächte Reaktion auf proinflammatorische Stimuli zeigen.²¹⁰ Recasens et al. konnten in der BV-2 Zellkultur sowie am Mausmodell zeigen, dass IL-6 und insbesondere das Trans-Signaling zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren und MHCII-Molekülen führte und somit eine entscheidende Rolle beim Priming der Mikroglia spielen.^{183,211} Nicht zuletzt muss man auch beim Thema der Aktivierung der Mikroglia Paradigmen stets neu überdenken und hinterfragen. So ist es beispielsweise ebenfalls denkbar, dass der Vorgang, der örtlich und zeitlich begrenzten mikroglialen Aktivierung mehrmals täglich stattfindet, ohne dass wir mit bisherigen Methoden in der Lage sind, dies zu registrieren. Das bedeutet, dass Mikroglia ständig Schaden begrenzt, bevor er sich klinisch manifestiert. Anstatt Mikroglia als Hauptakteur klinisch manifester neurologischer Erkrankungen zu sehen, könnte es ebenso sein, dass die Versuche der Eindämmung eines pathologischen Geschehens lediglich nicht mehr ausreichend waren.¹⁵⁷

5.6 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Morphologie von BV-2 Zellen

Dass die Morphologie nicht immer ein zuverlässiges Abbild der funktionellen Ausrichtung darstellt, zeigt sich daran, dass bestimmte Geninduktionen- und Aktivitäten auch ohne auffällige morphologische Übergänge stattfinden können. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich unter hIL-6-Stimulation eine in der Tendenz vermehrte Ramifizierung in der stimulierten Gruppe (s. S. 81 Abb. 36(c)), was darauf hindeutet, dass das Trans-Signaling die Fortsatzausprägung der BV-2 Zellen beeinflusst. Brunssen et al. hingegen fanden keine morphologischen Veränderungen in der IBA1-Färbung von primärer Mikroglia unter Stimulation mit hIL-6.¹³⁴ Allerdings könnte die Diskrepanz zwischen in vitro Studien mit primären Mikrogliaulturen und einer Zellreihe wie der BV-2 Zelllinie auf grundlegende Unterschiede im Ruhezustand der Mikroglia zurückzuführen sein, die durch die Zellisolierung und sonstige Kulturbedingungen zustande kommen könnten.^{212,213} Studien zeigten zudem deutliche Unterschiede in der Morphologie zwischen muriner und humaner Mikroglia bei gleichzeitiger Erhaltung ihrer biologischen Funktion.^{214,215} Dieses Phänomen könnte auch eine Erklärung für die vermehrte Fortsatzanzahl der BV-2 Zellen unter hIL-6-Stimulation darstellen, da die genexpressorischen und funktionellen Untersuchungen im Gesamtbild eher auf eine proinflammatorische Wirkung des hIL-6 auf die BV-2 Zellen schließen lassen. Zudem zeigt sich der statistisch signifikante Unterschied in der Anzahl der Fortsätze vor allem durch einen Abfall der Fortsatzanzahl in der Kontrollgruppe und nicht durch eine deutliche Zunahme in der hIL-6 stimulierten Gruppe (s. S. 81 Abb. 36(a,b)). Dies stellt den tatsächlichen Effekt des hIL-6-Trans-Signaling auf die Ramifizierung der BV-2 Zellen in Frage und lässt eher auf eine Veränderung des Mikromilieus in der Kontrollgruppe über die Zeit hinweg schließen. Andere Erkenntnisse legen zudem nahe, dass die morphologischen Veränderungen anzeigen, dass die Mikroglia eine Veränderung der Homöostase erkannt haben, jedoch keinen bestimmten Reaktionszustand bei bestimmten ZNS-Erkrankungen darstellen. Es gilt: Phänotypische Diversität bedeutet funktionelle Diversität. So wurde gezeigt, dass auch ramifizierte Mikroglia die Astroglionese durch Aktivierung von STAT3 induziert.¹⁶⁰ Unter experimentellen Bedingungen konnte eine ramifizierte Form der Mikroglia induziert werden, obwohl die proinflammatorischen Bedingungen einer ramifizierten, ruhenden Mikroglia entgegensprachen.²¹⁶ Im Einklang damit zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit eine Anzahl an Fortsätzen unter hIL-6-Stimulation (s. S. 81 Abb.36(c)). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, in denen sich unter hIL-6-Stimulation eine vermehrt verzweigte Mikroglia gezeigt hat, fanden Campbell et al. eine verminderte Ramifizierung bei Mäusen, in denen das Trans-Signaling nicht blockiert wurde, verglichen mit denen, in denen es blockiert wurde.³⁰ Dies unterstreicht die These, dass beim Aktivierungsprozess der Mikroglia nicht das „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ gilt, sondern dass die Antwort und deren Ausprägung je nach Stimulationskontext variieren können.²¹²

5.7 Hyper-Interleukin-6-Effekt auf die Phagozytoseaktivität von BV-2 Zellen

Wie in der Einleitung (s.2.2.2) beschrieben, stellt die Phagozytose im gesunden wie auch im kranken Gewebe eine wichtige Funktion der Mikroglia dar. Die Phagozytoseleistung der BV-2 Zellen zeigte sich unter hIL-6-Stimulation deutlich herabreguliert gegenüber der Kontrollgruppe (s. S. 82 Abb. 38). In einem Mausmodell des Rett-Syndroms zeigt sich, dass die Unfähigkeit der Mikroglia, den sich während der Entwicklung anhäufenden Zelldebris zu phagozytieren, zum postnatalen Auftreten dieser Pathologie beitragen könnte.²⁰² Auch in der postinflammatorischen Phase der Meningitis tragen Mikroglia durch die Entfernung apoptotischer Zellen zum Regenerationsprozess bei.¹⁵⁷ Koenigsknecht-Talboo et al. konnten zeigen, dass die phagozytotische Aktivität der Mikroglia durch proinflammatorische Zytokine abgeschwächt wird.²¹⁷ Im Einklang damit zeigten funktionelle Untersuchungen von M1-polarisierter Mikroglia eine gehemmte Phagozytose.⁶⁸ Beim M2-Phänotyp hingegen hat sich entsprechend unserer Ergebnisse gezeigt, dass dieser auf antiinflammatorische Stimuli wie IL-4 oder IL-13 mit einer erhöhten Phagozytoseleistung reagiert, Zelltrümmer entfernt und dadurch den Gewebeschaden reduziert.²¹⁸ Auch Mikroglia in HFD-Mäusen zeigte in Studien eine beeinträchtigte Phagozytose.²¹⁹ Zusammenfassend zeigt sich an der herabgesetzten Phagozytoseleistung ein eher negativer Effekt des Trans-Signalings in den BV-2 Zellen, wobei man auf der anderen Seite auch die schädlichen Effekte einer überschießenden Phagozytoseaktivität, wie etwa die vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen, nicht außer Acht lassen darf.⁵⁷

5.8 Limitationen

5.8.1 BV-2 Zellen

Die hier vorliegenden Untersuchungen unterliegen den Limitationen der BV-2 Mikrogliazelllinie, die im Folgenden dargelegt werden sollen.

BV-2 Zellen wurden von raf/myc-immortalisierten murinen Mikroglia abgeleitet und sind der am häufigsten verwendete Ersatz für primäre Mikroglia.⁸⁸ Der Vorteil der BV-2 Zelllinie liegt darin, dass es problemlos möglich ist, aus der Kultur ausreichend Zellen für biochemische Untersuchungen zu generieren. Weil dagegen die Proliferationsfähigkeit primärer Mikroglia sehr begrenzt ist, müssen für jedes Experiment frische Zellen aus dem Gewebe isoliert werden. Dies ist ein sehr zeitaufwändiger Prozess, der zahlreicher Tiere und Verbrauchsmaterialien bedarf.⁸⁸ Weil es sich bei der BV-2 Zelllinie um eine immortalisierte und transfizierte Zelllinie handelt, unterscheiden sie sich von primärer Mikroglia durch erhöhte Proliferation und Adhärenz.^{220,206,88} In der Literatur finden sich Zweifel, ob die BV-2 Zelllinie tatsächlich die Reaktion der primären Mikroglia modelliert.^{221,222} In einer Studie untersuchten He et al. die Entzündungsreaktion auf LPS der BV-2 Zellen im Vergleich zu der primärer Mikroglia und Mikroglia in vivo. In den Genexpressionsprofilen zeigte sich, dass praktisch alle Gene, die in den BV-

2 Zellen reguliert waren, auch in primärer Mikroglia gefunden wurden. Die Antwort der BV-2 Zellen war jedoch schwächer. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der basale Aktivierungszustand der BV-2 Zellen höher ist als derjenige primärer Mikroglia.²⁰⁶ Umgekehrt konnte nur knapp ein Fünftel der Gene, die in primärer Mikroglia deutlich reguliert waren, auch in den BV-2 Zellen gefunden werden. Beim Vergleich der BV-2-Reaktion mit der in vivo-Antwort zeigte sich eine etwa 50-prozentige Überschneidung der Transkripte in beide Richtungen, was eine bemerkenswert gute Überlappung ist.⁸⁸ Eine weitere Studie wies zudem auch auf deutliche Unterschiede in Bezug auf epigenetische Regulatoren hin.²²³ Auch liefert moderne Mikrogliaforschung zunehmend Erkenntnisse über funktionelle und morphologische Subpopulationen von Mikroglia in verschiedenen Regionen des ZNS,^{224,225} was durch die BV-2 Zelllinie ebenfalls nicht repräsentierbar ist. Gleiches gilt für das Vorkommen verschiedener Reifungsstadien der Mikroglia während der Hirnentwicklung, die mit spezifischen funktionellen Aufgaben verbunden sind sowie für geschlechtsspezifische Unterschiede.²²⁶ Nicht zuletzt spielen auch die Standards bei der Kulturführung eine wichtige Rolle.²²⁷ Unterschiedliche Kulturbedingungen führen zu einer erschwerten Vergleichbarkeit, da Mikroglia sehr empfindlich auf Umweltveränderungen reagieren. Zudem gibt es auch große Unterschiede im Hinblick auf angewandte Zellisolationmethoden. Um die Rolle der Mikroglia besser zu verstehen, ist die Etablierung eines einheitlichen Mikroglia-Modells entscheidend.²⁰⁶ Dessen ungeachtet konnte in zahlreichen Studien auch eine hohe Zuverlässigkeit und Eignung der BV-2 Zelllinie als Ersatz für primäre Mikroglia bewiesen werden.⁸⁸

5.8.2 Methoden

Obwohl die Methoden nach bestem Wissen und Gewissen geplant und durchgeführt worden sind, gäbe es dennoch an einigen Stellen in Auswahl und Durchführung Möglichkeiten zur Verbesserung. Um ein besseres Gesamtbild zu erhalten, wären umfassendere Methoden wie etwa eine RNA-Microarray-Analyse der BV-2 Zellen wünschenswert. Die Auswertung der Histologie, bei der es sich per se um eine semiquantitative Methode handelt, insbesondere der Beurteilung der Ramifizierung, erfolgte ohne doppelte Verblindung. Zur weiteren Validierung der Ergebnisse bedürfte es einer erneuten händischen Auswertung oder automatisierter Tools. Die Ergebnisse der Betrachtungen auf transkriptioneller Ebene unterliegen zudem möglichen Veränderungen durch posttranskriptionelle Modifikationen, die in den durchgeführten Untersuchungen nicht erfasst werden. Kritisch muss man feststellen, dass man anhand des gewählten Versuchsmodells vornehmlich Aussagen über die kurzfristigen Effekte einer Stimulation mit hIL-6 auf die BV-2 Zellen treffen kann. Um Aussagen über die langfristigen Folgen der Aktivierung des STAT3-Signalwegs und einer chronischen Aktivierung von Mikrogliazellen treffen zu können, bedürfte es eines anderen Versuchsdesigns mit längeren Stimulationszeiträumen wie z. B. 48h. Die genauere Betrachtung kurzfristiger und langfristiger Effekte würde da-

bei helfen, die Funktionen der Mikrogliazellen und ihre Reaktionen auf den Stimulus hIL-6 auch im Sinne eines physiologischen Strebens nach Homöostase besser zu verstehen. Das vorliegende Versuchsmodell deckt lediglich einen kurzen Ausschnitt eines langfristigen und dynamischen Prozesses ab. So konnten Baufeld et al. zeigen, dass Mikroglia nach kurzfristiger HFD proinflammatorische Faktoren produzieren, bei längerer HFD jedoch im Sinne eines Schutzmechanismus einen antiinflammatorischen Phänotyp einnehmen. Diese Art der Reaktion entspricht einer typischen Reaktion der Mikroglia auf chronische Störungen der Homöostase des ZNS.⁴² Beim Vergleich der LPS-induzierten Entzündungsreaktion zwischen BV-2 Zellen und in vivo Mikroglia fiel interessanterweise ein deutlicher Unterschied in der zeitlichen Dynamik der Entzündungsreaktion auf. Während die in vivo Reaktion nach 4 Stunden ihr Maximum erreichte und nach ca. 16 Stunden wieder abflachte, zeigte sich in vitro eine kontinuierliche Hochregulierung.⁸⁸ Möglicherweise spielen also die Zeitpunkte in vitro eine untergeordnete Rolle. Da nicht-transkriptionelle Anpassungen binnen Sekunden bis Minuten und sogar die Induktion von Translation und Transkription innerhalb weniger Stunden erfolgen, kann auch Dauer des Stimulus hIL-6 in dem hier durchgeführten Experiment von ausreichender sein.¹⁵⁷

Des Weiteren ist das in der hiesigen Arbeit verwendete Modell einer Reinkultur der BV-2 Zellen nicht repräsentativ für das komplexe Zusammenspiel und die Rückkopplungsmechanismen zwischen Neuronen und Glia in vivo. Die Homöostase im ZNS wird durch eine Vielzahl von Zellpopulationen und deren Zusammenspiel aufrechterhalten. Bislang bleibt unklar, ob die Hypothalamus-Neurone selbst oder aber die Mikrogliazellen zytotoxisch wirken und so degenerative Mechanismen unterstützen. Zu dem Zellverband zählen neben den Mikrogliazellen und Neuronen auch die Astrozyten, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase wie auch der synaptischen Übertragung spielen.^{228,229} Um die Rolle der Astrozyten bei der Entstehung von Gliose in dem komplexen Verbund verschiedener Zellen genauer zu definieren, wäre ein in vitro Experiment mit hIL-6 stimulierten Astrozytenkulturen ergänzend aufschlussreich. Glia und Neuronen stehen im physiologischen wie im pathologischen Zustand in ständiger wechselseitiger Kommunikation. Hierfür sezernieren die einzelnen Zellpopulationen jeweils Stoffe, deren Gesamtheit als Sekretom bezeichnet werden kann. Die Komponenten des Sekretoms modulieren die komplexe Signalübertragung, die bei Neuroprotektion, Neurodegeneration und Neuroregeneration eine wichtige Rolle spielen.²³⁰ In diesem Rahmen würden sich ebenfalls die Conditioned Media Versuche einreihen, die eine noch höhere Aussagekraft über die Effekte der von den Mikrogliazellen sezernierten Stoffe auf die Neurone und Astrozyten bieten könnten.

Für ein besseres Verständnis des Crosstalks innerhalb der einzelnen Zellen, Zytokine und Signalwege bedürfte es zudem einer genaueren Beschäftigung mit dem sIL-6R. Interessant wäre zu wissen, welche Zellen und Gewebe welchen Stimuli folgend den Rezeptor sezernie-

ren. Islam et al. fanden heraus, dass die Reaktion der Zellen auf hIL-6 auch stark von dem jeweils spezifischen sIL-6R abhängig ist.¹²⁰ Beide Signalwege sind in primären Mikrogliazellen untersucht. Die Untersuchung des Trans-Signaling in BV-2-Zellkultur ist bisher in der Literatur kaum beschrieben und sollte daher zur Klärung der Auswirkung auf Neurone versus Gliazellen in Monokultur in dieser Arbeit untersucht werden. Um in Zukunft Interaktionen zu erklären, sollte das Modell der Untersuchung einzelner Zelltypen durch Kokultivierung mehrerer Zellreihen ergänzt werden.²³¹ Auch Untersuchungen von Mikroglia beim Menschen werden immer häufiger. Sie sind insbesondere für die Bestimmung selektiver und spezifischer Biomarker notwendig, um die Übertragbarkeit der Zell- und Maus-Experimente und möglicher Therapien auf den Menschen anhand von aussagekräftigen Verlaufsparemtern zu definieren.²¹

5.8.3 Forschungsfeld Perinatale Programmierung

Abschließend sollte zudem festgehalten werden, dass das Forschungsfeld der perinatalen Programmierung einige Herausforderungen birgt. Sowohl die Relevanz von Längsschnittstudien als auch die Epigenetik als zunehmende Einflussgröße erweisen sich in ihrer Durchführbarkeit als sehr zeit- und kostenintensiv.^{232,233} Es wäre erstrebenswert, bereits früh in der Schwangerschaft oder sogar davor mit der Untersuchung großer Humankohorten zu beginnen. Solche Humanstudien würden einerseits zwar zum besseren Verständnis beitragen, haben andererseits jedoch den Nachteil, dass die meisten Surrogat-Parameter (z. B. Diabetes mellitus Typ 2, koronare Herzkrankheit, neurodegenerative Erkrankungen) erst später im Erwachsenenalter auftreten. Nicht nur würde sich dadurch der Studienzeitraum erheblich ausdehnen, auch die Anzahl der Confounder, die im Laufe dieser Dauer auftreten können, ist immens. Hinzu kommt, dass der exakte Zeitpunkt und das genaue Ausmaß intrauteriner Exposition gegenüber einem programmierenden Ereignis wie z. B. der Nährstoffzufuhr oder hormonellen Einflüssen methodisch nicht einfach zu bestimmen sind. Häufig treten sowohl prä- als auch postnatal mehrere Stressreize gleichzeitig auf. Es wäre notwendig, die Probanden im Hinblick auf ihre geistige und körperliche Gesundheit in breit angelegten Längsschnittstudien zu reevaluieren.^{234,235}

Nichtsdestotrotz bieten Krankheiten, die ihren Ursprung in utero haben und erst sehr viel später im Leben relevant werden, die vielversprechende Möglichkeit, sie in genau diesem kritischen Zeitfenster bereits zu verhindern.²³⁵

5.9 Ausblick

In Anbetracht der weltweiten Adipositasepidemie, insbesondere unter Frauen im gebärfähigen Alter, ist es wichtig, gezielte und effektive präventive Strategien zu entwickeln, um frühe Risikofaktoren für die Entwicklung von Übergewicht und Adipositas in den Nachkommen überge-

wichtiger Mütter zu reduzieren. Im Hinblick auf die Prägung einer hypothalamischen Dysfunktion und Gliose in den Nachkommen adipöser Mütter fehlen solche Ansätze bislang gänzlich. Für die Zukunft wäre es wünschenswert, die Entstehung von Adipositas-bedingten Krankheitsbildern in den kommenden Generationen durch ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ihrer perinatalen Programmierung zu reduzieren. Insgesamt gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass eine mikrogliale Dysfunktion in der frühen Entwicklung zu einer gestörten synaptischen Reifung und Aktivität führt.¹⁰⁵ In diesem Zusammenhang bilden auch genauere Erkenntnisse über dysregulierte Mechanismen in der Mikrogliaantwort die Grundlage dafür, Therapien zu entwickeln, die helfen können, neurodegenerative oder in der neurologischen Entwicklung des ZNS begründete Erkrankungen aufzuhalten oder umzukehren. Eine mechanistische Verbindung zwischen IL-6 und einer gestörten Morphologie und Funktion von Mikroglia und hypothalamischen Nervenzellnetzwerken in vivo fehlt bislang gänzlich, ebenso wie eine longitudinale Betrachtung möglicher Effekte. Auch fehlen in der Literatur bisher präventive Ansätze einer gezielten Blockade molekularer Mechanismen wie beispielsweise des IL-6-Trans-Signalings in Mikrogliazellen, die möglicherweise an der Dysregulation hypothalamischer Nervenzellnetzwerke beteiligt sind. Ein solcher Versuchsansatz gäbe Aufschluss über mögliche Vermeidung bzw. Reversibilität der Effekte des IL-6-Trans-Signalings. Um genauer herauszufinden, wie die von der Mikroglia sezernierten Stoffe Neuronen und ihre Netzwerke beeinflussen, wäre es interessant und notwendig, in vitro Neuronenkulturen mit dem Überstand der BV-2-Kulturen zu stimulieren. Neben einer schon erwähnten Kointivierung der hirnsässigen Zellen bzw. der Stimulation der Neurone mit den Überständen der BV-2 Zellen wären eine gezielte Blockade des Trans-Signalings in den Mikrogliazellen interessante Ansätze. Angesichts der Komplexität und der vielfältigen Funktionen der Mikroglia in Gesundheit und Krankheit besteht ein großer Bedarf an neuen Biomarkern, die Aussagen über spezifische mikrogliale Funktionszustände wie abnormale Phagozytose oder entzündliche Aktivierung liefern. Die gezielte Beeinflussung dieser dysregulierten Funktionszustände mit dem Ziel der Wiederherstellung der Homöostase könnten als therapeutisches Target dienen.⁶⁷ Zusätzlich haben neue bildgebende Verfahren bereits dazu beigetragen, die Mikrogliazellen als hochdynamische Zellen besser zu untersuchen.²³⁶

Da die jüngsten Erkenntnisse über die unterschiedlichen Rollen der Mikroglia vor allem aus Mausmodellen stammen, ist es wichtig, dass wir in die Entwicklung neuer Krankheitsmodelle investieren, basierend z.B. auf menschlichen Stammzellen oder Organoiden, um eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleisten zu können.^{237,238,239}

6 Literaturverzeichnis

1. Jaacks LM, Vandevijvere S, Pan A, et al. The obesity transition: stages of the global epidemic. *The lancet Diabetes & endocrinology* 2019; **7**(3): 231-40.
2. Schienkiewitz A, Brettschneider A-K. Übergewicht und Adipositas im Kindes- und Jugendalter in Deutschland–Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *Journal of Health Monitoring* 2018; **3**(1).
3. Dai H, Alsaihe TA, Chalghaf N, Riccò M, Bragazzi NL, Wu J. The global burden of disease attributable to high body mass index in 195 countries and territories, 1990–2017: An analysis of the Global Burden of Disease Study. *PLoS medicine* 2020; **17**(7): e1003198.
4. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990–2020. *Nature medicine* 1998; **4**(11): 1241-3.
5. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The lancet* 2014; **384**(9945): 766-81.
6. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj* 1995; **311**(6998): 171-4.
7. Clark P. Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the fetal origins of adult disease hypothesis. *European Journal of Pediatrics* 1998; **157**(1): S7-S10.
8. Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB, Fang MZ. The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Maternal and child health journal* 2013; **17**(2): 222-9.
9. Domingues MR, Matijasevich A, Barros AJ, Santos IS, Horta BL, Hallal PC. Physical activity during pregnancy and offspring neurodevelopment and IQ in the first 4 years of life. *PLoS One* 2014; **9**(10): e110050.
10. Gomes da Silva S, Arida RM. Physical activity and brain development. *Expert review of neurotherapeutics* 2015; **15**(9): 1041-51.
11. Esteban-Cornejo I, Martinez-Gomez D, Tejero-González CM, et al. Maternal physical activity before and during the prenatal period and the offspring's academic performance in youth. The UP&DOWN study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2016; **29**(9): 1414-20.
12. Valdearcos M, Douglass JD, Robblee MM, et al. Microglial inflammatory signaling orchestrates the hypothalamic immune response to dietary excess and mediates obesity susceptibility. *Cell metabolism* 2017; **26**(1): 185-97. e3.
13. Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science* 2016; **353**(6301): 772-7.
14. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *Journal of Neuroscience* 2007; **27**(40): 10695-702.
15. Giovanoli S, Engler H, Engler A, et al. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science* 2013; **339**(6123): 1095-9.

16. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008; **132**(4): 645-60.
17. Gemma C, Bachstetter AD. The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience* 2013; **7**: 229.
18. Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 2013; **61**(1): 24-36.
19. Tremblay M-È, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *Journal of Neuroscience* 2011; **31**(45): 16064-9.
20. Rabadan-Diehl C, Nathanielsz P. From Mice to Men: research models of developmental programming. *Journal of developmental origins of health and disease* 2013; **4**(1): 3.
21. Heim CM, Entringer S, Buss C. Translating basic research knowledge on the biological embedding of early-life stress into novel approaches for the developmental programming of lifelong health. *Psychoneuroendocrinology* 2019; **105**: 123-37.
22. Bouret S, Simerly R. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clinical genetics* 2006; **70**(4): 295-301.
23. Dearden L, Ozanne SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Frontiers in neuroendocrinology* 2015; **39**: 3-16.
24. Dorfman MD, Thaler JP. Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 2015; **22**(5): 325.
25. Timper K, Denson JL, Steculorum SM, et al. IL-6 Improves Energy and Glucose Homeostasis in Obesity via Enhanced Central IL-6 trans-Signaling. *Cell Rep* 2017; **19**(2): 267-80.
26. Timper K, Denson JL, Steculorum SM, et al. IL-6 improves energy and glucose homeostasis in obesity via enhanced central IL-6 trans-signaling. *Cell reports* 2017; **19**(2): 267-80.
27. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology* 2011; **11**(2): 85-97.
28. de Oliveira Leal V, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clinica Chimica Acta* 2013; **419**: 87-94.
29. Spooren A, Kolmus K, Laureys G, et al. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain research reviews* 2011; **67**(1-2): 157-83.
30. Campbell IL, Ertz M, Lim SL, et al. Trans-signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of interleukin-6 in the brain. *Journal of Neuroscience* 2014; **34**(7): 2503-13.
31. Sanders TR, Kim DW, Glendinning KA, Jasoni CL. Maternal obesity and IL-6 lead to aberrant developmental gene expression and deregulated neurite growth in the fetal arcuate nucleus. *Endocrinology* 2014; **155**(7): 2566-77.
32. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; **140**(6): 918-34.

33. Schmitz L, Kuglin R, Bae-Gartz I, et al. Hippocampal insulin resistance links maternal obesity with impaired neuronal plasticity in adult offspring. *Psychoneuroendocrinology* 2018; **89**: 46-52.
34. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; **444**(7121): 860-7.
35. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Current opinion in pharmacology* 2017; **37**: 35-40.
36. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation* 2011; **121**(6): 2111-7.
37. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation* 2012; **122**(1): 153-62.
38. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 2014; **158**(1): 15-24.
39. Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *Journal of Neuroscience* 2009; **29**(2): 359-70.
40. Kleinridders A, Schenten D, Könnner AC, et al. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell metabolism* 2009; **10**(4): 249-59.
41. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; **146**(10): 4192-9.
42. Baufeld C, Osterloh A, Prokop S, Miller KR, Heppner FL. High-fat diet-induced brain region-specific phenotypic spectrum of CNS resident microglia. *Acta neuropathologica* 2016; **132**(3): 361-75.
43. Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Frontiers in human neuroscience* 2016; **10**: 566.
44. Bar E, Barak B. Microglia roles in synaptic plasticity and myelination in homeostatic conditions and neurodevelopmental disorders. *Glia* 2019; **67**(11): 2125-41.
45. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 2008; **60**(3): 430-40.
46. Allen NJ, Barres BA. Glia—more than just brain glue. *Nature* 2009; **457**(7230): 675-7.
47. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature neuroscience* 2014; **17**(3): 400-6.
48. Schipul SE, Keller TA, Just MA. Inter-regional brain communication and its disturbance in autism. *Frontiers in systems neuroscience* 2011; **5**: 10.
49. Courchesne E, Pierce K. Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Current opinion in neurobiology* 2005; **15**(2): 225-30.

50. Lana D, Iovino L, Nosi D, Wenk GL, Giovannini MG. The neuron-astrocyte-microglia triad involvement in neuroinflammation mechanisms in the CA3 hippocampus of memory-impaired aged rats. *Experimental Gerontology* 2016; **83**: 71-88.
51. De Luca C, Colangelo AM, Virtuoso A, Alberghina L, Papa M. Neurons, glia, extracellular matrix and neurovascular unit: a systems biology approach to the complexity of synaptic plasticity in health and disease. *International journal of molecular sciences* 2020; **21**(4): 1539.
52. Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of aging* 2008; **29**(11): 1754-62.
53. Chan W, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia—new concepts. *Brain research reviews* 2007; **53**(2): 344-54.
54. Sierra A, de Castro F, del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 2016; **64**(11): 1801-40.
55. Matcovitch-Natan O, Winter DR, Giladi A, et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 2016; **353**(6301): aad8670.
56. Verkhatsky A. Astroglia in ageing. *Ageing and longevity* 2021; **2**(1): 1-15.
57. Sierra Saavedra A, Abiega Etxabe O, Shahraz A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. 2013.
58. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; **308**(5726): 1314-8.
59. Abiega O, Beccari S, Diaz-Aparicio I, et al. Neuronal hyperactivity disturbs ATP microgradients, impairs microglial motility, and reduces phagocytic receptor expression triggering apoptosis/microglial phagocytosis uncoupling. *PLoS biology* 2016; **14**(5): e1002466.
60. Li Y, Du X-f, Liu C-s, Wen Z-l, Du J-l. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental cell* 2012; **23**(6): 1189-202.
61. Li X, Thelwall M, Giustini D. Validating online reference managers for scholarly impact measurement. *Scientometrics* 2012; **91**(2): 461-71.
62. Meyer D, Bonhoeffer T, Scheuss V. Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron* 2014; **82**(2): 430-43.
63. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *Journal of Neuroscience* 2014; **34**(6): 2231-43.
64. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhatsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews* 2011; **91**(2): 461-553.
65. Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research Reviews* 2005; **48**(2): 196-206.
66. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature Reviews Immunology* 2007; **7**(5): 379-90.

67. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature medicine* 2017; **23**(9): 1018-27.
68. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British journal of pharmacology* 2016; **173**(4): 649-65.
69. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology* 2010; **10**(12): 826-37.
70. Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals* 2014; **7**(12): 1028-48.
71. Gosselin D, Skola D, Coufal NG, et al. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science* 2017; **356**(6344): eaal3222.
72. Fumagalli M, Lombardi M, Gressens P, Verderio C. How to reprogram microglia toward beneficial functions. *Glia* 2018; **66**(12): 2531-49.
73. Agarwal S, Yadav A, Chaturvedi RK. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders. *Biochemical and biophysical research communications* 2017; **483**(4): 1166-77.
74. Saijo K, Crotti A, Glass CK. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia* 2013; **61**(1): 104-11.
75. Song G, Suk K. Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 2017; **9**: 139. PUBMED; 2017.
76. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews immunology* 2003; **3**(1): 23-35.
77. Morris Jr SM. Enzymes of arginine metabolism. *The Journal of nutrition* 2004; **134**(10): 2743S-7S.
78. Gallagher I, Nair MG, Zang X, et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *The Journal of Immunology* 2007; **179**(6): 3926-36.
79. Ma TC, Campana A, Lange PS, et al. A large-scale chemical screen for regulators of the arginase 1 promoter identifies the soy isoflavone daidzein as a clinically approved small molecule that can promote neuronal protection or regeneration via a cAMP-independent pathway. *Journal of Neuroscience* 2010; **30**(2): 739-48.
80. Zhou X, Spittau B, Krieglstein K. TGFβ signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *Journal of neuroinflammation* 2012; **9**(1): 1-14.
81. Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience* 2006; **9**(7): 917-24.
82. Cardona AE, Li M, Liu L, Savarin C, Ransohoff RM. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *Journal of leukocyte biology* 2008; **84**(3): 587-94.
83. Limatola C, Ransohoff RM. Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014; **8**: 229.
84. Morari J, Anhe GF, Nascimento LF, et al. Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. *Diabetes* 2014; **63**(11): 3770-84.

85. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *science* 2011; **333**(6048): 1456-8.
86. Keilhoff G, Ludwig C, Pinkernelle J, Lucas B. Effects of *Gynostemma pentaphyllum* on spinal cord motor neurons and microglial cells in vitro. *Acta Histochemica* 2021; **123**(6): 151759.
87. Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *The Journal of experimental medicine* 1999; **189**(1): 63-73.
88. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schratzenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX: Alternatives to animal experimentation* 2009; **26**(2): 83-94.
89. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 2001; **32**(5): 1208-15.
90. Hendrickx DA, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *Journal of neuroimmunology* 2017; **309**: 12-22.
91. Sanders P, De Keyser J. Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain research reviews* 2007; **54**(2): 274-85.
92. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Progress in neurobiology* 1999; **57**(6): 563-81.
93. Schur EA, Melhorn SJ, Oh SK, et al. Radiologic evidence that hypothalamic gliosis is associated with obesity and insulin resistance in humans. *Obesity* 2015; **23**(11): 2142-8.
94. Yamada S, Nelson WJ. Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**: 267-94.
95. Larsen RS, Sjöström PJ. Synapse-type-specific plasticity in local circuits. *Current opinion in neurobiology* 2015; **35**: 127-35.
96. Haber M, Zhou L, Murai KK. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience* 2006; **26**(35): 8881-91.
97. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 2013; **77**(1): 10-8.
98. Frost JL, Schafer DP. Microglia: architects of the developing nervous system. *Trends in cell biology* 2016; **26**(8): 587-97.
99. Weinhard L, Di Bartolomei G, Bolasco G, et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nature communications* 2018; **9**(1): 1-14.
100. Kim H, Cho M, Shim W, et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Molecular psychiatry* 2017; **22**(11): 1576-84.

101. Szepesi Z, Manouchehrian O, Bachiller S, Deierborg T. Bidirectional microglia–neuron communication in health and disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 2018; **12**: 323.
102. 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. *Journal of Neuroscience* 2009; **29**(13): 3974-80.
103. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *Journal of Neuroscience* 1996; **16**(8): 2508-21.
104. Chamak B, Dobbertin A, Mallat M. Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience* 1995; **69**(1): 177-87.
105. Paolicelli RC, Ferretti MT. Function and dysfunction of microglia during brain development: consequences for synapses and neural circuits. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2017; **9**: 9.
106. Bilimoria PM, Stevens B. Microglia function during brain development: new insights from animal models. *Brain research* 2015; **1617**: 7-17.
107. Thion MS, Ginhoux F, Garel S. Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science* 2018; **362**(6411): 185-9.
108. Sellgren CM, Gracias J, Watmuff B, et al. Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nature neuroscience* 2019; **22**(3): 374-85.
109. Bliss T, Collingridge G, Morris R. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. The Royal Society; 2014. p. 20130129.
110. Kim S, Kim H, Um JW. Synapse development organized by neuronal activity-regulated immediate-early genes. *Experimental & molecular medicine* 2018; **50**(4): 1-7.
111. Madabhushi R, Kim T-K. Emerging themes in neuronal activity-dependent gene expression. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2018; **87**: 27-34.
112. Gallo FT, Katche C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub NV. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2018; **12**: 79.
113. Crapser JD, Spangenberg EE, Barahona RA, Arreola MA, Hohsfield LA, Green KN. Microglia facilitate loss of perineuronal nets in the Alzheimer's disease brain. *EBioMedicine* 2020; **58**: 102919.
114. Wen TH, Binder DK, Ethell IM, Razak KA. The perineuronal 'safety'net? Perineuronal net abnormalities in neurological disorders. *Frontiers in molecular neuroscience* 2018: 270.
115. Reinhard SM, Razak K, Ethell IM. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in cellular neuroscience* 2015; **9**: 280.
116. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells* 2020; **9**(5): 1076.
117. Zítka O, Kukacka J, Krizkov S, et al. Matrix metalloproteinases. *Current medicinal chemistry* 2010; **17**(31): 3751-68.

118. Arokiasamy S, Balderstone MJ, De Rossi G, Whiteford JR. Syndecan-3 in inflammation and angiogenesis. *Frontiers in Immunology* 2020; **10**: 3031.
119. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain research bulletin* 2012; **87**(1): 10-20.
120. Islam O, Gong X, Rose-John S, Heese K. Interleukin-6 and neural stem cells: more than gliogenesis. *Molecular biology of the cell* 2009; **20**(1): 188-99.
121. Taga T, Hibi M, Hirata Y, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989; **58**(3): 573-81.
122. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2016; **1863**(6): 1218-27.
123. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal* 1994; **300**(2): 281-90.
124. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2011; **1813**(5): 878-88.
125. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical journal* 2003; **374**(1): 1-20.
126. Wang H, Wang K, Zhong X, et al. Notable increased cerebrospinal fluid levels of soluble interleukin-6 receptors in neuromyelitis optica. *Neuroimmunomodulation* 2012; **19**(5): 304-8.
127. Yamamura T, Kleiter I, Fujihara K, et al. Trial of satralizumab in neuromyelitis optica spectrum disorder. *New England Journal of Medicine* 2019; **381**(22): 2114-24.
128. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, et al. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature biotechnology* 1997; **15**(2): 142-5.
129. Shafer LL, McNulty JA, Young MRI. Brain activation of monocyte-lineage cells: involvement of interleukin-6. *Neuroimmunomodulation* 2002; **10**(5): 295-304.
130. Chiang C-S, Stalder A, Samimi A, Campbell IL. Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Developmental neuroscience* 1994; **16**(3-4): 212-21.
131. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Current opinion in immunology* 2015; **34**: 75-82.
132. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* 2010; **6**(4): 193-201.
133. Bae-Gartz I, Janoschek R, Kloppe C-S, et al. Running exercise in obese pregnancies prevents IL-6 trans-signaling in male offspring. *Medicine and science in sports and exercise* 2016; **48**(5): 829-38.

134. Brunssen SH, Moy SS, Toews AD, McPherson CA, Harry GJ. Interleukin-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein (Hyper IL-6) effects on the neonatal mouse brain: possible role for IL-6 trans-signaling in brain development and functional neurobehavioral outcomes. *Brain, behavior, and immunity* 2013; **27**: 42-53.
135. Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004; **21**(4): 491-501.
136. Nowell MA, Richards PJ, Horiuchi S, et al. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *The Journal of Immunology* 2003; **171**(6): 3202-9.
137. Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine* 2000; **6**(5): 583-8.
138. Dai X-j, Li N, Yu L, et al. Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Cell Stress and Chaperones* 2015; **20**(2): 321-31.
139. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. Georg Thieme Verlag 2016.
140. Reineke A. Gentechnik: Grundlagen, Methoden und Anwendungen: UTB; 2004.
141. Erlich HA. Polymerase chain reaction. *Journal of clinical immunology* 1989; **9**(6): 437-47.
142. Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics: Springer Spektrum; 2013.
143. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods* 2001; **25**(4): 402-8.
144. Rehm H, Letzel T. Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics: Springer Spektrum; 2016.
145. Gey MH. Elektrophorese. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Springer; 2015: 209-44.
146. Aslanidis A, Karlstetter M, Scholz R, et al. Activated microglia/macrophage whey acidic protein (AMWAP) inhibits NF κ B signaling and induces a neuroprotective phenotype in microglia. *Journal of neuroinflammation* 2015; **12**(1): 1-14.
147. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Frontiers in cellular neuroscience* 2020; **14**: 198.
148. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation* 2014; **11**(1): 1-15.
149. März P, Herget T, Lang E, Otter U, Rose-John S. Activation of gp 130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. *European Journal of Neuroscience* 1997; **9**(12): 2765-73.
150. Kemler I, Fontana A. Role of I κ B α and I κ B β in the biphasic nuclear translocation of NF- κ B in TNF α -stimulated astrocytes and in neuroblastoma cells. *Glia* 1999; **26**(3): 212-20.

151. Lin HW, Levison SW. Context-dependent IL-6 potentiation of interferon-gamma-induced IL-12 secretion and CD40 expression in murine microglia. *Journal of neurochemistry* 2009; **111**(3): 808-18.
152. Gu F, Hata R, Ma YJ, et al. Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells. *Journal of neuroscience research* 2005; **81**(2): 163-71.
153. Brunello AG, Weissenberger J, Kappeler A, et al. Astrocytic alterations in interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor α double-transgenic mice. *The American journal of pathology* 2000; **157**(5): 1485-93.
154. Kwon S-H, Han J-K, Choi M, et al. Dysfunction of microglial STAT3 alleviates depressive behavior via neuron–microglia interactions. *Neuropsychopharmacology* 2017; **42**(10): 2072-86.
155. Cacci E, Ajmone-Cat MA, Anelli T, Biagioni S, Minghetti L. In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia* 2008; **56**(4): 412-25.
156. Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, et al. Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of aging* 2011; **32**(11): 2030-44.
157. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 2007; **10**(11): 1387-94.
158. Heese K. Functional repertoire of interleukin-6 in the central nervous system—a review. *Restorative Neurology and Neuroscience* 2017; **35**(6): 693-701.
159. Leibinger M, Zeitler C, Gobrecht P, Andreadaki A, Gisselmann G, Fischer D. Transneuronal delivery of hyper-interleukin-6 enables functional recovery after severe spinal cord injury in mice. *Nature communications* 2021; **12**(1): 1-14.
160. Chen E, Xu D, Lan X, et al. A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation-induced human neural progenitor cell differentiation. *Current molecular medicine* 2013; **13**(9): 1474-84.
161. Jostock T, Müllberg J, Özbek S, et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *European journal of biochemistry* 2001; **268**(1): 160-7.
162. Kaplin AI, Deshpande DM, Scott E, et al. IL-6 induces regionally selective spinal cord injury in patients with the neuroinflammatory disorder transverse myelitis. *The Journal of clinical investigation* 2005; **115**(10): 2731-41.
163. Fuller S, Steele M, Münch G. Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease—do they neglect their neurosupportive roles? *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 2010; **690**(1-2): 40-9.
164. Pascual O, Achour SB, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; **109**(4): E197-E205.
165. Von Bernhardi R, Eugenin J. Microglial reactivity to β -amyloid is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. *Brain research* 2004; **1025**(1-2): 186-93.

166. Ramírez G, Toro R, Döbeli H, von Bernhardt R. Protection of rat primary hippocampal cultures from A β cytotoxicity by pro-inflammatory molecules is mediated by astrocytes. *Neurobiology of disease* 2005; **19**(1-2): 243-54.
167. Tichauer J, Saud K, Von Bernhardt R. Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation* 2007; **14**(3-4): 168-74.
168. Eulendorf R, Dittrich A, Khouri C, et al. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *European journal of cell biology* 2012; **91**(6-7): 486-95.
169. Chen MJ, Ramesha S, Weinstock LD, et al. Microglial ERK signaling is a critical regulator of pro-inflammatory immune responses in Alzheimer's disease. *bioRxiv* 2019: 798215.
170. Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Wagner RL, Yolken RH. Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. *Brain, behavior, and immunity* 2001; **15**(4): 411-20.
171. Rudolph MD, Graham AM, Feczko E, et al. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. *Nature neuroscience* 2018; **21**(5): 765-72.
172. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature neuroscience* 2016; **19**(8): 987-91.
173. Morganti JM, Riparip L-K, Rosi S. Call off the dog (ma): M1/M2 polarization is concurrent following traumatic brain injury. *PloS one* 2016; **11**(1): e0148001.
174. Novak ML, Koh TJ. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *The American journal of pathology* 2013; **183**(5): 1352-63.
175. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *Journal of Neuroscience* 2007; **27**(40): 10714-21.
176. Park K, Lee D, Joe E, Kim S, Jin B. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *Journal of neuroscience research* 2005; **81**(3): 397-402.
177. Tao X, Li N, Liu F, Hu Y, Liu J, Zhang Y-M. In vitro examination of microglia-neuron crosstalk with BV2 cells, and primary cultures of glia and hypothalamic neurons. *Heliyon* 2018; **4**(8): e00730.
178. Katz R, Graeden E, Abe K, Attal-Juncqua A, Boyce MR, Eaneff S. Mapping stakeholders and policies in response to deliberate biological events. *Heliyon* 2018; **4**(12): e01091.
179. Bisht K, Sharma KP, Lecours C, et al. Dark microglia: a new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* 2016; **64**(5): 826-39.
180. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 2007; **204**(12): 3037-47.
181. Crane MJ, Daley JM, van Houtte O, Brancato SK, Henry Jr WL, Albina JE. The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PloS one* 2014; **9**(1): e86660.

182. Wójtowicz S, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB. The novel role of PPAR alpha in the brain: promising target in therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neurochemical Research* 2020; **45**(5): 972-88.
183. Garner KM, Amin R, Johnson RW, Scarlett EJ, Burton MD. Microglia priming by interleukin-6 signaling is enhanced in aged mice. *Journal of neuroimmunology* 2018; **324**: 90-9.
184. Xu H, Wang Z, Li J, et al. The polarization states of microglia in TBI: a new paradigm for pharmacological intervention. *Neural Plasticity* 2017; **2017**.
185. Xiong X, Xu L, Wei L, White RE, Ouyang Y-B, Giffard RG. IL-4 is required for sex differences in vulnerability to focal ischemia in mice. *Stroke* 2015; **46**(8): 2271-6.
186. Moser VA, Uchoa MF, Pike CJ. TLR4 inhibitor TAK-242 attenuates the adverse neural effects of diet-induced obesity. *Journal of neuroinflammation* 2018; **15**(1): 1-20.
187. Zhang J, Zheng Y, Luo Y, Du Y, Zhang X, Fu J. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/NF-κB pathways in BV2 cells. *Molecular immunology* 2019; **116**: 29-37.
188. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2010; **1803**(1): 3-19.
189. Zhang G, He J-L, Xie X-Y, Yu C. LPS-induced iNOS expression in N9 microglial cells is suppressed by geniposide via ERK, p38 and nuclear factor-κB signaling pathways. *International journal of molecular medicine* 2012; **30**(3): 561-8.
190. Lively S, Schlichter LC. The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion. *Journal of neuroinflammation* 2013; **10**(1): 1-14.
191. Cunha C, Gomes C, Vaz AR, Brites D. Exploring new inflammatory biomarkers and pathways during LPS-induced M1 polarization. *Mediators of Inflammation* 2016; **2016**.
192. Dubbelaar ML, Kracht L, Eggen BJ, Boddeke EW. The kaleidoscope of microglial phenotypes. *Frontiers in immunology* 2018: 1753.
193. Bayik D, Tross D, Klinman DM. Factors influencing the differentiation of human monocytic myeloid-derived suppressor cells into inflammatory macrophages. *Frontiers in Immunology* 2018; **9**: 608.
194. Buss C, Entringer S, Wadhwa PD. Fetal programming of brain development: intrauterine stress and susceptibility to psychopathology. *Science signaling* 2012; **5**(245): pt7-pt.
195. Graham AM, Rasmussen JM, Rudolph MD, et al. Maternal systemic interleukin-6 during pregnancy is associated with newborn amygdala phenotypes and subsequent behavior at 2 years of age. *Biological psychiatry* 2018; **83**(2): 109-19.
196. Rasmussen JM, Graham AM, Entringer S, et al. Maternal Interleukin-6 concentration during pregnancy is associated with variation in frontolimbic white matter and cognitive development in early life. *Neuroimage* 2019; **185**: 825-35.
197. Baron W, Colognato H, Ffrench-Constant C. Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function. *Glia* 2005; **49**(4): 467-79.

198. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; **7**(3): 194-206.
199. Vincent V, Van Dam AM, Persoons J, et al. Gradual inhibition of inducible nitric oxide synthase but not of interleukin-1 β production in rat microglial cells of endotoxin-treated mixed glial cell cultures. *Glia* 1996; **17**(2): 94-102.
200. Lynch MA. The multifaceted profile of activated microglia. *Molecular neurobiology* 2009; **40**(2): 139-56.
201. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 2018; **362**(6411): 181-5.
202. Derecki NC, Katzmarski N, Kipnis J, Meyer-Luehmann M. Microglia as a critical player in both developmental and late-life CNS pathologies. *Acta neuropathologica* 2014; **128**(3): 333-45.
203. Fan R, Xu F, Previti ML, et al. Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *Journal of Neuroscience* 2007; **27**(12): 3057-63.
204. Lotan I, McGowan R, Levy M. Anti-IL-6 therapies for neuromyelitis optica spectrum disorders: a systematic review of safety and efficacy. *Current Neuropharmacology* 2021; **19**(2): 220-32.
205. Chihara N, Aranami T, Sato W, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; **108**(9): 3701-6.
206. He Y, Yao X, Taylor N, Bai Y, Lovenberg T, Bhattacharya A. RNA sequencing analysis reveals quiescent microglia isolation methods from postnatal mouse brains and limitations of BV2 cells. *Journal of neuroinflammation* 2018; **15**(1): 1-13.
207. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular brain research* 1998; **57**(1): 1-9.
208. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C- γ -dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**(22): 20026-32.
209. Newcombe EA, Camats-Perna J, Silva ML, Valmas N, Huat TJ, Medeiros R. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* 2018; **15**(1): 1-26.
210. Eggen B, Raj D, Hanisch U-K, Boddeke H. Microglial phenotype and adaptation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 2013; **8**(4): 807-23.
211. Recasens M, Almolda B, Pérez-Clausell J, Campbell IL, González B, Castellano B. Chronic exposure to IL-6 induces a desensitized phenotype of the microglia. *Journal of Neuroinflammation* 2021; **18**(1): 1-22.
212. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* 2009; **27**: 119-45.
213. Caldeira C, Oliveira AF, Cunha C, et al. Microglia change from a reactive to an age-like phenotype with the time in culture. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014; **8**: 152.

214. Smith AM, Dragunow M. The human side of microglia. *Trends in neurosciences* 2014; **37**(3): 125-35.
215. Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, et al. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. *Neuron* 2016; **89**(1): 37-53.
216. 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.
217. Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *Journal of Neuroscience* 2005; **25**(36): 8240-9.
218. Walker DG, Lue L-F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's research & therapy* 2015; **7**(1): 1-9.
219. Loffreda S, Yang S, Lin H, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB journal* 1998; **12**(1): 57-65.
220. Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* 2012; **9**(1): 1-8.
221. Häusler KG, Prinz M, Nolte C, et al. Interferon- γ differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide-and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *European Journal of Neuroscience* 2002; **16**(11): 2113-22.
222. Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, DeLeo JA. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *Journal of neurochemistry* 2008; **107**(2): 557-69.
223. Das A, Kim SH, Arifuzzaman S, et al. Transcriptome sequencing reveals that LPS-triggered transcriptional responses in established microglia BV2 cell lines are poorly representative of primary microglia. *Journal of neuroinflammation* 2016; **13**(1): 1-18.
224. Tan Y-L, Yuan Y, Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular psychiatry* 2020; **25**(2): 351-67.
225. Pannell M, Meier MA, Szulzewsky F, et al. The subpopulation of microglia expressing functional muscarinic acetylcholine receptors expands in stroke and Alzheimer's disease. *Brain Structure and Function* 2016; **221**(2): 1157-72.
226. De Biase LM, Bonci A. Region-specific phenotypes of microglia: the role of local regulatory cues. *The Neuroscientist* 2019; **25**(4): 314-33.
227. Dirks WG, Fähnrich S, Estella IA, Drexler HG. Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* 2005; **22**(2): 103-9.
228. Perea G, Sur M, Araque A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014; **8**: 378.

229. Oliveira JF, Sardinha VM, Guerra-Gomes S, Araque A, Sousa N. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends in neurosciences* 2015; **38**(9): 535-49.
230. Jha MK, Seo M, Kim J-H, Kim B-G, Cho J-Y, Suk K. The secretome signature of reactive glial cells and its pathological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 2013; **1834**(11): 2418-28.
231. Tran DQ, Erika KT, Kim MH, Belsham DD. Diet-induced cellular neuroinflammation in the hypothalamus: Mechanistic insights from investigation of neurons and microglia. *Molecular and cellular endocrinology* 2016; **438**: 18-26.
232. Fogelman N, Canli T. Early life stress, physiology, and genetics: a review. *Frontiers in Psychology* 2019; **10**: 1668.
233. Cheray M, Joseph B. Epigenetics control microglia plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience* 2018: 243.
234. Catale C, Gironda S, Lo Iacono L, Carola V. Microglial function in the effects of early-life stress on brain and behavioral development. *Journal of Clinical Medicine* 2020; **9**(2): 468.
235. Dötsch J. Perinatal programming-myths, fact, and future of research. *Molecular and cellular pediatrics* 2014; **1**(1): 1-4.
236. Rodríguez-Gómez JA, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, et al. Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory response. *Cells* 2020; **9**(7): 1717.
237. Muffat J, Li Y, Yuan B, et al. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nature medicine* 2016; **22**(11): 1358-67.
238. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016; **113**(12): E1738-E46.
239. Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron* 2017; **94**(2): 278-93. e9.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Physiologische Aufgaben der Mikroglia im ZNS.....	19
Abbildung 2:	Morphologische Zustände der Mikrogliazellen	20
Abbildung 3:	M1- und M2-Polarisierung von Mikrogliazellen: Signalwege, Botenstoffe, Effekte.....	22
Abbildung 4:	IL-6 klassischer Signalweg über den membranständigen Rezeptor (a) und IL-6-Trans-Signaling über den löslichen sIL-6-Rezeptor (b)	30
Abbildung 5:	Versuchsmodell	32
Abbildung 6:	Maßstab in ImageJ (Set Scale-Funktion) zur Bestimmung der Fortsatzlänge der BV-2 Zellen.....	57
Abbildung 7:	Beispiel Fortsatzvermessung mittels manuellem Längenmaßtool und ROI-Manager (ImageJ)	58
Abbildung 8:	Gesamtmenge und Phosphorylierungsstatus von STAT3 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	62
Abbildung 9:	Relative mRNA-Expression von Socs3 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	63
Abbildung 10:	Gesamtmenge und Phosphorylierungsstatus von ERK in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	64
Abbildung 11:	Relative mRNA-Expression von Ii1 β in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	65
Abbildung 12:	Relative mRNA-Expression von Nfkb1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	66
Abbildung 13:	Relative mRNA-Expression von Tlr4 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	66
Abbildung 14:	Relative mRNA-Expression von Tnfa in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe CO vs. hIL-6).....	67
Abbildung 15:	Relative mRNA-Expression von iNos in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	67
Abbildung 16:	Relative mRNA-Expression von Arg1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	68
Abbildung 17:	Relative mRNA-Expression von c-Myc in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	68
Abbildung 18:	Relative mRNA-Expression von Ii-4 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	69
Abbildung 19:	Relative mRNA-Expression von Ii4R in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	69

Abbildung 20:	Relative mRNA-Expression von Ppar γ in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	70
Abbildung 21:	Relative Proteinexpression von TGF β in BV-2 Zellen nach 4h, 8h und 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	71
Abbildung 22:	Relative mRNA-Expression von Arc in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	72
Abbildung 23:	Relative mRNA-Expression von Homer1a in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	72
Abbildung 24:	Relative mRNA-Expression von Cx3cr1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	73
Abbildung 25:	Relative mRNA-Expression von Foxo1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	73
Abbildung 26:	Relative mRNA-Expression von c-Fos in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	74
Abbildung 27:	Relative mRNA-Expression von Egr1 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	74
Abbildung 28:	Relative Proteinexpression von vGLUT2 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h und 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	75
Abbildung 29:	Relative mRNA-Expression von Mmp9 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h.....	76
Abbildung 30:	Relative mRNA-Expression von (a) Timp1 und (b) Timp2 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=8/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	76
Abbildung 31:	Relative mRNA-Expression von (a) Syndecan1 und (b) Syndecan3 in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h (n=4/Gruppe, CO vs. hIL-6).....	77
Abbildung 32:	Relative mRNA-Expression von TenascinR in BV-2 Zellen nach 4h, 8h, 24h.....	77
Abbildung 33:	Immunhistochemische Intensitätsmessung.....	78
Abbildung 34:	IBA1-Intensitätsmessung als Maß der Aktivierung der BV-2 Mikrogliazellen.....	78
Abbildung 35:	Effekt von hIL-6 auf die Ramifizierung (weiße Pfeile) von BV-2 Zellen nach 24h Inkubation mit hIL-6.....	80
Abbildung 36:	Ramifizierung von BV-2 Zellen unter hIL-6-Stimulation vs. Kontrollgruppe.....	81
Abbildung 37:	Effekte von hIL-6 auf das Phagozytoseverhalten von BV-2 Mikrogliazellen.....	82
Abbildung 38:	Phagozytoseaktivität von BV-2 Zellen unter hIL-6-Stimulation vs., Kontrollgruppe: Positive Zellen entsprechen Zellen, die mit mehr als 10 Beads gefüllt sind.....	82

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Marker für M1- und M2-Polarisation der Mikrogliazellen.....	23
Tabelle 2:	Verwendete Zellen	33
Tabelle 3:	Verwendete Geräte und Software	33
Tabelle 4:	Verwendete Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 5:	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien	36
Tabelle 6:	Verwendete Primer und Sonden Taqman Real-Time PCR.....	38
Tabelle 7:	Verwendete Primer und Sonden SYBR Green I Real-Time PCR	40
Tabelle 8:	Verwendete Antikörper Western Blot	41
Tabelle 9:	Verwendete Antikörper Immunhistochemie	42