

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROFESSOR DOKTOR THOMAS LANGMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**EFFEKTE VON INTERFERON-B
AUF TRANSKRIPTION UND FUNKTION
VON MIKROGLIA**

**Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Patricia Weber**

2013

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROFESSOR DOKTOR THOMAS LANGMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**EFFEKTE VON INTERFERON-B
AUF TRANSKRIPTION UND FUNKTION
VON MIKROGLIA**

**Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Patricia Weber**

2013

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Juli 2011 bis Februar 2012 am Lehrstuhl für Humangenetik der Universität Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Thomas Langmann durchgeführt.

Eingereicht am: 07.01.2013

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

1. Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Langmann

2. Gutachter:

Prof. Dr. André Gessner

Tag der mündlichen Prüfung:

26.04.2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung der Arbeit	1
1.2 Mikroglia.....	1
1.2.1 Funktionen der Mikroglia im zentralen Nervensystem und der Netzhaut....	2
1.2.2 Mikroglia und Autoimmunerkrankungen	4
1.3 Interferon-β	6
1.3.1 Wirkung und Verwendung in der Biomedizin.....	8
1.3.2 IFNβ-Effekt auf Mikrogliazellen	10
2. Material	11
2.1 Zellen	11
2.2 Oligonukleotide und Taqman®-Sonden.....	11
2.3 Enzyme	13
2.4 Chemikalien und Kit-Systeme	13
2.5 Medien, Puffer und Lösungen	14
2.6 Verbrauchsmaterialien	15
2.7 Geräte und Software	15
3. Methoden.....	17
3.1 Zellkultur	17
3.1.1 Zelllinie BV-2	17
3.1.2 Weiterkultur	17
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellernte	17
3.1.4 Kryokonversierung von Zellen	18
3.2 Mauslinien und Haltung.....	18
3.2.1 Präparation und Kultivierung von <i>ex vivo</i> Mikroglia	19
3.3 <i>In vitro</i> Stimulationen mit LPS und IFNβ	19
3.4 RNA-spezifische molekularbiologische Methoden	20
3.4.1 RNA-Isolierung	20
3.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	21
3.4.3 RNA Qualitätskontrolle mit dem Agilent Bioanalyzer	21
3.4.4 RNA-Mikroarray Analyse	22
3.4.5 Bioinformatische Datenanalyse	23

3.4.6 Reverse Transkription	24
3.4.7 Quantitative Realtime PCR mit Taqman Technologie	25
3.4.8 Relative Quantifizierung	26
3.5 Funktionsassays	28
3.5.1 Migrations-Assay	28
3.5.2 Phagozytose-Assay	29
3.6 Morphologische Methoden	29
3.6.1 Durchlichtmikroskopie	29
3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie und Immunzytochemie	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Interferon- β Effekt auf BV-2 Mikroglia	31
4.1.1 Transkriptionelle Veränderungen nach IFN β -Stimulation: Genomweite Expressionsanalyse und qRT-PCR-Validierung	31
4.1.2 Integrative Analyse der genomweiten Expressionsaktivitäten	35
4.2 Genvalidierung des IFN β -Effekts in primären Mikrogliazellen des Gehirns ...	36
4.3 Interferon- β Einfluss auf Mikrogliafunktionen	38
4.3.1 IFN β -Effekt auf das Migrationsverhalten von BV-2 Mikroglia	38
4.3.2 IFN β -Effekt auf die Phagozytoseaktivität von BV-2 Mikroglia	40
4.4 Änderungen der Aktinfilamentanordnung durch Interferon- β : Immunzytochemie in BV-2 Mikroglia	43
5. Diskussion	46
5.1 Das immunmodulatorische Potential von Interferon- β	46
5.2 Keine signifikante Beeinflussung des Migrationspotentials durch LPS- oder IFN β -Stimulation	50
5.3 Gesteigerte Phagozytoseaktivität unter IFN β - und LPS-Stimulierung	51
5.4 Induktion eines alternativen aktivierte Mikrogliaphänotyps	52
6. Zusammenfassung und Ausblick	54
Literaturverzeichnis	56
Abkürzungsverzeichnis	65
Abbildungsverzeichnis	69
Tabellenverzeichnis	70

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Der Erforschung der Rolle von Mikroglia bei hereditären Netzhautdystrophien gilt das hauptsächliche Interesse in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Langmann. Mikroglia, Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Retina, scheinen in ihrer chronisch aktivierte Form bei verschiedenen degenerativen ZNS- und Netzhauterkrankungen eine zentrale Funktion einzunehmen (Langmann, 2007, Schuetz and Thanos, 2004, Perry, 2010). Neben der Erforschung der genauen Pathomechanismen dieser chronischen Mikrogliaaktivierung und deren Auswirkung auf verschiedene degenerative Erkrankungen, ist ein Ansatz der Arbeitsgruppe die zielgerichtete Modulation dieser Immunzellen. So konnten zum Beispiel bereits die antiinflammatorischen sowie neuroprotektiven Eigenschaften von Docosahexaensäure (Ebert et al., 2009), Luteolin (Dirscherl et al., 2010) und Curcumin (Karlstetter et al., 2011) nachgewiesen werden.

In dieser Dissertation sollte der Effekt von Interferon- β (IFN β) auf Mikrogliazellen untersucht werden. Eine der Eigenschaften von chronisch aktivierte Mikroglia scheint die Unterhaltung einer chronischen Inflammation im ZNS und der Netzhaut zu sein mit konsekutivem Anstoß und Fortsetzung eines degenerativen neuronalen Prozesses (Schuetz and Thanos, 2004). Es sollte nun eine mögliche Dämpfung der Inflammation bei gleichzeitiger Steigerung von neuroprotektiven Eigenschaften der Mikroglia durch IFN β gezeigt werden. Ein positiver Effekt von IFN β auf den Krankheitsverlauf konnte in der neurodegenerativen Erkrankung Multiple Sklerose (MS) sowie in dem Tiermodell Experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE) bereits nachgewiesen werden (Paty and Li, 1993, Rudick and Cutter, 2007, Galligan et al., 2010). Beides sind Erkrankungen in denen überaktivierte Mikroglia beteiligt sind (Lassmann, 2008).

1.2 Mikroglia

Mikrogliazellen, auch Hortega-Zellen genannt, wurden 1932 erstmals von del Rio Hortega auf lichtmikroskopischem Level mittels Silberfärbung beschrieben. Seitdem hat es grosse Fortschritte in der Erforschung dieser Zellen gegeben, auch wenn ihre

genaue Rolle, vor allem in Zusammenhang mit Krankheiten, noch nicht exakt untersucht ist. Bei diesen handelt es sich um residentielle Makrophagen des zentralen Nervensystems und der Netzhaut und sie zählen zum mononukleären Phagozytosesystem (Oehmichen, 1982). Sie werden mit den Astrozyten und Oligodendrozyten in die Gruppe der Neuroglia zusammengefasst, aber im Gegensatz zu diesen Zelltypen stammen Mikrogliazellen von hämatopoetischen Vorläuferzellen ab (Saijo and Glass, 2011). Im Gehirn wandern die Mikrogliazellen hauptsächlich vor der Bildung der Blut-Hirnschranke ein (Ling and Wong, 1993), aber ein kleinerer Teil der Einwanderung findet noch 5-10 Tage postnatal statt (Imamoto and Leblond, 1978). Ähnlich läuft dieser Prozess in der Netzhaut ab. Während der Entwicklung der Netzhaut wandern die Mikrogliazellen in zwei Wellen ein. Die frühe Wanderung findet vor Bildung der Blutgefäße über das Corpus ciliare statt, eine spätere Einwanderungswelle erfolgt entlang der sich bildenenden retinalen Blutgefäße. Der Unterschied zwischen diesen Mikrogliapopulationen scheint hauptsächlich in der Expression von spezifischen Makrophagen-Unterscheidungsmarkern zu liegen. Die frühe Einwanderungsgruppe exprimiert diese nicht und wird als die parenchymale, ramifizierte Mikroglia angesehen. Die über die Blutgefäße eingetretenen Mikrogliazellen sind dagegen Makrophagen-Antigen positiv und dem perivaskulären Raum zugeordnet (Provis et al., 1996).

Mikrogliazellen unterscheiden sich aber nicht nur durch ihre Herkunft von anderen Gliazellen, wie Astrozyten und Oligodendrozyten, sondern auch durch ihre Morphologie, Genexpressionsmuster und Funktionen. Darauf soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

1.2.1 Funktionen der Mikroglia im zentralen Nervensystem und der Netzhaut

Die Aufgaben von Mikroglia sind vielfältig, aber übergeordnet lassen sie sich als Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Netzhaut bezeichnen. Um den verschiedenen Ansprüchen gerecht zu werden gibt es unterschiedliche Aktivitätsstadien, die sich in unterschiedlicher Morphologie und Expression von Oberflächenmarkern äussern. Grundsätzlich unterscheidet man ruhende, ramifizierte von aktivierte, amöboiden Mikrogliazellen (siehe Abbildung 1). Wenngleich es Bemühungen gibt die Bezeichnung „ruhend“ durch „überwachend“ zu ersetzen, da die ramifizierten Mikrogliazellen keineswegs inaktiv sind, sondern

permanent ihre Umgebung scannen um auf kleinste Änderungen ihrer Mikroumwelt reagieren zu können (Hanisch and Kettenmann, 2007, Nimmerjahn et al., 2005). Kommt es zu einer Aktivierung, ändern die Mikrogliazellen ihr Aussehen zu einer mehr amöboiden Form durch das Einziehen ihrer Protrusionen.

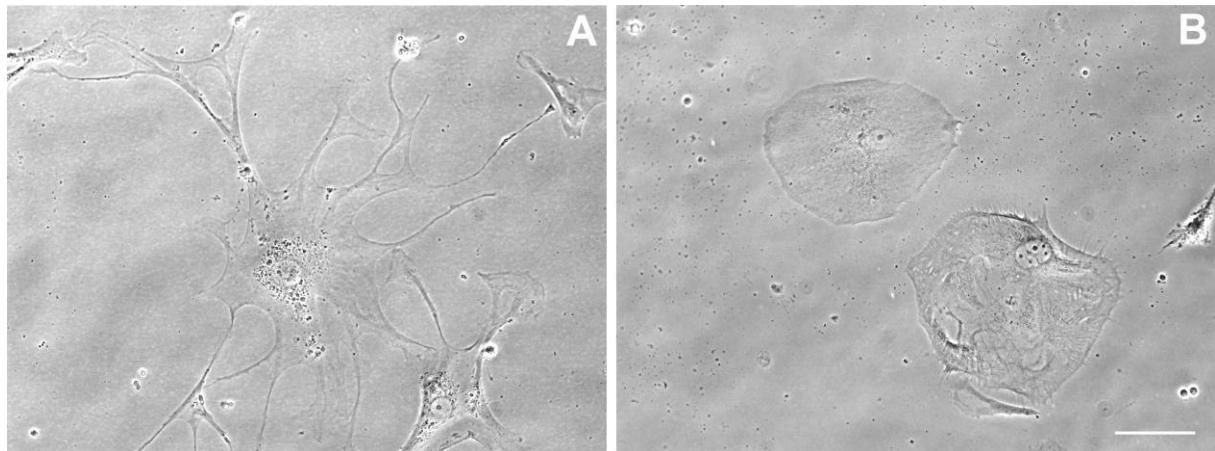


Abbildung 1: Primäre Mikrogliazellen aus dem Gehirn von MAFIA-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund mit dem Genotyp Wildtyp. Bild A zeigt zwei ramifizierte, Bild B zwei amöboide Zellen. Aufgenommen in 4x Vergrößerung. Der Skalierungsbalken repräsentiert eine Länge von 10 mm.

Diese klassische Einteilung der Aktivierungszustände in ruhend, ramifiziert und aktiviert, amöboid wird seit einigen Jahren um weitere phänotypische und funktionelle Erscheinungsbilder von Mikrogliazellen erweitert. Unter anderem konnte in unserer Arbeitsgruppe ein durch CSPG-DS induzierter, alternativ aktiverter Phänotyp gezeigt werden (Ebert et al., 2008). Auch andere Gruppen konnten verschiedene Aktivierungszustände durch unterschiedliche Stimuli in unterschiedlichen Dosen induzieren (Hanisch and Kettenmann, 2007). Diese Vielfalt in Funktion und Phänotyp spiegelt die Eigenschaft von Mikroglia wider, sich unterschiedlichsten Umgebungsänderungen anzupassen und auch im Rahmen von Erkrankungen verschiedene Rollen wahrzunehmen.

Neben der Änderung des Erscheinungsbilds wandelt sich ebenfalls das Profil der Oberflächenmarker. Ruhende Mikrogliazellen exprimieren selten MHC-Moleküle. Neu auftretende Expression von Oberflächenproteinen wie F4/80, Komplement Rezeptor 3, MHC-II oder CD68 können als frühe Indikatoren für Mikrogliaaktivierung genutzt werden, da durch Immunhistochemie und Immunfluoreszenz-Färbung diese Marker häufig noch vor morphologischen Änderungen detektierbar sind (Kreutzberg, 1996, Streit et al., 1999). Viele dieser Oberflächenproteine sind Rezeptoren für das

Komplementsystem, Zyro- und Chemokine, Antikörper und Adhäsionsmoleküle, welche den Mikrogliazellen dazu dienen den Gleichgewichtszustand ihrer Umgebung zu überwachen (Streit, 2002). Detektieren die „überwachenden“, ramifizierten Mikrogliazellen eine Störung der Homöostase, ändert sich nicht nur die Morphologie und die Expression von Oberflächenmarkern, sondern auch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren, wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Durch infektiöse, traumatische oder andere Stimuli getriggert, transformieren sich die Mikrogliazellen der betroffenen Geweberegion zur aktivierte, amöboiden Form und produzieren proinflammatorische Mediatoren um Pathogene oder beschädigte Zellen zu entfernen (Saijo and Glass, 2011). Dazu zählen unter anderem Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Stickstoffmonoxid (NO) und die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Merson et al., 2010, Smith et al., 2011). Die proinflammatorischen Mediatoren wirken häufig neurotoxisch, entweder direkt oder über die Aktivierung von zytotoxischen Zellmechanismen (Merson et al., 2010, Rasmussen et al., 2007). Dieser Aspekt der Mikrogliaaktivierung ist insbesondere bei länger einwirkenden Störungen der Homöostase, wie zum Beispiel Umweltgiften, Autoimmunerkrankungen oder neurodegenerativen Erkrankungen, problematisch. Während eine kurzfristige Aktivierung als neuroprotektiv gilt, kommt es bei einer chronischen Überaktivierung der Mikrogliazellen durch eine chronische, in diesem Falle pathologische, Entzündungsantwort zur Degeneration oder Neoplasie von gesundem Gewebe (Glass et al., 2010, Perry et al., 2010). Auf die Rolle von Mikrogliaaktivierung im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wird nun im folgenden Unterpunkt detailliert eingegangen.

1.2.2 Mikroglia und Autoimmunerkrankungen

Unter Autoimmunität versteht man die Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen. Sie tritt auf wenn die antigenselektive Immunabwehr die Fähigkeit verliert „Selbst“ von „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden. Auslöser dafür sind eine Reihe von Faktoren. Neben der genetischen Prädisposition sind auch chemische und physikalischen Noxen und Infekte von Bedeutung. Die exakte Ätiopathogenese von Autoimmunität ist umstritten, aber diverse Studien konnten Mikroglia, neben dysregulierten T-Zellen, als einen wichtigen Baustein in der Unterhaltung von neurodegenerativen Autoimmunerkrankungen identifizieren.

Zum Beispiel konnten aktivierte Mikroglia und erhöhte Level von proinflammatorischen Zytokinen in Alzheimerpatienten nachgewiesen werden (Lue et al., 2001, Rogers and Lue, 2001) und weitere Studien untermauern ebenfalls den Zusammenhang von chronischer Inflammation, aktivierten Mikroglia und Morbus Alzheimer (Smith et al., 2011).

Eine weitere neurodegenerative Erkrankung des ZNS mit einer autoimmunologischen Komponente in ihrer Ätiopathologie ist Morbus Parkinson. Dabei gehen dopaminerige Neuronen in der Substantia nigra pars compacta zugrunde. Bereits 1988 konnte McGeer et al. Mikrogliaaktivierung in dieser Region des Mittelhirns von Parkinsongehirnen nachweisen (McGeer et al., 1988). Später gelang der Nachweis einer Korrelation zwischen Mikrogliaaktivierung und dem Verlust von dopaminerigen Neuronen im Mittelhirn, einhergehend mit erhöhten proinflammatorischen Zytokinleveln (Sawada et al., 2006).

Als letztes Beispiel einer neurodegenerativen Autoimmunerkrankung des ZNS, in der sich chronische Mikrogliaaktivierung zusammen mit entzündlichen Infiltraten als ein essentieller Bestandteil der Progression des Krankheitsverlaufs herausgestellt hat (Kutzeligg et al., 2005), wird Multiple Sklerose (MS) näher erläutert. Multiple Sklerose beginnt als fokal lokalisierte inflammatorische Erkrankung des ZNS mit Demyelinisierungsherden. ZNS-Gewebe von MS-Patienten zeigt histopathologisch eine erhebliche Heterogenität, aber durchgängig findet sich der Einfluss des adaptiven und des angeborenen Immunsystems. Zusammen wirken sie als zentrale Vermittler der Gewebeschädigung: Die adaptive Immunabwehr durch die Rekrutierung von autoaggressiven T-Zellen und die angeborene Immunabwehr durch die Ansammlung zahlreicher aktivierter Mikrogliazellen und Makrophagen (Hendriks et al., 2005, Lassmann, 2008). Allerdings ist die Rolle von Mikroglia in Multipler Sklerose nicht per se als schädlich einzustufen. Neben der Demyelinisierung ist ein weiteres Charakteristikum der MS die spontane Regeneration und partielle Remyelinisierung von geschädigten Axonen (Lassmann et al., 1997, Patani et al., 2007). Mikroglia unterstützen diesen neuronalen Reparaturprozess über Immunmodulation und die Induktion von Remyelinisierung durch die Phagozytose von Myelintrümmern und apoptischen Zellen (Heuss et al., 2012, Merson et al., 2010).

Aber nicht nur im ZNS wird die Rolle von Mikrogliaaktivierung im Rahmen von Autoimmunerkrankungen bzw. autoimmunologischer Mechanismen

neurodegenerativer Erkrankungen immer genauer definiert. Zunehmend wird auch der Zusammenhang zwischen retinalen neurodegenerativen Erkrankungen und Mikroglia analysiert. Uveoretinitis, Glaukom, licht-induzierte retinale Degeneration, diabetische Retinopathie und hereditäre Netzhautdystrophien wie X-gebundene Retinoschisis und Retinitis Pigmentosa sind nur eine Auswahl an Netzhauterkrankungen denen eine autoimmunologische Komponente in ihrer Ätiopathologie einhergehend mit gesteigerter Mikrogliaaktivität zugesprochen wird (Chen et al., 2004, Gehrig et al., 2007, Gupta et al., 2003, Kraday et al., 2005, Rao et al., 2003, Steele et al., 2006).

Da Mikroglia in der Pathogenese und dem Progress neurodegenerativer Erkrankungen des ZNS und der Retina offensichtlich eine wichtige bis zentrale Position einnehmen, liegt es nahe diese als potentielles Ziel für pharmakologische Therapien in Betracht zu ziehen.

1.3 Interferon- β

Interferon- β (IFN β) gehört zur Familie der Typ I Interferone und ist ein von Fibroblasten gebildetes körpereigenes Zytokin, welches intra- und interzelluläre Netzwerke stimuliert. Diese wiederum regulieren die Abwehr gegen virale Infektionen, verstärken die angeborene und erworbene Immunantwort und modulieren das Überleben und den Tod von normalen sowie Tumorzellen (Borden et al., 2007).

Normalerweise sind die IFN-Gene transkriptional stummgeschaltet. Mikrobielle Nukleinsäuren, Fette, Polysaccharide oder Proteine induzieren über TLRs (*toll-like receptors*) mittels verschiedener Transkriptionsfaktoren die Produktion von Interferonen (Borden et al., 2007). Die wichtigsten Faktoren sind die Proteine des IFN regulatorischen Faktors (IRF), vor allem IRF3 und IRF7, und die NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Familie (Honda et al., 2006, Tenoever et al., 2007). Ihre Wirkung entfalten Typ I Interferone über einen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus den Ketten IFNAR 1 und IFNAR 2. Durch Bindung von IFN kommen die IFNAR2 assoziierte Januskinase 1 (Jak1) und die IFNAR 1 assoziierte Tyrosinkinase 2 (Tyk2) in direkte Nachbarschaft voneinander. Die Proteinkinasen aktivieren sich wechselseitig und tyrosinphosphorylieren anschließend STAT 1 und 2 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Die Transkriptionsfaktoren bilden dann zusammen mit IRF9 (*Interferon Regulatory*

Factor 9) den ISG3-Transkriptionsfaktorkomplex (*interferon stimulated gene factor 3*). ISG 3 wandert in den Zellkern ein und aktiviert dort die Expression einer Reihe von IFN-stimulierten Genen (ISGs) mit einer ISRE-Sequenz (*Interferon-Responsive Sequence Element*) in ihrer Promotorregion (siehe Abbildung 2) (Kalvakolanu, 2003, Uze et al., 2007).

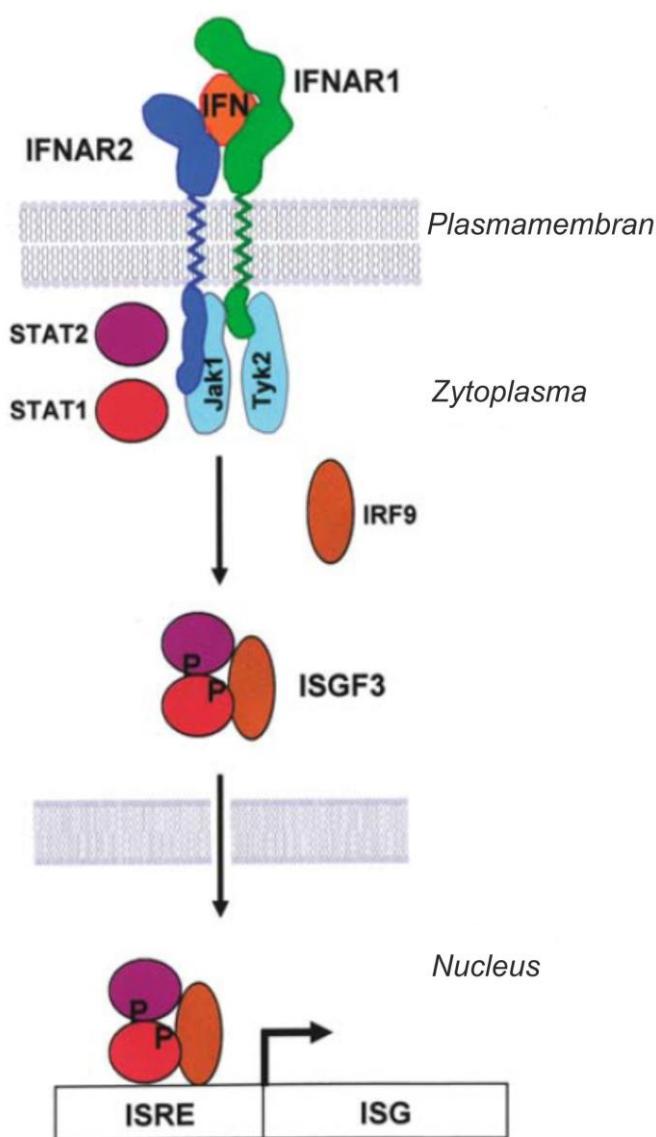


Abbildung 2: Aktivierung des Jak/STAT- Signalwegs durch Typ I Interferone. IFNAR1- und IFNAR2-assoziierte Tyk2 und Jak1 phosphorylieren STAT1 und 2. Diese formen mit IRF9 den ISG3-Transkriptionsfaktorkomplex, der in den Nucleus wandert und die Transkription einer grossen Anzahl von ISGs mit ISRE-Sequenz im Promotor aktiviert. Modifiziert nach (Uze et al., 2007).

Neben IFN β gehören noch weitere Subtypen (etliche α , ω , κ , ϵ und τ) zur Typ 1 Interferonfamilie, welche alle den eben beschriebenen Rezeptoren nutzen. Trotzdem erzielen die Subtypen unterschiedliche Effekte. So konnte gezeigt werden, dass IFN β

gegenüber IFN α 2 eine 100-fach gesteigerte Potenz in der Induktion von Apoptose in humanen Tumorzellen besitzt (Leaman et al., 2003, Vitale et al., 2006) und, dass IFN α 8 im Gegensatz zu IFN α 2 die Motilität von T-Zellen nicht beeinflussen kann (Foster et al., 2004). Es wird die Hypothese vertreten, dass Gründe für die funktionalen Unterschiede der IFN-Subtypen in der unterschiedlichen Affinität und Kinetik in der Interaktion mit den Rezeptor-Untereinheiten liegt (Jaitin et al., 2006, Uze et al., 2007).

Die Jak/STAT-Signaltransduktion erklärt viele, aber nicht alle der biologischen Effekte von IFN β . Neben dem klassischen Jak/STAT-Signalweg sind weitere Elemente der Signaltransduktion für selektive IFN β -Geninduktion identifiziert worden. Als akzessorische Transkriptionswege für IFN β gelten unter anderem die PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3-kinase), der NF- κ B- und die p38 MAPK (Mitogenaktivierte Proteinkinase)- Signalkaskade (Rani and Ransohoff, 2005).

1.3.1 Wirkung und Verwendung in der Biomedizin

Nach seiner Entdeckung wurde IFN β zunächst als Antivirussstatikum bei chronischen Hepatitisen eingesetzt, seine Wirkung stellte sich aber zunächst als wenig vielversprechend heraus (Weimar et al., 1977). Heutzutage wird IFN β dennoch als Antivirussstatikum mit Breitbandwirkung genutzt und kommt bei verschiedenen Viruserkrankungen zum Einsatz (Hosseini-Moghaddam et al., 2009, Kuhl et al., 2003).

Seine Bestimmung als *das* Multiple Sklerose (MS)-Therapeutikum fand es erst 1993, als die IFNB MS Studiengruppe und UBC MS/MRI Studien Gruppe als erste zeigen konnten, dass systemisches, rekombinantes IFN β den natürlichen Verlauf von MS positiv modifiziert und dieser Effekt mittels MRT (Magnet-Resonanz-Tomographie) dokumentiert werden konnte (Paty and Li, 1993). Und auch viele weitere Studien konnten die positive Wirkung von IFN β auf MS belegen (Reduzierung der Schübe, verringertes Fotschreiten von Behinderung und MRT-Nachweis gedämpfter Krankheitsaktivität) (Kappos et al., 2007, Kappos et al., 2006, Mendes and Sa, 2011, Sanford and Lyseng-Williamson, 2011).

Obwohl die genauen Wirkmechanismen von IFN β nach über 50 Jahren Forschung immer noch nicht komplett verstanden sind, gibt es fundierte Erkenntnisse, dass der Effekt im Rahmen der Multiplen Sklerose auf dem Einfluss von wichtigen Entzündungsprozessen beruht. So wird angenommen das IFN β die Aktivierung von

T-Zellen, einschließlich der autoreaktiv gegen Myelin gerichteten, reduziert und durch Hemmung der Expansion von T-Zellklonen antiproliferativ wirkt (Mendes and Sa, 2011). Dass die autoaggressiven T-Zellen überhaupt ins ZNS gelangen, liegt an der endothelialen Blut-Hirn-Schrankenstörung und stellt einen der ersten Schritte in der Pathogenese von Multiple Sklerose dar. IFN β schützt die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke vor MS-induzierter Apoptose und verhindert so ein weiteres Eindringen von schädigenden T-Zellen und anderen Noxen (Haghjooy Javanmard et al., 2012). Aber auch über seine antiviralen Eigenschaften wirkt IFN β positiv in Multipler Sklerose. So konnte unter anderem über das Messen der Humanes-Herpes-Virus-6 (HHV-6)-Last in MS-Patienten gezeigt werden, dass eine reduzierte Virusreaktivierung mit einer geringeren Schubrate assoziiert ist (Garcia-Montojo et al., 2007). Dies passt zu den gängigen Erkenntnissen, dass viele Autoimmunerkrankungen mit Viruserkrankungen assoziiert sind und durch diese ausgelöst oder weiter unterhalten werden (Delogu et al., 2011, Fujinami et al., 2006). Weiterhin moduliert IFN β die Immunantwort über die Hemmung der Antigenpräsentation (Kato et al., 1992, Yong et al., 1998) und durch eine veränderte Zytokin- und Chemokinausschüttung. MS gilt als Th1-vermittelte Erkrankung und durch Behandlung mit IFN β zeigt sich eine Reduktion von Th1-induzierten Zytokinen bei gleichzeitiger Steigerung der Th2-vermittelten Immunreaktionen (Mendes and Sa, 2011, Kozovska et al., 1999, McRae et al., 1998). Auch ein neuroprotektiver Effekt von IFN β wird angenommen, so zeigten sich unter IFN β -Behandlung Axonschädigungen partiell reversibel und es kam zu einer Ausschüttung von Nervenwachstumsfaktoren (Dhib-Jalbut and Marks, 2006, Narayanan et al., 2001). Sämtliche Effekte von IFN β zu beschreiben würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, darum soll im nächsten Abschnitt speziell auf die bereits bestehenden Erkenntnisse der IFN β -Wirkung auf Mikrogliazellen eingegangen werden.

1.3.2 IFN β -Effekt auf Mikrogliazellen

Dass Mikroglia im Krankheitsprozess verschiedener autoimmunologischer und neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind, wurde bereits unter 1.2.2 erläutert. Dennoch sind Mikrogliazellen ein erst relatives neues Ziel für pharmakologische Therapien. Dementsprechend wenig ist über die konkreten Effekte von IFN β auf Mikrogliazellen in der Literatur zu finden.

Prinz et al. konnten in EAE (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis), dem etablierten Mausmodell der MS, zeigen, dass die für ZNS-Autoimmunität entscheidenden IFNAR (Typ I IFN-Rezeptor)-abhängigen myeloischen Zellen die Monozyten und Makrophagen, und ihr ZNS-spezifisches Äquivalent die Mikroglia, sind. IFN β könnte so über den IFNAR-Signalweg modulierend auf Mikroglia wirken und die inflammatorische Demyelinisierung unterdrücken (Prinz et al., 2008). Dies passt zu den Ergebnissen von Teige et al., dass eine IFN β -Gendeletion zu verstärkter EAE führt mit extensiver Mikrogliaaktivierung in der Histopathologie und gesteigerter TNF α -Produktion in IFN β -KO-Mäusen (Teige et al., 2003). Die durch aktivierte T-Zellen induzierte Mikrogliaproduktion von TNF α , einem stark proinflammatorischen Zytokin, kann über Hemmung dieser Interaktion durch IFN β reduziert werden (Chabot et al., 1997).

Es besteht also Bedarf an einer genaueren Untersuchung der Wirkung von IFN β auf Mikroglia und es ergibt sich die Frage ob die bereits gefundenen positiv modulierenden Effekte von IFN β auf Mikrogliazellen nicht auch auf andere neurodegenerative Erkrankungen mit Mikrogliaaktivierung, zum Beispiel in der Retina, übertragbar sind.

2. Material

2.1 Zellen

Stamm / Zelltyp	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
ex vivo Mikroglia aus Gehirn	primäre Mauszellen	Isolation aus C57BL/6 Mäusen (MAFIA, MAFIA/ Rs1h ^{-/Y} , Rs1h ^{-/Y} und Wildtyp)
BV-2	Zelllinie Mikroglia-ähnlicher Tumor-Mauszellen, induziert mit v-raf/v-myc onkogen tragender Retrovirus (J2)	Prof. Ralph Lucius (Blasi et al., 1990)

Tabelle 1: Verwendete Zellen, ihre Eigenschaften und Herkunft

2.2 Oligonukleotide und Taqman®-Sonden

Gen	Accession No.	Primer	Sequenz (5'-3')	Roche Probe No.
Apol9a	NM_173786.1	F	CCTGTTAGGTAAGTTGAGCCTCTT	34
		R	TGGATGGTGTCTGCTCTC	
Apol9b	NM_173743.3	F	AACATGGCAAGCAGTGGATA	83
		R	CGCTGTCAGTCCCTCAGA	
Arginase1	NM_007482.3	F	CCTGAAGGAACTGAAAGGAAAG	2
		R	TTGGCAGATATGCAGGGAGT	
Atp5b	NM_016774	F	GGCACAAATGCAGGAAAGG	77
		R	TCAGCAGGCACATAGATAGCC	
Ccl2	NM_011333.2	F	CATCCACGTGTTGGCTCA	62
		R	GATCATCTTGCTGGTAATGAGT	
Cd11b	NM_001082960.1	F	CAATAGCCAGCCTCAGTGC	76
		R	GAGCCCAGGGGAGAAGTG	
Cd80	NM_009855.2	F	TCGTCTTCACAAGTGTCTTCAG	91
		R	TTGCCAGTAGATTCCGTCTTC	
Cmpk2	NM_020557.4	F	AAAGAATCAACCAACTTCCTGTT	76
		R	GGCCTCCACTCACCTCAGTA	
Cxcl1	NM_008176.3	F	AGACTCCAGCCACACTCCAA	83
		R	TGACAGCGCAGCTCATTG	
Cxcl10	NM_021274.1	F	GCTGCCGTCTTCTGC	3
		R	TCTCACTGGCCCGTCATC	
Cxcl2	NM_009140.2	F	AAAATCATCCAAAAGATACTGAAACAA	26
		R	CTTTGGTTCTTCCGTTGAGG	
Icam-1	M31585.1	F	CCCACGCTACCTCTGCTC	81
		R	GATGGATACCTGAGCATCACC	

Il6	NM_	F	GATGGATGCTACCAAACCTGGAT	6
		R	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA	
Il10	NM_010548.1	F	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	41
		R	TGTCCAGCTGGTCCTTGTT	
iNos	NM_010927.1	F	CTTGCCACGGACGAGAC	13
		R	TCATTGTACTCTGAGGGCTGA	
Irf7	NM_016850.2	F	CTTCAGCACTTCTTCCGAGA	25
		R	TGTAGTGTGGTGACCCCTGC	
Irgm1	NM_008326.1	F	AAGGCCACTAACATCGAACATCA	82
		R	TGCCTTATCTCACTTAATAACTCCTCA	
Mhcl1	XM_915705.2	F	TGACCCACAGAACGAGTGAG	79
		R	CTCAAGCATCTCCTTGTCAC	
Mpeg1	NM_010821.1	F	CACAGTGAGCCTGCACTTACA	69
		R	GCGCTTCCCAATAGCTTTA	
Mx1	NM_010846.1	F	TTCAAGGATCACTCATACTTCAGC	53
		R	GGGAGGTGAGCTCCTCAGT	
Mx2	NM_013606.1	F	CAGTTCCCTCTCAGTCCCAAGAT	11
		R	TGCGGTTGTGAGCCTCTT	
Oas2	NM_145227.3	F	TCCTATTGGTCAAGCACTGGT	2
		R	CTGAGGTGGGGGTGTTTC	
Pecam-1	NM_008816.2	F	CGGTGTTCAGCGAGATCC	45
		R	CGACAGGATGGAAATCACAA	
Rtp4	NM_023386.5	F	ACCAGCAGACAGTGCTTGG	47
		R	CCTGAGCAGAGGTCCAACCT	
Slfn1	NM_011407.1	F	CGTGCTCAGTAGAGCAGCTTAG	32
		R	CATCGGTGATGTTCATTTCC	
Slfn10	NM_181542.4	F	AGGGGCCACTGTTAGTCAG	104
		R	GTCACTTCTCCTGCGTAGATGAT	
Slfn2	NM_011408.1	F	AGGCAACTGAGCAAAGCAAC	6
		R	TTGCATTTCCAGCTGAATG	
Slfn3	NM_011409.1	F	GGAGATGAAAGACGGACCTG	68
		R	TCCCAGATGAAGTCCTTCC	
Slfn4	NM_011410.2	F	CCACTGTTGGGAGTTGGACT	101
		R	AAGAGGGAACCTCGGGTTGT	
Slfn5	NM_183201.4	F	TGGAAGACCTGCAGAAGGAT	47
		R	GTCCTTGTAGACGCTCTCTGG	
Slfn8	NM_181545.3	F	CAGGGATCAAGAGAACTCCACT	26
		R	CGGGTCTTCAGACAGGAGAG	
Slfn9	NM_172796.2	F	CTTTTCTCACAAAATGAAAGTGA	2
		R	TCGAACCTTTCTCCAGAGTC	

Sp100	NM_013673.3	F	GCATATTCCAGAAAACCTCCA	63
		R	GATGATAGAGCTCTCAGTGTAGAA	
Stat1	NM_009283.3	F	GCAGCACAACATACGGAAAA	80
		R	TCTGTACGGGATCTCTTGGAA	
Tnfa	d84199	F	TGCTGGGAAGCCTAAAGG	103
		R	CGAATTTGAGAAGATGATCCTG	
Trim30	NM_009099.2	F	CAACTGCAGAGTTGGAGGA	98
		R	TGTGTCTGCCTGTCCCTGACT	
Uba7=Ube1l	NM_023738.4	F	GATTCCAGGCCAGAAC	72
		R	AGGGTTCCCTGCAGTCCTT	
Usp18	NM_011909.2	F	GCTTGACTCCGTGCTTGAG	13
		R	CGGGAGTCCACAACTTCACT	
Vcam-1	X67783.1	F	TGGTGAAATGGAATCTGAACC	34
		R	CCCAGATGGTGGTTCCCTT	

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide und Roche-Sonden für Taqman®-Assay.

Alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

2.3 Enzyme

Alle Enzyme, die Komponenten eines verwendeten Kit-Systems sind, werden hier nicht extra aufgeführt.

Enzym	Anwendung	Hersteller
Collagenase	ex vivo Mikroglia-Kultivierung	Sigma; C0130
DNase I	ex vivo Mikroglia-Kultivierung	Roche; Cat. No.: 11 284 932 001
Hyaluronidase	ex vivo Mikroglia-Kultivierung	Sigma; H 4272
Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcriptase	Reverse Transkription	Fermentas; EP0442

Tabelle 3: Verwendete Enzyme, jeweilige Anwendung und Hersteller

2.4 Chemikalien und Kit-Systeme

Chemikalien	Verwendung	Hersteller
β-Mercaptoethanol	RNA-Isolierung	Sigma; M-7154
BSA	Zusatz zu IFNβ	Applichem; A6588
DAPI	Immunzytochemie	Invitrogen; D1306
DMSO	Kryokonservierung	Sigma; D5879
dNTP Mix	Reverse Transkription	Fermentas; R0192
Ethanol	verschieden	J.T. Baker; UN 1170

IFN β , recombinant human (rh IFN-beta 1a)	Stimulationsversuche Zellkultur	ImmunoTools; Cat. No.: 11343522
IFN β , recombinant mouse	Stimulationsversuche Zellkultur	Millipore; IF011
Isopropanol	verschieden	Merck; 100995
LPS (E.coli Stamm: 0111:B4)	Stimulationsversuche Zellkultur	Sigma; L-3012
M-CSF, recombinant human	Kultivierung von ex vivo Mikroglia	Prepotech; 300-25
Nuklease-freies Wasser	Verschieden	Promega; Cat. P1193
PFA	Immunzytochemie	Applichem; A3813
RNA 6000 ladder	RNA-Qualitätskontrolle	Ambion; Cat. No.: 7152
RNAse ZAP	RNA-Isolierung	Sigma; R-2020
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Real-time PCR	ABI; Part No.: 4326708
Triton X-100	Immunzytochemie	Sigma; X100
Universal Probe Library Sonden	real time RT-PCR	Roche

Tabelle 4: Chemikalien, jeweilige Verwendung und ihre Hersteller

Kit-System	Verwendung	Hersteller
Latex Beads	Phagozytose-Assay	Sigma; Cat. No.: 51972
QiaShredder	optionale Zellyse bei RNA-Isolierung	Qiagen; Cat. No.: 79654
RevertAid [™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription	Fermentas; #K1632
RNA 6000 Nano LabChip Kit	RNA-Qualitätskontrolle	Agilent Technologies; Reorder No.: 5065-4476
RNeasy Micro Kit	RNA-Isolierung	Qiagen; Cat. No.: 74004
RNeasy Mini Kit	RNA-Isolierung	Qiagen; Cat. No.: 75144

Tabelle 5: Verwendete Kits und Hersteller

2.5 Medien, Puffer und Lösungen

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
BV-2 Kulturmedium	RPMI 1640	PAA; E15-039
	5% Fetales Kälberserum (FCS)	PAA; A15-151
	1% Penicillin/Streptomycin	PAA; P11-010
	1% L-Glutamin (2mM)	PAA; M11-004
	1,95 μ l β -Mercaptoethanol (55,77nM)	
Einfriermedium zur Kryokonservierung	Vollmedium, 30 % FCS, 10 % DMSO	
ex vivo Mikroglia-Differenzierungsmedium	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA; E15-810
	10 % FCS	PAA; A15-151
	1 % Penicillin/Streptomycin	PAA; P11-010
	M-CSF (10 ng/ml)	

Tabelle 6: Verwendete Medien und Zusätze

Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
10x PBS	verschieden	1,5 M NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM

		H ₂ PO ₄ x H ₂ O (pH 7.4)
2x TaqMan® Mastermix	Real-time PCR	Applied Biosystems; Product Number:4364388
4 % PFA + 3 %Sucrose-Lösung	Immunzytochemie	4% (w/v) PFA in 1x PBS (pH 7,0) + 3 % Sucrose
DAPI-Lösung	Immunzytochemie	0,1 µg/ml DAPI in 1x PBS
Fluorescent Mounting Medium	Einbettreagenz	Dako; REF 53023
Permeabilisierungslösung	Immunzytochemie	0,1% Triton X-100 in 1x PBS
Phalloidin-TRITC	Immunzytochemie	Sigma; Cat. No.: P1951

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen

2.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Verwendung	Hersteller
1,5 mL, 2 ml Cups	verschieden	Sarstedt, No./REF 72.690.200
15 mL Falcon Tube	verschieden	Sarstedt; No./REF 62.554.502
50 mL Falcon Tube	verschieden	Sarstedt; No./REF 62.547.254
10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL Filterspitzen	verschieden	Sarstedt
2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL Pipetten	verschieden	Eppendorf
10µL, 100µL, 1000µL Pipettenspitzen	verschieden	Omnitip
BD Falcon 70 µM Cell Strainer	ex vivo Mikroglia-Kultivierung	BD Bioscience; 352350
Biozym 384 Well Microtiter Plate	Real-time PCR	Biozym
Deckglässchen (10 mm Ø)	Immunzytochemie	VWR; 631-1576
Einmalhandschuhe	Verschieden	Kimberly-Clark
Kryoröhrchen	Kryokonservierung von Zellen	Sarstedt; REF 72.380.007
Multiwell 6-Well Plate	Zellkultur	Corning; 3506
Multiwell 12-Well Plate	Zellkultur	Corning; 3512
Multiwell 6-Well Plate nunclon Δ-surface	Zellkultur	Nunc™
Nitrilhandschuhe	verschieden	VWR International; Art-Nr. 112-2372
Nunc™ Flasks 75 cm ² nunclon Δ-surface	Zellkultur	Nunc™; 178891
Zellschaber 25 cm	Zellkultur	Sarstedt; No./REF 83.1830

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller

2.7 Geräte und Software

Gerät	Verwendung	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	RNA-Qualitätskontrolle	Agilent Technologies
Axioskop 2 MOT Plus	Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss
Brutschrank CB 210	Zellkultur	Binder

Einfrierapparatur	Kryokonservierung von Zellen	Thermo Fisher
Mikroskop DMIL HC kpl. Invers	verschieden	Leica
Mikroskop Eclipse TE 2000S	Durchlichtmikroskopie	Nikon
Mikrozentrifuge	verschieden	Labnet
Multipipette	Taqman®	Matrix
NanoDrop	Konzentrationsbestimmung RNA	PeqLab
Sterilbank	Zellkultur	BDK Luft- & Reinraumtechnik GmbH
Thermocycler	cDNA	Biometra
Thermomixer 5436	verschieden	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge fresco	verschieden	Heraeus
Vortex Genie 2 G-560E	verschieden	Scientific Industries
Wasserbad	verschieden	GFL
Zentrifuge	verschieden	Sigma
7900 HT Fast Realtime PCR System	Real-time PCR	Applied Biosystems

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Software	Verwendung	Hersteller/Webadresse
Agilent 2100 Bioanalyzer	RNA-Qualitätskontrolle	Agilent Technologies
Axio Vision LE 4.5	Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss
Chipinspector 2	DNA-Mikroarray-Analysen	Genomatix GmbH
Corel Draw X5	Anfertigung von Abbildungen	Corel
Gene Expression Dynamics Inspector v2.1	Bioinformatische Datenanalyse	www.childrenshospital.org/research/ingber/GEDI/gedihome.htm
Expression Console Version 1.0	Bioinformatische Datenanalyse	Affymetrix
Microsoft Office	verschieden	Microsoft
NIS viewer	Durchlichtmikroskopie	Nikon
SDS 2.3	TaqMan®	Applied Biosystems
RQ-Manager 1.2	TaqMan®-Auswertung	Applied Biosystems

Tabelle 10: Verwendete Software und Webapplikationen

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinie BV-2

BV-2 Zellen wurden in ihrem entsprechenden Kulturmedium (siehe 2.5) in einem Feuchtinkubator bei 37°C + 5 % CO₂ in einer durch Wasserdampf abgesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wachsen als adhäsente Monolayer in Zellkulturflaschen. Die Zellkultur der Zelllinie und primärer Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen (Sterilbank BDK Luft- & Reinraumtechnik GmbH).

3.1.2 Weiterkultur

Nach Erreichen der vollständigen Konfluenz (alle 3 Tage) wurden die BV-2 Zellen in einem Verhältnis von 1:3 umgesetzt. Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt, danach folgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden mittels eines sterilen Zellschabers. Anschließend wurden die Zellen entsprechend verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Wachstum und Zustand der Zellen wurden mit einem Durchsichtmikroskop kontrolliert.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellernte

Um die gewünschte Menge an Zellen für das Aussäen für die Stimulationsversuche zu erreichen (25.000, 300.000 bzw. 500.000 Zellen/ml) wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde zuerst das alte Medium entfernt, als nächstes wurden die Zellen in 10 mL frischem Medium mit Hilfe eines sterilen Zellschabers abgeschabt. 10 µL dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadrateen summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Aus dem Mittelwert der Zellzahl der Großquadrate wird dann die Zellzahl pro mL Suspension wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/mL} = \text{Mittelwert der Zellzahl aus 4 Großquadrate} \times \text{Kammerkonstante (10}^4\text{)}$$

Zum Ernten wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und im entsprechenden Volumen RLT-Puffer (Lysepuffer) abgeschabt. Das Zelllysat wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen langfristig in flüssigem Stickstoff lagern zu können, wurden diese mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DMSO) kryokonserviert. Zellen einer Zellkulturflasche mit 80 % Konfluenz wurden mit einem Zellschaber in 5ml Einfriermedium (60 % Vollmedium der jeweiligen Zelllinie + 30 % FCS + 10 % DMSO) abgelöst und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1,6 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Um eine gleichmässige Erniedrigung der Temperatur um 1° C pro Minute zu erreichen wurden die Kryoröhrchen mindestens 4 Stunden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierapparatur bei -80° C inkubiert und zuletzt in flüssigem Stickstoff bei -196 ° C aufbewahrt.

Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurden diese möglichst schnell aufgetaut und in einer Zellkulturflasche mit 20 ml frischem Medium aufgenommen. Dieser Schritt dient der Verdünnung des giftigen DMSO. Nach ca. vier Stunden im Brutschrank wurde die Adhärenz der Zellen mittels Durchsichtmikroskop kontrolliert. Nach zweimaligem Waschen mit Medium um das DMSO zu entfernen wurden die Zellen mit 10 ml frischem Medium wieder in Kultur genommen.

3.2 Mauslinien und Haltung

Zur Gewinnung von primären Mikrogliazellen dienten Gehirne von 18 bis 21 Tage alten MAFIA-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund und dem Genotyp *Rs1h^{+/Y}* oder Wildtyp. Die Haltung aller Tiere erfolgte in klimatisierter Umgebung bei einer Luchtfeuchtigkeit von ca. 63%. Sie unterlagen einem 12 h hell/dunkel-Rhythmus bei $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mit freiem Zugang zu Futter und Wasser. Die Lichtintensität während der Hellphase betrug ca. 15 Lux. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde regelmäßig kontrolliert und alle Vorgänge wurden von der Tierschutzkommission der Universität Regensburg genehmigt und waren mit dem deutschen Tierschutzgesetz konform. Es handelte sich in dieser Studie nicht um Tierversuche, sondern ausschliesslich um die Entnahme von Gehirnen. Die Tiere wurden mittels CO₂-Asphyxiation getötet, das

gewünschte Gewebe präpariert und mit den unter 3.2.1 beschriebenen Methoden weiter verarbeitet.

3.2.1 Präparation und Kultivierung von *ex vivo* Mikroglia

Um die Ergebnisse aus der etablierten BV-2 Zelllinie in primären Zellen zu überprüfen, wurden diese frisch aus Gehirngewebe isoliert.

Nach Entnahme wurde das Gewebe in 2 ml Cups mit 520 µl sterilem 1x PBS-Puffer überführt. Das Gehirn wurde mittels einer Schere in sehr feine Stücke zerschnitten und nach Zugabe von 250 µl Collagenase (1mg/ml), 30 µl DNase I (0,3 mg/ml) und 200 µl Hyaluronidase (2mg/dl) für 40 Minuten bei 37°C im Thermomixer unter Schütteln (1000 rpm) verdaut. Anschließend wurden mittels eines 70 µm Zellsiebs die übrigen im Gehirn vorkommenden Zellspezies, welche nicht kultiviert werden sollten, entfernt. Hierfür wurde das Zellsieb auf ein 50 ml Falcon Tube aufgelegt, die Zellsuspension darauf gegeben und zweimal mit 10 ml Mikroglia-Medium (2.5) ohne M-CSF-Zusatz gewaschen. Danach erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 1.600 rpm, RT) und die Resuspendierung des Zellpellets in 10 ml Mikroglia-Medium mit 10 ng/ml M-CSF. Die Mikrogliazellen aus dem Gehirn wurden in 6-well Platten mit Nunclon™Δ-Oberfläche (2ml Zellsuspension pro well) ausgesät. Nach vier Tagen und dem weiterem Wachstum angepasst erfolgte ein Mediumwechsel mit M-CSF Zusatz. Nach sieben bis neun Tagen in Kultur wurden die adhärent wachsenden Mikrogliazellen aus dem Gehirn den *in vitro* Stimulationsversuchen (3.3) ausgesetzt und anschließend für die RNA-Isolierung in einem adäquatem Volumen RLT-Puffer abgeschabt und entweder direkt weiter verarbeitet oder bis zur weiteren Behandlung bei -80°C gelagert.

3.3 *In vitro* Stimulationen mit LPS und IFNβ

Für die *in vitro* Stimulationsversuche wurden 25.000, 300.000 bzw. 500.000 BV-2 Zellen pro well in einer 12-well Platte bzw. 6-well Platte ausgesät. Die Aussäugung der primären Mikroglia aus dem Gehirn erfolgte in 6-well Platten mit Nunclon™Δ-Oberfläche. Die Stimulation erfolgte sobald eine Konfluenz von 80 % erreicht wurde (24h für BV-2 Zellen, 7-9 Tage für primäre Mikroglia). Zuerst wurden die Zellen mit Medium gewaschen und danach mit LPS, IFNβ in verschiedenen Konzentrationen, LPS + IFNβ oder ohne Stimulanz für 6h bis 24h inkubiert.

Lipopolysacharid (LPS) ist Bestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und wirkt als bakterielles Endotoxin. Beim Zerfall von Bakterien wird LPS frei und wirkt dabei toxisch. LPS (2.4) wirkt stark induzierend auf das Immunsystem und löst so eine inflammatorische Zellantwort aus. Durch LPS-Stimulation können *in vitro* Inflammationsbedingungen simuliert und untersucht werden. Für die durchgeführten Stimulationsversuche wurde eine LPS-Konzentration von 50 ng pro mL eingesetzt.

Wie bereits unter 1.3 erläutert ist IFN β ein köpereigenes Hormon, welches neben antiviralen und antitumoralen Eigenschaften auch immunstimulierende Wirkungen besitzt. In den in dieser Studie durchgeführten Stimulationsversuchen wurde IFN β in einer Konzentration von 100 bzw. 1000 U pro ml verwendet

3.4 RNA-spezifische molekularbiologische Methoden

Gesamt-RNA wurde aus Zellen der Zelllinie BV-2 und primären *ex vivo* Mikrogliazellen aus dem Gehirn mit Hilfe des RNeasy Kits der Firma Qiagen isoliert. Dabei wurde stets die Zellzahl nach Angaben des Herstellers eingehalten, unter nukleasefreien Bedingungen und auf Eis gearbeitet.

3.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus geernteten Zellen mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen ist ein Verfahren zur spezifischen Aufreinigung der Gesamt-RNA. Zunächst wurden die Zellen durch einen stark denaturierenden Guanidiniumthiocyanat enthaltenden Puffer homogenisiert und lysiert. Dieser RLT-Puffer bewahrt durch die Denaturierung sämtlicher Proteine inklusive der RNAsen die RNA vor Degradierung. Anschließend wurde das Zelllysat mittels eines QIAshredders (2 min, 13.000 rpm, RT) homogenisiert und von Zellüberresten befreit. Um angemessene Bindungsbedingungen herzustellen wurde 70 % Ethanol zugegeben und die Probe auf eine hydrophile Siliziumgel-Säule (RQ Mini spin column) übertragen. Durch die darauffolgende Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm, RT) werden RNA-Moleküle, die länger als 200 Nukleotide sind, an die Membran der Säule gebunden und die übrigen Substanzen abgetrennt. Als nächstes wurde in mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten mit RW1- und RPE-Puffern die RNA aufgereinigt. Zuletzt erfolgte die Eluierung der RNA von der Säule mit 50 μ l nukleasefreiem Wasser. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 $^{\circ}$ C gelagert.

3.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit einem Spektralphotometer (NanoDrop) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Anhand der Extinktion der Probe kann die Konzentration anhand der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration RNA} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml} \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die RNA-Reinheit 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 Vermessung der RNA-Konzentration erfolgte unverdünnt mit nukleasefreiem Wasser als Referenz.

3.4.3 RNA Qualitätskontrolle mit dem Agilent Bioanalyzer

Um die Integrität der verwendeten RNA zu belegen, erfolgte eine Qualitätsbestimmung mittels des Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) und *lab-on-a-chip*-Technologie. Bei diesem Verfahren wurden die Vertiefungen (wells) des Chips mit einem RNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, einem Polymer und 1 μl der RNA-Probe beladen. Zum späteren Vergleich der eigenen Proben wurde zusätzlich ein Standard (RNA 6000 ladder) verwendet. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wurden die RNA-Proben durch Mikrokapillaren elektrophoretisch aufgetrennt. Dieser Vorgang wurde mit Hilfe der Agilent 2100 Bioanalyzer Software aufgezeichnet und analysiert. Die eukaryotischen Proben wurden mit dem Größenstandard verglichen und das Verhältnis zwischen ribosomaler 18 und 28S rRNA ermittelt. Dies gibt Aufschluss über die Qualität der verwendeten RNA. Um die ermittelten Daten zu einer fassbaren Zahl umzuwandeln, benutzt Agilent einen Algorithmus, der alle Daten des Elektropherogramms berücksichtigt und daraus die RIN (RNA Integrity Number) berechnet. Hierbei steht auf einer Skala von 1 bis 10, 1 für vollständige Degradierung und 10 für optimale RNA-Qualität (Schroeder et al., 2006). Dies erlaubt objektive und reproduzierbare Aussagen über die RNA-Qualität. Ebenfalls von Vorteil sind der geringe RNA-Bedarf von 1 μl und die bessere Vergleichbarkeit von Proben.

Die RNA Qualitätskontrolle wurde stets nach den Versuchsvorschriften des Herstellers durchgeführt.

3.4.4 RNA-Mikroarray Analyse

Um die genomweite Expression unbehandelter zu mit IFN β - und LPS-behandelter BV-2 Zellen zu vergleichen, wurde eine RNA-Mikroarray Analyse am Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) in Regensburg durchgeführt. Dazu wurde der GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array der Firma Affymetrix verwendet, welcher eine Abdeckung des gesamten Transkripts ermöglicht. Jeder Array enthält mehr als 750.000 einzigartige 25-Nukleotide lange Oligonukleotid-Sonden, welche mehr als 28.000 Gene untersuchen. Diese sequenz-spezifischen Oligonukleotide werden durch ein photolithographisches Verfahren *in situ* direkt auf die Chip-Oberfläche synthetisiert. Nach Qualitätskontrolle der zu untersuchenden RNA (siehe 3.4.3) wird als erstes doppelsträngige cDNA mittels eines T7-Oligo(dT)₂₄ Promotor Primers aus so geringen Mengen wie nur 100 ng RNA umgeschrieben. Dadurch beinhalten alle synthetisierten cDNA-Moleküle eine T7 Promotorsequenz. Es folgt ein Aufreinigungsschritt und anschließend die *in vitro* Transkription, in der mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase einsträngige biotinylierte cRNA produziert wird. Die Biotinylierung ermöglicht die spätere Detektion der DNA-RNA-Hybride. Ein cDNA-Molekül kann dabei mehrfach als Matrize dienen und so kommt es im Gegensatz zur cDNA-Synthese zu einer 100 bis 200 fachen Amplifikation. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt werden die cRNA-Ketten hydrolysiert und auf die durchschnittliche Länge von 35 bis 200 Nukleotide fragmentiert, dadurch erhöht sich die Sensitivität des Arrays. Als nächstes wird die cRNA zu einem Hybridisierungskocktail hinzugefügt und dieser Cocktail in die Genchip Hybridisierungskammer injiziert um für 16 h bei 45 °C hybridisiert zu werden. Anschließend werden die Arrays gewaschen, mit einem fluoreszierenden Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat gefärbt und gescannt. Es wird die Intensität der Fluoreszenzemission gemessen, wobei diese proportional zur Menge der gebundenen cRNA an den jeweiligen Sonden auf dem Array ist.

In unserem Fall wurde RNA von BV-2 Zellen eingesetzt, die gemäß der *in vitro* Stimulationsversuche unter 3.3. behandelt worden waren. Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mittels der Affymetrix *Genechip® Command Console* und *Expression Console* Software. Diese errechnete aus den gescannten Bildern differentiell regulierte Transkripte über den *detection call*. Dieser *detection call* macht eine Aussage über die Expressionsstärke eines Gens (Expression, schwache Expression oder keine Expression). Es folgte eine Einzelanalyse jedes RNA-

Mikroarrays, in der die Gesamtfluoreszenz jeweils auf den Wert 100 skaliert wurde (*single array analysis*). Zur ausführlichen Qualitätskontrolle diente die zusätzlich generierte Report-Datei, welche Informationen über Analyseeinstellungen und andere Qualitätsparameter zusammenfasst. Insbesondere der Skalierungsfaktor, die Hintergrundfluoreszenz, die Signalwerte der Hybridisierungskontrollen und die 3'-5' Verhältnisse der internen Kontrollen sind hierbei von Bedeutung. Der niedrigste Wert des Skalierungsfaktors unterschied sich nicht mehr als um den Faktor zwei vom höchsten, was eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen RNA-Microarrays untereinander gewährleistete. Die Werte für die unspezifische Hintergrundfluoreszenz lagen ebenfalls unterhalb des Grenzwertes, was eine spezifische Hybridisierung beweist. Sämtliche Hybridisierungskontrollen, welche vor der Hybridisierung in unterschiedlichen Konzentrationen eingespiked wurden, konnten als exprimiert detektiert werden. Somit wurde sichergestellt, dass auch sehr niedrig exprimierte Gene ein messbares Signal zeigten. Bei den internen Kontrollen β -Actin und Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden jeweils Expressionssignale am 3'- und am 5'-Ende bestimmt. Aus dem berechneten 3' zu 5' Verhältnis, das den Faktor drei nie überschritt, konnte eine nicht vollständige cDNA- bzw. cRNA Synthese ausgeschlossen werden.

Nach Abschluss der Einzelanalysen der Mikroarrays (*single array analysis*) wurden die IFN β - und LPS-stimulierten Proben jeweils auf die unstimulierte Kontrollprobe bezogen (*comparison analysis*). Die Höhe der Veränderung bzw. ob keine Änderung der Transkription vorlag, wurde über den *change call* errechnet. Der *fold change* gibt die Höhe der Expressionsänderung als Zahlenwert an. Alle Daten wurden als *fold changes* der Transkript-Level bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben.

3.4.5 Bioinformatische Datenanalyse

Die Chip Dateien (.CHP files) enthalten numerische Schätzungen der Signalintensitäten, sowie *detection calls* für jedes Transkript auf dem Mikroarray. Um diese mit Hilfe des Robust Multi-chip Analysis (RMA) Algorithmus aus den CEL Dateien zu generieren, verwendeten wir die Affymetrix *Genechip® Command Console* und *Expression Console* Software.

Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der RNA-Mikroarraydaten wurden die Genomatix ChipInspector 2 Software (Dennis et al., 2003) und SAM (significance analysis of microarrays) benutzt (Zang et al., 2007). Zur Visualisierung und

integrativen Analyse des Datensatzes kam der Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI) v2.1 (Eichler, 2012, Eichler et al., 2003) zum Einsatz. Dazu benutzt GEDI selbstorganisierende Karten (SOMs, *self organizing maps*), welche die hochdimensionalen Expressionsprofile aus den RNA-Mikroarrays in 2D-Mosaiken umwandelt. Dabei steht jede Kachel des Mosaiks für ein „Minicluster“ von Genen mit ähnlichem Expressionsverhalten. Sich ähnlich verhaltene „Minicluster“ werden wiederum in direkter Nachbarschaft voneinander im Mosaik angeordnet. Um unterschiedliche Expressionslevel der Gene eines „Miniclusters“ darzustellen sind die Kacheln farbcodiert. Dies erleichtert das Identifizieren von genomweiten Mustern.

3.4.6 Reverse Transkription

Für die quantitative Realtime PCR kann keine RNA eingesetzt werden, also muss die isolierte RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in eine DNA-Kopie umgeschrieben werden (complimentary DNA oder cDNA). Die für diese Arbeit synthetisierte cDNA wurde mit dem RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas erstellt. Dazu wurden 1-4 µg Gesamt-RNA bei einem Endvolumen von 20 µl folgenderweise eingesetzt:

- I. Zugabe von:
 - 1-4 µg RNA (entspricht x µl)
 - y µl Nukleasefreies Wasser (entspricht 11 µl – x µl)
 - 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM)
- II. Inkubation bei 70°C für 5 min
- III. Zugabe von:
 - 4 µl 5x Reaction Buffer
 - 1 µl Nukleasefreies Wasser
 - 2 µl 10mM dNTP Mix
- IV. Inkubation bei 25°C für 5 min
- V. Zugabe von:
 - 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (200U/µl)
- VI. Inkubation bei 25°C für 10 min
- VII. Inkubation bei 42°C für 1h
- VIII. Inkubation bei 70°C für 10 min (Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch Denaturierung)

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4° C bzw. für längere Aufbewahrung bei -20° C gelagert.

3.4.7 Quantitative Realtime PCR mit Taqman® Technologie

Die Quantitative Realtime PCR dient dem Quantifizieren der Expression multipler Gene unter Verwendung von spezifischen fluoreszenzmarkierten Taqman®-Sonden (*Universal ProbeLibrary*, siehe 2.2). Das zugrundeliegende Prinzip dieser Methode ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit der zusätzlichen Komponente der Fluoreszenz-Messung der zyklischen Amplifikationsreaktion, wodurch diese verfolgt und quantifiziert werden kann. Die Vorteile der Taqman®-Technologie bestehen in der hohen Sensitivität (< 5 ng *template* ausreichend) und Spezifität mit einer guten Reproduzierbarkeit und präzisen Quantifizierung von mRNA.

Jede dieser sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden ist am 5'-Ende mit einem Reporter- und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff versehen. Im intakten Zustand der Sonde unterdrückt der Quencherfarbstoff durch seine räumliche Nähe die Fluoreszenz des Reporters. Während der Annealing-Phase bindet die Sonde auf der Zielsequenz zwischen den Primern (*forward* und *reverse*) innerhalb des PCR-Produkts (Abb. 6: A). Bei der Primer-Elongation spaltet die Taq-Polymerase mittels ihrer 5'-3'-Exonuklease die Sonde auf und trennt dadurch den Reporter vom Quencher und bewirkt so die Detektion des Reporterfarbstoffs (Abb. 6: B und C). Da sich dieser Vorgang mit jedem Zyklus wiederholt, erhöht sich mit steigender freier Reporterkonzentration in direkter Abhängigkeit die Fluoreszenzintensität (Abb. 6: D). Der Zeitpunkt an dem ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen wird, erlaubt im Umkehrschluss eine Aussage über die Anfangskonzentration des zu quantifizierenden PCR-Produkts.

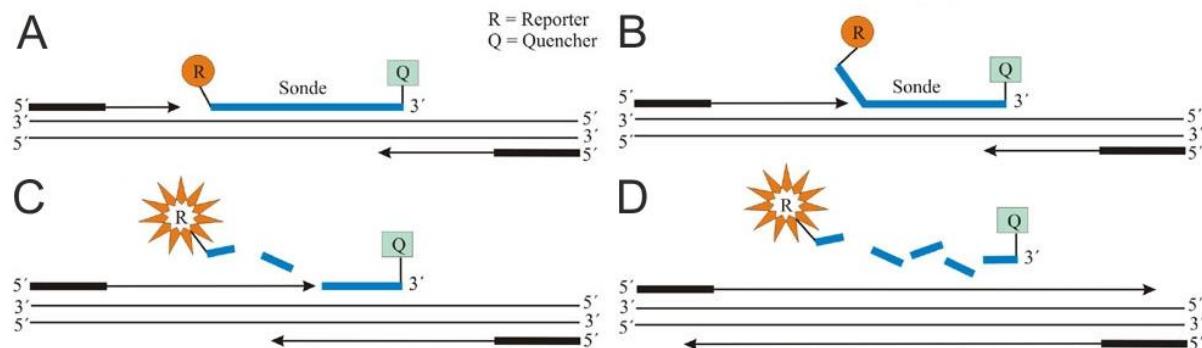


Abbildung 3: Das Taqman-Prinzip zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Sonde (blau) mit Reporter (R)- und Quencher (Q)-Farbstoff.

Die in unserem Institut verwendeten *Universal ProbeLibrary* Sonden beinhalten LNAs (*locked nucleic acids*), modifizierte Nukleotide mit erhöhter Hybridisierungsaffinität zu

komplementären Nukleotiden. Dies ermöglicht die Spezifität und Schmelztemperatur der Sonden trotz ihrer nur 8-9 Nukleotide messenden Länge aufrechtzuerhalten. Der Vorteil der LNA-basierten Sonden besteht in der Abdeckung eines jeden Transkripts in den Transkriptomen der meisten Organismen mit einer Bibliothek von nur 165 Sonden, da jede Sonde mehrere Transkripte binden kann und nicht eine individuelle Sonde für jede PCR-Analyse designt werden muss. Die Realtime-PCR erfolgte in einer 384-well-Mikrotiterplatte, die nach jedem Amplifikationszyklus von einem Laser abgetastet wird um aus den gemessenen Signalen die Fluoreszenzintensität zu berechnen. Zur Quantifizierung der cDNA wurde ein PCR-Protokoll mit 40 Zyklen angewendet:

- I. Denaturierung 95°C für 40 sek
- II. Annealing 60°C für 60 sek
- III. Elongation 72°C für 2 min

Die Realtime-PCR erfolgte in Triplikaten (BV-2 Zellen) bzw. Duplikaten (primäre Mikroglia) und ein einzelner Ansatz setzt sich zu einem Gesamtvolumen von 10 µl wie folgt zusammen:

- 5 µL 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix
- 1 µL *forward* Primer (10 µM)
- 1 µL *reverse* Primer (10 µM)
- 0,125 µL Sonde (10 µM)
- 0,375 µL H₂O
- 2,5 µL cDNA (50 ng/25 ng; BV-2 Zellen/primäre Mikroglia)

Nach Befüllen der 384-well-Platte wurde diese mit einer selbsthaftenden Spezialfolie versiegelt, für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert und in das 7900 HT Fast Realtime PCR-Gerät (Applied Biosystems, 2.7) eingelegt.

3.4.8 Relative Quantifizierung

Zur Quantifizierung von Realtime-PCR Ergebnissen können die Rohdaten durch verschiedene Rechenmodelle ausgewertet werden. Da im Rahmen dieser Arbeit

ausschließlich relative Quantifizierung für die Erhebung der Ergebnisse benutzt wurde, wird im Folgenden nur diese Methode näher beschrieben.

Gemäß des Prinzips der Reaktion steigt während der PCR die Replikation der cDNA exponentiell an. Wie bereits unter 3.4.7 erwähnt erlaubt die Messung des Fluoreszenzsignals Rückschluss auf Menge des eingesetzten PCR-Produkts (*template*). Trägt man dies nun in einem Diagramm gegen die Anzahl der Zyklen auf, erhält man steiler ansteigende Kurven für höher exprimierte Gene, bei denen relativ mehr *template* DNA vorhanden ist im Gegensatz zu schwach exprimierten Genen bei denen die Anfangskonzentration der DNA vergleichsweise niedriger ist. Entsprechend ergibt sich ein Schwellenwert, der C_T -Wert (*Cycle Threshold*), der den Punkt im linearen Bereich der Kurve beschreibt an dem die Fluoreszenzintensität und damit die Genexpression zum ersten Mal statistisch signifikant ansteigt. Graphisch ergibt sich der C_T -Wert als Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Schwellenwertgeraden. Folglich haben höher exprimierte Gene einen geringeren und niedrig exprimierte Gene einen höheren C_T -Wert. Um einen relativen Mengevergleich durchführen zu können werden die Ergebnisse zum einen auf einen Kalibrator bezogen, der gleich 1 gesetzt wird. In dieser Arbeit fungierte eine unstimulierte Probe als Kalibrator. Zum anderen wird ein Referenzgen (*Housekeeper*) mitgemessen und die Ergebnisse der anderen gemessenen Gene darauf normalisiert. Die Normalisierung auf ein Referenzgen ermöglicht die Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da alle Interferenzen die Zielgene und den *Housekeeper* gleichermaßen betreffen. Voraussetzung für ein Referenzgen ist eine konstante Genexpression in verschiedenen Geweben, Zellen und Experimenten. In dieser Arbeit wurde die murine *Atp5b* als *Housekeeper* verwendet, da ihre Genexpression unter allen experimentellen Bedingungen konstant ist.

Die Ermittlung der C_T -Werte aus den Rohdaten und deren Auswertung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode erfolgte mittels der RQ-Manager 1.2 Software:

I. Bildung von Mittelwerten (C_T Avg)

II. Normalisierung auf Referenzgen (*Atp5b*):

$$C_T \text{ Avg (Zielgen)} - C_T \text{ Avg (Atp5b)} \rightarrow \Delta C_T \text{ Avg}$$

III. Bezug auf Kalibrator:

$$\Delta C_T \text{ Avg (Probe)} - \Delta C_T \text{ Avg (Kalibrator)} \rightarrow \Delta\Delta C_T \text{ Avg}$$

IV. Relative Änderung der Genexpression $2^{-\Delta\Delta C_T \text{ Avg}} \rightarrow RQ$

3.5 Funktionsassays

Die Experimente auf RNA-Ebene ergaben unterschiedliche Genexpressionsprofile gemäß unterschiedlicher Stimulierungen. Um einen Effekt dieser Stimulanzien auch auf translationaler Ebene zeigen zu können wurden mittels funktioneller Assays die stimulierten BV-2 Zellen näher auf Änderungen in ihrem Migrationsverhalten und ihrer phagozytotischen Aktivität untersucht.

3.5.1 Migrations-Assay

Zur Evaluierung der Zellmigration wurden 500.000 BV-2 Zellen in 6-well Platten über Nacht ausgesät und bei 80 % Konfluenz, nach zweistündiger Vorstimulation, mit einer 100 μ l Pipettenspitze in einem Kreuzmuster verletzt. Nach Setzen der Wunde wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und anschließend zum Zeitpunkt t=0h mittels Durchlichtmikroskop (Nikon inverted M. ECLIPSE TE2000-S) in 4-facher Vergrößerung dokumentiert. Es erfolgte eine erneute Medium- und Stimulanzienzugabe und die Inkubation wurde fortgesetzt. Die Stimulation wurde mit LPS (50 ng/ml), humanem IFN β (100 und 1000 U/ml), LPS + humanes IFN β oder ohne Stimulanz durchgeführt. Die Migration in die Wunde wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hineinritzen des Kreuzmusters erneut mittels Durchlichtmikroskop dokumentiert.

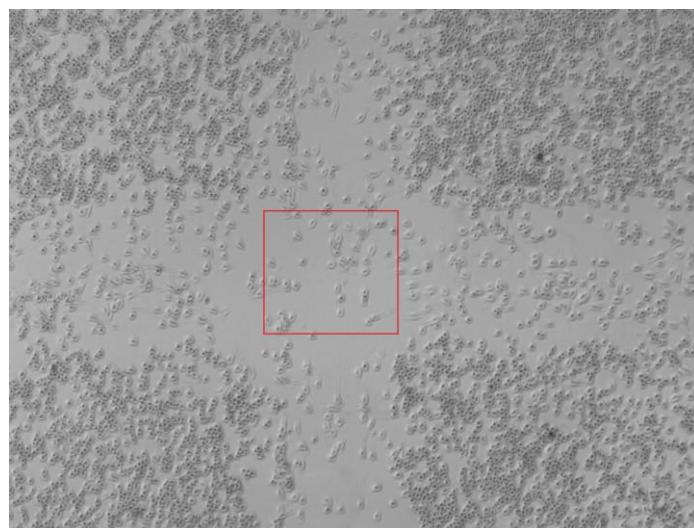


Abbildung 4: Migrations-Assay. Kreuzmuster mit bereits eingewanderten Zellen und definiertem Auszählrahmen (rot, 6,79 cm 2). 4x Vergrößerung

Die Zahl der eingewanderten Zellen wurde über das Auszählen einer definierten Region des Kreuzmusters ermittelt (siehe Abbildung 4), um anschließend über den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten das Migrationsvermögens eines jeden Stimulationsansatzes zu erheben.

3.5.2 Phagozytose-Assay

Um eine geänderte Phagozytoseaktivität unter dem Einfluss von IFN β und LPS zu zeigen, wurde ein Phagozytose-Assay mit blauen Latex-Beads durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden BV-2 Zellen in einer Konzentration von 300.000 Zellen/Well in einer 6-well Platte ausgesät. Tags darauf erfolgte die Inkubation über 24h mit LPS (50 ng/ml), humanem IFN β (1000 U/ml), LPS + humanes IFN β oder ohne Stimulanz, sowie die Zugabe von 5 μ l blauen Latex Beads (1 μ m) aus Polystyren pro Well. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und die Partikelaufnahme mit Hilfe von Durchlichtmikroskopie (Nikon inverted M. ECLIPSE TE2000-S) dokumentiert. Die Phagozytoseaktivität wurde durch Auszählen der positiven Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl in 9 individuellen Wells pro Stimulationsansatz ermittelt. Als in ihrer Phagozytoseaktivität hochreguliert (positiv) wurden Zellen gewertet, die zu 50 % und mehr mit Partikeln ausgefüllt waren. Es wurde mit einer 40x Vergrößerung gearbeitet und drei Bildausschnitte pro Well ausgezählt.

3.6 Morphologische Methoden

Die unterschiedlichen Aktivierungszustände von Mikrogliazellen spiegeln sich in ihrem Erscheinungsbild wieder (siehe 1.2.1). Um die morphologischen Änderungen unter verschiedenen Stimulanzien zu dokumentieren kamen verschiedene mikroskopische Methoden zum Einsatz.

3.6.1 Durchlichtmikroskopie

Aufnahmen mittels Durchlichtmikroskopie wurden von BV-2 Zellen und primären Mikrogliazellen aus dem Gehirn direkt vor der RNA-Extrahierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einmal mit Medium bzw. 1x PBS gewaschen um das jeweilige Stimulanz zu entfernen, 1 bzw. 2 ml Medium oder PBS pro Well hinzugefügt und zügig Photos in 20x und 40x Vergrößerung mit dem Nikon inverted M. ECLIPSE

TE2000-S aufgenommen. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung wie unter 3.4.1 beschrieben.

3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie und Immunzytochemie

Da in der Durchlichtmikroskopie zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen unterschiedliche Zellmorphologien auffielen, wurde eine Phalloidin-Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Phalloidin ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und bindet an F-Aktin, was sich stark stabilisierend auf die Aktinfilamente auswirkt. Wird nun ein fluoreszierender Farbstoff an Phalloidin gebunden kann das Aktin enthaltende Zytoskelett mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

In 12-well Platten wurden sterile Deckglässchen platziert und darauf 25.000 BV-2 Zellen über Nacht ausgesät. Nachdem die Zellen auf den Deckglässchen adhären waren, erfolgte tags darauf die Inkubation über 24h ohne Mediumwechsel mit LPS (50 ng/ml), humanem IFN β (1000 U/ml), LPS + humanes IFN β oder ohne Stimulanz. Nach der Inkubation wurden die Deckglässchen in eine neue 12-well-Platte transferiert und einmal mit 1x PBS gewaschen um als nächstes mit 4 % PFA + 3 % Succrose in 1x PBS (20 min, RT) fixiert zu werden. Anschließend und nach jedem weiteren Behandlungsschritt wurden die fixierten Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen für 5 min bei RT in 0,1 % Triton X-100 in PBS belassen. Dann erfolgte die Färbung mit 0,1 μ g/ml Phalloidin-TRITC (1 h, RT, in Dunkelheit). Um die Zellkerne ebenfalls sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit 0,1 μ g/ml DAPI gefärbt (10 min, RT, in Dunkelheit). Nach einem letzten Waschschritt wurden die Deckglässchen auf einem Objektträger mit Fluorescent Mounting Medium platziert und über Nacht zum Trocknen bei 4 °C belassen. Die Aufnahmen wurden in 20x und 40x Vergrößerung mit dem Axioskop 2 MOT Plus von Zeiss durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Interferon- β Effekt in BV-2 Mikroglia

Literaturrecherchen ergaben eine deutliche Beteiligung von Mikroglia an inflammatorischen, autoimmunologischen und neurodegenerativen Prozessen und eine modulierende Wirkung von IFN β auf Krankheiten mit solchen Prozessen in der Pathogenese. Darum wurden als erstes Ziel die transkriptionellen Expressionsänderungen innerhalb von IFN β - und LPS-stimulierter BV-2 Mikrogliazellen näher charakterisiert.

4.1.1 Transkriptionelle Veränderungen nach IFN β -Stimulation: Genomweite Expressionsanalyse und qRT-PCR-Validierung

Dazu wurde eine genomweite Expressionsanalyse in Kooperation mit dem Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik wie unter 3.4.4 beschrieben durchgeführt. Es wurde RNA von zwei unabhängigen Experimenten eingesetzt, in denen BV-2 Zellen 24h entweder keinem Stimulanz, LPS (50 ng/ml) oder IFN β (1000 U/ml) einzeln oder zusammen ausgesetzt wurden. Die Stimulation mit LPS als proinflammatorische Kontrollsubstanz diente der Induktion eines klassisch aktivierten Phänotyps.

Eine Auswahl von zunächst 105 Genen wurde durch Anwendung einer *false discovery rate* von 5 % und einem *Fold Change* von mindestens 5 (entspricht einer Minimum log2 ratio von 2,24) in den nur durch IFN β stimulierten Proben getroffen. Aus diesen durch IFN β deutlich hochregulierten Genen wurde, aufgrund ihrer Eigenschaften, eine Auswahl zur Bestätigung der veränderten Gentranskription mittels quantitativer Realtime-PCR getroffen (siehe Tabelle 11).

Gen	Apol9a	Apol9b	Cmpk2	Cxcl10	Irgm1	Mpeg1	Rtp4	Sifn2	Sifn3	Sifn4	Sifn5	Sifn8	Sifn9	Sp100	Trim30a	Uba7 = Ube11	Usp18
<i>Fold Change IFNβ vs Co</i>	37,85	26,90	60,04	24,36	8,79	6,97	71,66	8,54	3,62	8,76	9,91	5,13	3,89	26,65	54,20	2,93	10,98
<i>p-Wert IFNβ vs Co</i>	0,00171	0,00164	0,00072	0,00510	0,00225	0,01841	0,00190	0,00997	0,02377	0,00123	0,00608	0,00447	0,01598	0,00028	0,00075	0,02054	0,00105

Tabelle 11: Mikroarraydaten der zur qRT-PCR-Validierung ausgewählten Gene. *Fold Change* gibt die Höhe der Expressionsänderung nach IFN β -Stimulation bezogen auf die unstimulierte Kontrolle als Zahlenwert an. Zusätzlich Angabe des *p*-Werts, errechnet durch Affymetrix Software. Sortierung der Gene nach Alphabet.

Zusätzlich zu den mittels der Mikroarrayergebnisse gewählten Genen wurde die Auswahl zur qRT-PCR-Validierung durch Literaturrecherche noch um einige weitere Gene ergänzt. Die endgültige Auswahl von 38 Genen liess sich durch extensive Literaturrecherche verschiedenen funktionellen Kategorien zuordnen (siehe Abbildung 5).

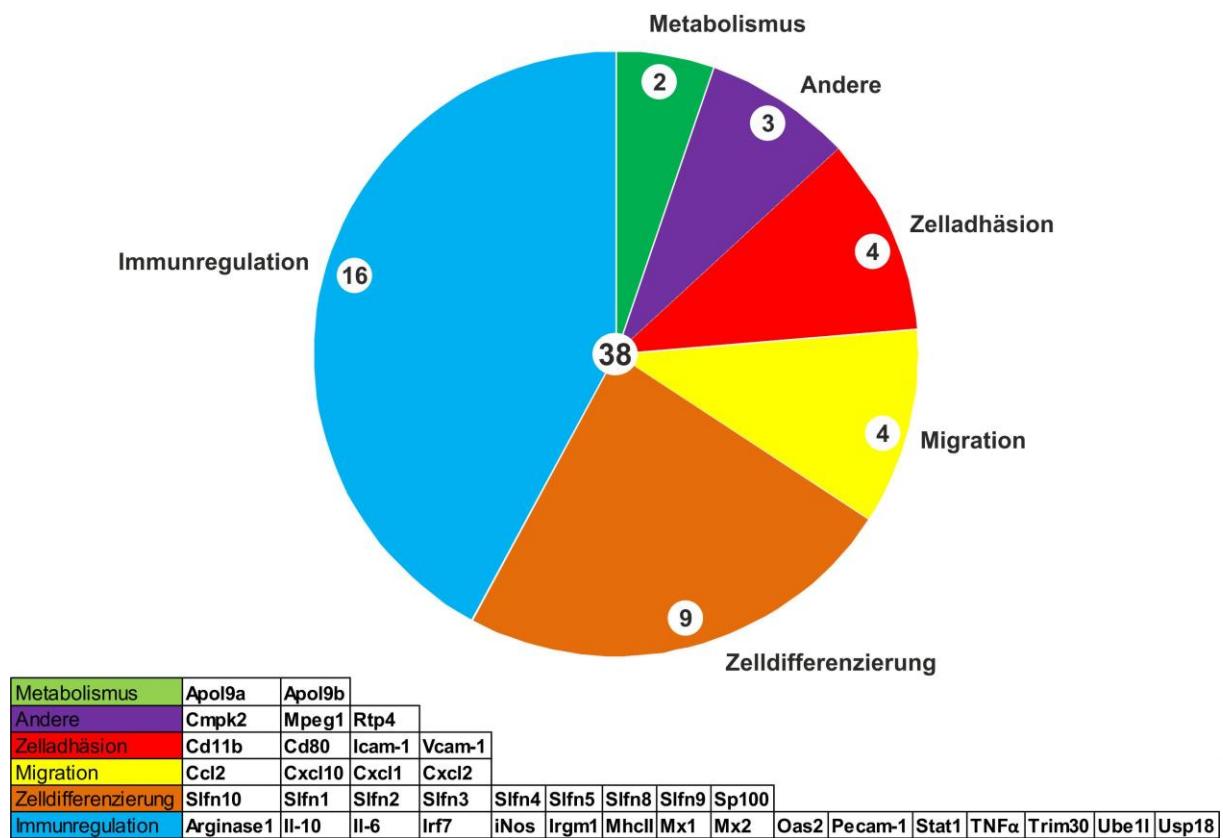


Abbildung 5: Einteilung der 38 ausgewählten Gene zur qRT-PCR Validierung in funktionelle Kategorien nach Literaturrecherche.

Die Validierung der 38 ausgewählten Gene wurde jeweils in drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten mit dem Einsatz von 50 ng cDNA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf eine unstimulierte Probe als Kalibrator bezogen, der gleich 1 gesetzt wurde. Als Referenzgen (*Housekeeper*) wurde *Atp5b* stets mitgemessen und die Ergebnisse der anderen gemessenen Gene darauf normalisiert. Zusätzlich zum 24h-Zeitpunkt wurde die Genexpressionsänderung dieser Gene ebenfalls zum 6h-Zeitpunkt ermittelt, um Hinweise auf eine eventuell frühere oder spätere Hochregulierung zu erhalten.

Einige der in der Expressionsanalyse durch IFN β hochregulierten Gene wurden bereits vor Durchführung des Mikroarrays mittels qRT-PCR untersucht. Die

Genexpression von *Mx1*, *Mx2*, *Oas2*, *Stat1* und *Irf7* wurde unter IFN β -Einfluss quantifiziert, da diese Gene bereits bekannte IFN β -induzierbare Gene sind (Haller and Kochs, 2002, Honda et al., 2005, Kakuta et al., 2002, Cheon et al., 2011). Dies diente der Überprüfung der Richtigkeit des Versuchsaufbaus und um zu zeigen, dass IFN β definitiv einen Effekt in der BV-2 Mikrogliazelllinie hat. Sowohl im Mikroarraydatensatz, als auch in qRT-PCR erwiesen sich diese Gene durch IFN β induziert (siehe Tabelle 12, 13 und 14).

Gen	Mx1	Irf7	Oas2	Mx2	Stat1
Fold Change_IFNβ vs Co	31,85	26,57	19,54	19,05	8,89
p-Wert_IFNβ vs Co	0,00008	0,00831	0,00138	0,00047	0,00026

Tabelle 12: Mikroarraydaten der bekannten IFN β -induzierten Gene. Fold Change gibt die Höhe der Expressionsänderung nach IFN β -Stimulation bezogen auf die unstimulierte Kontrolle als Zahlenwert an. Zusätzlich Angabe des p-Werts errechnet durch Affymetrix Software. Sortierung der Gene nach Höhe des Fold Change.

Insbesondere *Mx1* zeigte sich stark durch IFN β induziert und wurde in den weiteren qRT-PCR-Experimenten als Positivkontrolle für IFN β -Stimulation eingesetzt.

Die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigen die im Mikroarray gezeigte Induktion durch IFN β (siehe Tabelle 13 und 14). Die aus der Literaturrecherche bezogenen Gene wiesen zum grössten Teil ebenfalls eine durch IFN β stark gesteigerte Genexpression. Ausnahmen bildeten *MhcII* und *Tnfa*, die keine signifikante Expressionsänderung (RQ > 2) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigten (siehe Tabellen 13 und 14). *Arginase 1*, *Cxcl1* und *Icam-1* zeigten im 24h-Stimulationsansatz (siehe Tabelle 13) ebenfalls keine oder wenig Änderung der Genexpression, wie auch *Cd 80* und *Cd11b* in der 6h-Stimulation (siehe Tabelle 14).

Die 38 Gene wurden ebenfalls durch LPS in ihrer Genexpression verstärkt, ausser *Arginase 1*, *Cxcl1* und *MhcII*, sowie *Cd11b* und *Cd80* im 6h-Stimulationsansatz und *Slfn3* im 24h-Experiment. Häufig wirkten LPS und IFN β synergistisch auf die Geninduktion (*Ccl2*, *Cx10*, *Icam-1*, *Il-6*, *iNos*, *Pecam-1*, *Slfn1*, *Slfn2*, *Slfn4* und *Tnfa* zu beiden Stimulationszeitpunkten; *Apol9a*, *Apol9b*, *Cmpk2*, *Il-10*, *Rtp4*, *Slfn5*, *Slfn8*, *Slfn10*, *Trim30* und *Vcam-1* im 6h-Stimulationsansatz). *Cxcl2* bildete zu beiden Zeitpunkten eine Ausnahme, da es als einziges Gen eine durch gleichzeitige Stimulation mit LPS und IFN β erniedrigte Genexpression im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation zeigte (siehe Tabellen 13 und 14).

24h	Unstimuliert				LPS 50 ng/ml				IFN β 100 U/ml				IFN β 1000 U/ml				LPS + IFN β 100				LPS + IFN β 1000			
	Gen	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T
Apol9a	0,9	0,4	15,7	1,2	23,5	13,5	10,7	1,2	1328,3	631,8	4,9	0,2	3848,6	1786,1	3,3	0,7	891,3	585,8	5,6	0,3	1233,6	566,8	5,0	0,2
Apol9b	0,9	0,3	12,5	1,1	16,1	6,2	8,5	1,2	1051,3	695,4	2,7	1,1	3272,0	2279,9	1,0	0,6	660,5	661,8	3,7	1,4	751,2	457,5	3,2	1,0
Arginase1	0,9	0,3	12,4	1,7	0,3	0,3	14,4	1,7	1,0	0,5	12,9	1,4	0,8	0,3	12,4	2,3	0,1	0,0	15,6	1,5	0,1	0,0	15,7	1,3
Ccl2	1,0	0,1	13,2	1,5	132,7	92,5	6,5	0,8	21,6	9,2	8,9	0,9	49,5	26,3	7,9	0,5	220,4	138,6	5,6	0,6	311,1	217,5	5,3	0,7
Cd11b	1,2	0,3	5,4	0,5	2,4	0,6	4,4	0,2	2,6	1,0	4,3	0,3	2,5	0,7	4,3	0,2	2,4	0,9	4,4	0,6	2,2	0,4	4,5	0,5
Cd80	1,0	0,2	10,0	1,2	2,4	1,0	8,8	0,9	2,7	0,7	8,6	1,2	2,4	0,5	8,8	1,2	1,7	0,4	9,3	1,1	1,7	0,5	9,2	1,0
Cmpk2	1,0	0,3	12,1	1,0	15,4	7,6	7,9	0,3	189,6	136,5	4,7	0,7	2796,5	2861,4	0,9	1,1	792,7	1443,6	3,4	1,3	830,9	499,7	2,2	0,4
Cxcl10	1,1	0,5	15,0	9,4	30,5	8,3	9,5	9,2	38,9	17,0	9,2	9,9	153,5	66,1	7,3	9,0	335,6	40,4	6,1	9,7	906,5	466,2	4,8	9,0
Cxcl1	1,2	0,4	11,9	1,2	1,3	0,4	11,7	1,0	1,2	0,3	11,7	0,9	1,5	0,3	11,4	0,9	1,9	0,7	11,0	1,1	2,3	0,5	10,9	1,0
Cxcl2	1,2	0,3	17,9	1,4	397,4	420,4	10,6	1,2	161,1	247,7	14,7	2,0	201,9	292,5	14,2	1,9	216,6	240,3	12,4	0,5	175,7	183,2	12,4	0,8
Icam-1	0,9	0,2	5,9	0,9	1,9	0,7	4,8	0,7	1,5	0,4	5,1	0,8	1,5	0,4	5,2	0,8	1,7	0,4	5,0	0,9	2,0	0,5	4,7	0,8
Il10	1,0	0,4	19,1	1,1	5,6	3,2	16,6	1,3	1,9	1,2	18,4	1,3	2,1	2,0	18,5	1,1	3,1	2,1	17,5	1,5	3,6	3,1	17,3	
Il6	1,3	0,8	16,1	0,6	430,9	276,4	8,0	1,5	25,3	17,7	11,9	0,3	69,8	40,1	10,3	0,7	1711,6	1252,3	6,0	0,7	2725,6	1582,8	5,1	1,0
iNos	1,1	0,6	9,1	2,3	21,0	11,9	4,8	1,3	4,6	2,3	7,0	2,0	4,7	1,7	6,9	2,1	65,1	27,5	3,1	1,5	87,5	27,3	2,6	1,6
Irif7	1,1	0,2	8,6	0,3	33,9	12,8	3,8	0,5	187,4	50,0	1,4	0,3	202,2	74,9	1,2	0,3	193,8	75,1	1,3	0,5	203,3	66,5	1,2	0,4
Irgm1	1,0	0,1	8,7	1,2	3,5	1,5	7,0	0,7	30,9	20,2	4,1	0,4	52,2	11,5	3,0	0,9	26,0	11,7	4,1	0,8	37,8	13,2	3,5	0,7
MhcII	1,1	0,4	11,1	1,1	0,8	0,2	11,5	1,2	0,9	0,2	11,5	1,1	0,8	0,2	11,5	1,2	1,1	0,3	11,1	1,3	1,2	0,2	11,0	1,3
Mpeg1	0,9	0,1	4,9	1,2	2,2	0,3	3,4	1,2	6,9	2,3	1,9	0,7	12,9	4,7	1,0	0,7	7,4	5,0	1,7	0,5	10,5	7,1	1,4	0,5
Mx1	1,1	0,1	17,1	0,9	39,6	27,6	12,2	1,4	1909,0	565,2	6,4	0,7	2928,8	806,7	5,7	0,7	2206,4	474,4	6,1	0,7	2821,7	572,3	5,8	0,8
Mx2	1,3	0,5	17,1	0,5	19,8	11,7	13,3	0,2	251,4	133,7	9,6	0,4	327,8	186,8	9,2	0,4	246,8	135,8	9,6	0,7	349,8	214,1	9,1	0,4
Oas2	1,1	0,2	11,5	0,9	12,0	4,5	8,1	0,5	85,2	44,6	5,4	1,0	90,1	40,9	5,3	0,8	55,7	16,1	5,9	0,6	72,5	30,3	5,6	0,5
Pecam-1	1,3	0,5	16,9	0,8	4,9	2,2	15,0	1,3	2,0	0,6	16,2	1,1	2,0	0,4	16,1	1,3	8,0	2,1	14,2	1,1	9,8	2,5	13,9	1,2
Rtp4	1,1	0,6	13,1	1,2	48,1	32,0	7,3	0,4	632,2	528,6	3,9	0,7	1323,9	1212,1	2,8	0,9	921,6	881,7	3,4	0,9	1209,7	1032,4	2,8	0,8
Sifn10	0,9	0,1	8,4	0,7	2,3	0,7	7,2	0,5	4,6	1,6	6,2	0,6	6,2	1,9	5,7	1,1	3,9	2,1	6,5	0,7	4,9	2,2	6,1	0,6
Sifn1	0,9	0,2	18,3	1,9	27,0	9,8	13,5	1,8	433,0	161,3	9,5	1,8	1464,8	566,7	7,8	1,6	961,6	577,7	8,4	1,4	1856,8	1065,7	7,5	1,3
Sifn2	0,9	0,3	8,7	1,9	9,3	1,9	5,1	1,8	20,5	7,0	4,0	2,0	35,3	5,8	3,2	1,6	36,3	9,4	3,2	1,8	52,4	11,8	2,6	1,4
Sifn3	0,9	0,1	7,9	1,5	1,8	0,7	6,9	1,6	4,4	1,1	5,6	1,6	7,3	3,1	4,9	1,6	3,7	1,2	5,9	1,1	4,6	1,8	5,6	1,1
Sifn4	0,9	0,1	16,5	1,6	28,6	6,7	11,4	1,9	332,1	100,8	7,9	1,3	709,4	280,8	6,9	1,5	818,5	455,3	6,8	1,3	1387,3	767,3	6,1	1,6
Sifn5	1,0	0,2	13,9	1,4	18,0	7,1	9,7	1,5	75,8	29,8	7,7	0,9	113,8	22,8	7,2	1,1	89,4	19,8	7,4	1,2	116,1	7,1	7,1	1,3
Sifn8	1,0	0,1	14,5	1,2	4,3	1,7	12,5	1,6	13,8	9,9	11,0	1,8	29,9	11,9	9,7	1,9	21,6	12,5	10,3	1,6	30,1	10,0	9,7	1,4
Sifn9	1,3	0,5	14,6	1,3	4,1	0,7	12,9	1,4	28,8	12,2	10,2	1,9	115,5	51,0	8,2	0,8	27,3	9,1	10,2	1,4	44,2	18,6	9,6	1,1
Sp100	1,1	0,3	10,8	0,9	7,5	3,9	7,9	0,2	41,6	24,9	5,6	0,4	95,8	41,3	4,2	0,2	52,6	29,4	5,1	0,4	76,9	39,0	4,6	0,2
Stat1	1,2	0,3	7,6	1,7	4,8	1,5	5,6	1,4	34,3	13,9	3,1	1,4	41,6	19,4	2,6	1,5	31,8	12,4	2,9	1,5	41,4	22,7	2,6	1,3
Tnfa	0,9	0,2	7,4	1,2	2,7	1,2	6,0	0,9	1,5	0,3	6,7	1,0	1,4	0,2	6,8	1,2	2,7	0,8	5,9	0,8	2,8	0,7	5,8	1,0
Trim30	1,1	0,2	12,7	2,6	39,9	33,7	7,9	1,5	891,2	722,9	3,8	0,8	1678,6	1040,8	2,5	1,6	863,4	605,5	3,8	1,0	1088,0	736,5	3,3	1,1
Ube11	1,0	0,1	9,2	0,7	2,9	0,3	7,7	0,7	11,5	4,3	5,8	0,2	16,6	1,7	5,2	0,7	13,0	2,9	5,6	0,5	15,0	2,5	5,4	0,6
Usp18	1,1	0,1	9,0	1,1	9,8	3,3	5,5	1,3	74,5	34,9	2,7	1,8	115,4	34,7	2,0	1,4	75,1	29,4	2,5	1,6	94,5	28,3	2,2	1,4
Vcam-1	4,5	5,0	19,9	1,5	35,6	41,9	17,3	1,4	39,5	54,6	17,4	1,6	70,9	98,7	17,2	2,3	50,2	59,5	16,7	1,8	56,7	66,6	16,5	1,8

Tabelle 13: Validierung der ausgewählten Gene mittels quantitativer Real Time-PCR in BV-2 Mikrogliazellen. Farbliche Kodierung der relativen Quantifizierung (RQ) jeweils in Bezug auf die unstimulierte Referenz. Stimulationszeit 24h. Zusätzliche Angabe von Avg ΔC_T und jeweilige SD-Werte. n=9 pro Stimulationsansatz. Dargestellte Werte alphabetisch nach Genname sortiert. Avg, average (Mittelwert); SD, standard deviation (Standardabweichung)

6h	Unstimuliert				LPS 50 ng/ml				IFN β 100 U/ml				IFN β 1000 U/ml				LPS + IFN β 100				LPS + IFN β 1000							
	Gen	RQ		RQ SD		Avg ΔC_T		Avg ΔC_T SD		RQ		RQ SD		Avg ΔC_T		Avg ΔC_T SD		RQ		RQ SD		Avg ΔC_T		Avg ΔC_T SD				
		RQ	SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD			
Apol9a	1,0	0,1	15,5	0,8	327,9	189,1	7,6	0,4	1192,4	804,4	5,8	0,6	1233,6	799,5	5,8	0,7	1502,1	1099,2	5,5	0,8	1502,2	965,0	5,5	0,7				
Apol9b	0,9	0,3	12,2	1,5	200,1	109,2	4,8	0,7	560,0	310,6	3,4	0,6	596,9	342,7	3,3	0,5	740,5	393,1	3,0	0,6	772,4	505,6	3,0	0,5				
Arginase1	0,8	0,2	14,3	2,8	0,7	0,3	14,7	2,2	3,6	2,1	11,6	3,2	4,0	1,1	12,0	2,5	1,2	0,5	13,9	2,2	1,1	0,3	13,8	2,3				
Ccl2	0,9	0,2	10,5	0,7	90,3	23,6	3,7	0,3	58,7	14,6	4,3	0,6	52,9	9,6	4,5	0,4	217,8	109,3	2,6	0,3	197,0	81,1	2,7	0,2				
Cd11b	1,1	0,3	7,2	0,4	1,3	0,3	7,0	0,2	1,5	0,6	6,8	0,5	1,4	0,4	6,9	0,4	1,2	0,3	7,1	0,2	1,3	0,3	7,0	0,4				
Cd80	0,9	0,2	10,2	0,5	1,4	0,5	9,6	0,7	1,1	0,5	9,9	0,7	0,9	0,4	10,2	0,8	1,7	0,7	9,3	0,8	1,8	0,8	9,3	0,9				
Cmpk2	0,8	0,4	11,1	1,6	538,0	416,7	2,5	1,5	1915,1	1649,6	0,9	1,3	1964,4	1738,3	0,9	1,3	2558,2	1941,8	0,4	1,1	3043,0	2792,3	0,3	1,2				
Cxcl10	1,0	0,1	7,9	0,6	675,0	347,8	-1,4	0,3	494,6	154,6	-1,1	0,2	592,3	238,1	-1,3	0,1	3041,1	1765,8	-3,4	0,6	3391,3	2066,1	-3,5	0,7				
Cxcl1	0,9	0,2	11,1	1,0	1,8	1,1	10,8	0,5	3,0	3,4	10,4	0,8	3,6	3,8	10,2	0,5	3,4	3,8	10,4	0,8	3,1	3,3	10,5	0,6				
Cxcl2	1,0	0,2	17,7	0,3	1557,4	1454,3	7,5	1,3	5,3	4,8	15,8	1,4	5,6	4,2	15,5	1,0	1004,6	1104,5	8,5	1,6	1069,4	1144,4	8,4	1,6				
Icam-1	0,8	0,2	5,2	0,5	3,8	1,1	3,0	0,4	2,1	0,8	3,9	0,5	1,7	0,5	4,1	0,5	4,5	1,0	2,8	0,3	4,5	1,2	2,8	0,3				
Il10	0,8	0,2	18,7	0,5	38,0	55,9	17,3	0,7	4,6	4,6	19,5	3,2	8,9	10,4	18,3	1,1	45,1	66,7	17,0	0,8	33,4	49,2	17,1	0,7				
Il6	1,2	0,3	15,8	0,7	494,9	207,1	7,3	0,5	171,8	66,6	8,7	0,8	171,2	51,4	8,7	0,7	1538,1	540,5	5,6	0,3	1507,5	331,8	5,6	0,3				
iNos	0,8	0,4	16,1	1,2	855,7	730,8	6,4	0,2	24,6	14,7	11,1	0,7	18,2	15,2	12,0	1,1	3049,1	1914,6	4,2	0,4	3537,9	2317,1	4,0	0,5				
Irif7	1,0	0,2	8,1	0,4	42,5	16,7	2,9	0,8	117,3	51,0	1,4	0,9	104,3	51,0	1,6	0,9	113,5	53,5	1,5	0,9	119,6	57,3	1,4	0,9				
Irgm1	1,1	0,1	8,5	0,3	16,7	3,7	4,6	0,5	42,1	5,5	3,3	0,4	46,7	10,3	3,1	0,5	45,3	12,8	3,2	0,6	48,4	15,6	3,1	0,6				
Mhcl1	1,0	0,2	10,1	0,2	0,9	0,1	10,3	0,3	1,1	0,2	10,0	0,5	0,9	0,2	10,2	0,4	1,0	0,3	10,1	0,6	1,0	0,4	10,1	0,7				
Mpeg1	1,0	0,2	6,7	1,4	3,2	0,9	5,0	1,0	8,8	4,5	3,5	1,1	9,2	4,1	3,7	1,1	10,3	4,5	3,6	1,0	8,9	4,3	3,7	1,0				
Mx1	0,9	0,3	15,7	1,0	347,7	141,1	7,1	1,2	2431,0	1126,7	4,4	0,6	2243,4	996,9	4,5	0,6	2510,3	1208,6	4,4	0,8	2419,0	1115,1	4,4	0,7				
Mx2	1,0	0,2	16,9	1,1	214,1	180,7	9,3	0,3	727,0	366,3	7,5	0,9	695,5	408,1	7,6	1,0	862,2	573,0	7,3	0,8	964,5	746,7	7,3	0,9				
Oas2	1,4	0,7	11,0	1,1	38,6	21,1	6,2	0,7	106,1	67,1	5,0	0,9	115,6	78,8	4,9	0,9	83,1	50,0	5,3	0,8	96,9	61,4	5,1	0,9				
Pecam-1	1,0	0,1	16,4	0,9	2,4	0,3	15,2	1,1	3,4	1,2	14,6	1,3	2,8	0,4	15,0	1,1	3,6	0,6	14,6	1,1	3,8	0,9	14,5	1,1				
Rtp4	1,0	0,2	12,3	1,8	274,9	231,8	4,0	0,4	457,1	395,7	3,3	0,3	491,2	456,2	3,2	0,2	560,4	467,1	2,9	0,4	639,1	611,1	2,8	0,3				
Sifn10	1,2	0,2	7,8	0,5	4,5	1,1	5,7	0,7	4,6	1,5	5,7	0,7	4,9	1,6	5,6	0,8	6,4	1,9	5,2	0,8	6,2	1,8	5,3	0,7				
Sifn1	0,9	0,3	17,6	1,3	755,2	494,5	7,9	0,5	1731,9	1331,1	6,8	0,5	1893,3	1498,9	6,8	0,6	4875,8	4628,8	5,6	0,8	4541,5	3989,3	5,6	0,6				
Sifn2	0,9	0,4	6,8	1,1	15,0	3,0	2,6	0,5	23,0	13,2	2,1	0,4	29,4	21,4	1,9	0,6	53,4	45,6	1,2	0,7	50,0	41,8	1,2	0,7				
Sifn3	1,1	0,2	6,4	0,4	2,9	0,6	5,0	0,3	5,5	1,8	4,2	0,3	5,1	1,3	4,3	0,3	4,2	1,6	4,6	0,3	4,1	1,5	4,7	0,3				
Sifn4	1,1	0,4	15,4	0,4	133,6	108,3	8,8	0,9	367,0	237,8	7,4	1,4	438,5	320,2	7,2	1,7	987,5	685,9	6,1	1,8	926,5	651,8	6,2	1,7				
Sifn5	0,9	0,2	15,9	2,2	224,1	124,9	8,8	0,9	640,8	500,7	7,7	0,7	713,2	588,7	7,6	0,8	870,2	475,6	7,2	0,6	1084,3	754,9	6,8	0,6				
Sifn8	1,0	0,4	13,9	0,8	30,0	18,7	9,0	0,4	32,0	20,3	9,0	0,4	34,1	22,6	8,9	0,3	60,4	43,1	8,2	0,5	57,3	37,6	8,2	0,4				
Sifn9	2,1	3,5	15,0	1,6	43,2	31,7	9,8	0,7	134,7	43,7	7,8	0,6	161,9	42,8	7,5	0,6	158,6	67,4	7,6	0,6	203,0	149,9	7,4	0,4				
Sp100	1,1	0,2	11,0	0,3	23,6	8,2	6,6	0,6	79,1	40,7	4,9	0,8	83,7	37,7	4,8	0,7	82,5	53,6	5,0	1,0	80,3	43,1	4,9	0,9				
Stat1	1,0	0,1	6,0	0,2	10,7	1,5	2,6	0,3	23,1	4,2	1,5	0,4	23,6	8,2	1,5	0,6	19,9	4,7	1,7	0,5	21,4	4,5	1,6	0,4				
Tnfa	0,9	0,1	6,9	1,7	2,4	0,9	5,6	1,5	1,6	0,5	6,2	1,5	1,3	0,5	6,6	1,6	2,6	1,2	5,6	1,3	2,7	1,0	5,5	1,4				
Trim30	1,0	0,0	19,6	4,2	383,3	392,1	9,4	2,9	1990,0	2090,4	7,5	2,3	1933,3	2050,3	7,5	2,3	2709,1	3290,1	7,2	2,1	2650,6	2931,8	7,2	2,1				
Ube11	1,1	0,2	10,4	0,4	6,8	1,5	7,7	0,2	12,1	4,9	7,0	0,5	12,9	7,0	7,0	0,6	13,8	5,4	6,8	0,5	14,6	6,8	6,7	0,5				
Usp18	0,9	0,2	8,1	1,0	44,0	14,4	2,6	0,6	97,2	41,8	14,5	0,4	97,9	50,8	1,5	0,3	98,3	45,0	1,5	0,4	100,1	54,0	1,5	0,4				
Vcam-1	1,2	0,3	18,6	1,4	61,3	42,0	13,1	1,4	4,1	5,6	17,7	2,0	2,4	2,3	18,1	1,5	135,6	117,6	12,2	1,5	150,5	133,6	12,1	1,5				

Tabelle 14: Validierung der ausgewählten Gene mittels quantitativer Real Time-PCR in BV-2 Mikrogliazellen. Farbliche Kodierung der relativen Quantifizierung (RQ) jeweils in Bezug auf die unstimulierte Referenz. Stimulationszeit 6h. Zusätzliche Angabe von Avg ΔC_T und jeweilige SD-Werte. n=9 pro Stimulationsansatz. Dargestellte Werte alphabetisch nach Genname sortiert. Avg, average (Mittelwert); SD, standard deviation (Standardabweichung)

Das durch IFN β induzierte Genexpressionsprofil zeigte kein eindeutig pro- oder antiinflammatorisches Muster, da eine Vielzahl von Genen

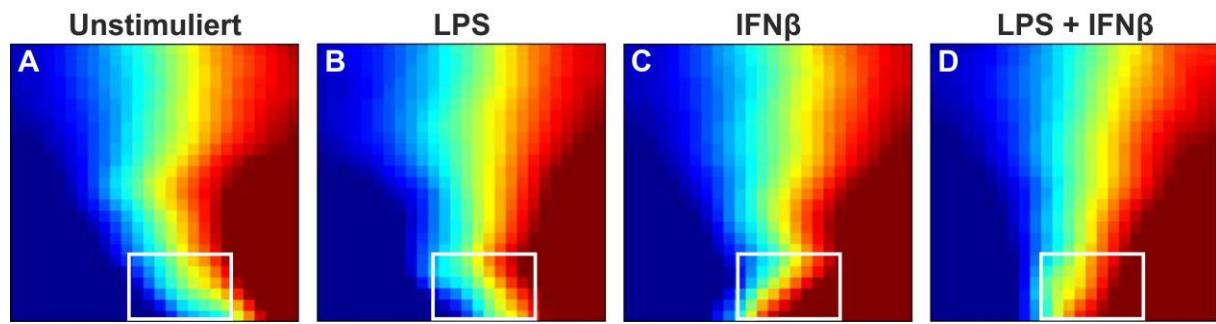


Abbildung 6: Gene expression dynamics inspector (GEDI). $n= 28350$ Transkripte. Gruppierung der Gene in Minicluster ähnlicher Genexpression. Rote Kacheln entsprechen hoher Genexpression, blaue Kacheln niedriger bis keiner Genexpression.

4.2 Genvalidierung des IFN β Effekts in primären Mikrogliazellen des Gehirns

Nachdem ein deutlicher IFN β -Effekt auf die Transkription in der BV-2 Zelllinie nachgewiesen werden konnte, erfolgte eine Validierung zur Bestätigung der veränderten Gentranskription mittels quantitativer Realtime-PCR auch in primären Mikrogliazellen des Gehirns. Dies ist insofern notwendig, da bereits verschiedene biologische Unterschiede zwischen der Tumorzelllinie BV-2 und primären Mikroglia beschrieben worden sind und Ergebnisse sich zwar häufig überschneiden, aber nicht immer übereinstimmen (de Jong et al., 2008). Dazu wurden 17 Gene von den 38 vorherigen Genen ausgewählt. Auch hier wurde die Validierung in drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten durchgeführt. Die primären Mikrogliazellen wurden *ex vivo* aus dem Gehirn von Wildtyp- und RS1h $^{/\gamma}$ MAFIA-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund gewonnen und anschließend für 6h und 24 h mit 100 U/ml oder 1000 U/ml IFN β stimuliert. Aufgrund der geringeren RNA-Ausbeute bei den primären Zellen wurden 25ng statt 50 ng cDNA in der qRT-PCR eingesetzt und eine Duplikat- anstatt einer Triplikatmessung vorgenommen. Auch in den primären Zellen wurden die Ergebnisse auf eine unstimulierte Probe als Kalibrator bezogen, der gleich 1 gesetzt wurde (Wildtyp und Rs1h $^{/\gamma}$ getrennt). *Atp5b* diente erneut als Referenzgen (*Housekeeper*), das stets mitgemessen und worauf die Ergebnisse der anderen gemessenen Gene normalisiert wurden.

Da unterschiedliche cDNA-Mengen und Duplikat- statt Triplikatmessungen in der qRT-PCR angewandt wurden, war kein direkter Vergleich der Genexpressionsraten zwischen BV-2 und primären Mikrogliazellen möglich. Die IFN β -Induktion wurde aber

für alle 17 ausgewählten Gene, ausser *Cxcl2*, bestätigt. Insgesamt zeigte sich ein Trend zu niedrigeren Expressionsraten für primäre Mikroglia im Vergleich zu den BV-2 Zellen, mit Ausname von *Arginase1*, *Cxcl10*, *Ube1l* und *Usp18*. Diese Gene zeigten trotz der halben Menge an eingesetzter cDNA eine höhere Geninduktion durch IFN β in den primären Mikroglia (siehe Tabellen 15 und 16).

24h	Wildtyp Unstimuliert				Wildtyp IFN β 100 U/ml				Wildtyp IFN β 1000 U/ml				Rs1h-Y Unstimuliert				Rs1h-Y IFN β 100 U/ml				Rs1h-Y IFN β 1000 U/ml			
	Gen	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD			
		RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD			
<i>Apol9a</i>	0,9	0,2	12,0	0,5	229,9	37,4	3,9	0,3	275,2	48,7	3,7	0,4	0,9	0,3	13,0	0,7	455,4	129,9	3,9	0,5	485,4	117,6	3,8	0,4
<i>Apol9b</i>	0,9	0,2	9,6	0,5	196,1	19,4	1,7	0,2	224,3	30,0	1,6	0,2	1,1	0,2	10,3	1,0	317,6	73,5	2,1	0,9	285,9	31,6	2,2	1,0
<i>Arginase1</i>	1,3	0,8	13,0	1,3	6,0	2,9	10,7	1,3	4,9	3,1	11,2	1,1	1,1	0,6	13,8	1,3	1,7	0,5	13,1	1,3	1,9	1,3	13,2	1,8
<i>Ccl2</i>	1,0	0,3	7,6	0,4	5,7	2,3	5,1	0,4	5,9	2,1	5,1	0,4	1,3	0,7	7,3	0,8	6,6	1,7	4,8	0,8	6,7	1,4	4,8	1,3
<i>Cmpk2</i>	1,0	0,3	10,4	0,5	548,2	106,5	1,2	0,2	545,5	147,0	1,3	0,3	1,0	0,3	10,9	1,2	623,6	75,3	1,6	1,1	619,7	108,6	1,7	1,2
<i>Cxcl10</i>	1,8	0,6	6,4	0,6	884,7	146,7	-2,8	0,3	1046,6	210,3	-3,0	0,4	0,7	0,2	7,1	2,0	837,9	298,1	-3,1	2,1	815,6	229,2	-3,1	2,1
<i>Cxcl2</i>	1,1	0,2	11,2	0,5	1,2	0,4	11,1	0,2	1,0	0,3	11,3	0,5	1,0	0,4	11,1	0,7	1,9	0,8	10,2	0,4	1,7	0,4	10,3	0,7
<i>Il6</i>	0,9	0,1	8,1	0,3	4,8	1,2	5,8	0,3	5,8	1,5	5,5	0,3	1,0	0,2	7,4	0,5	4,3	0,9	5,3	0,6	4,8	1,3	5,2	0,8
<i>iNos</i>	1,1	0,2	12,3	0,3	1,6	0,5	11,8	0,5	1,8	0,6	11,6	0,5	0,9	0,3	13,2	1,1	2,6	1,6	11,7	1,2	3,0	2,4	11,7	1,5
<i>Irgm1</i>	0,9	0,2	6,5	0,7	30,4	4,3	1,4	0,4	36,2	10,0	1,2	0,2	0,9	0,3	8,3	1,3	43,7	8,7	2,9	0,8	53,5	12,5	2,4	0,8
<i>Mpeg1</i>	1,0	0,3	4,9	0,3	4,3	1,3	2,8	0,3	4,4	1,1	2,8	0,3	1,0	0,2	3,6	0,5	3,0	0,6	2,1	0,6	3,1	0,5	2,0	0,5
<i>Mx1</i>	0,8	0,4	13,8	0,9	1600,6	357,0	2,6	0,5	1676,1	407,5	2,6	0,4	1,0	0,4	15,0	0,9	4546,3	1364,1	2,8	0,2	4948,1	522,0	2,7	0,3
<i>Rtp4</i>	0,9	0,2	8,2	0,3	48,2	6,6	2,5	0,2	52,3	8,8	2,4	0,2	1,0	0,2	9,3	1,0	70,6	7,1	3,2	0,9	71,7	9,8	3,1	1,0
<i>Sp100</i>	1,2	0,3	9,8	0,4	55,6	7,0	4,2	0,2	64,7	8,3	3,9	0,2	1,1	0,4	9,6	0,6	49,5	6,9	4,1	0,6	55,1	6,2	4,0	0,6
<i>Trim30</i>	1,2	0,2	7,6	0,3	69,4	14,7	1,7	0,2	80,1	13,0	1,5	0,3	1,0	0,1	7,9	0,8	57,3	12,3	2,2	0,8	59,5	6,6	2,0	1,0
<i>Ube1l</i>	1,0	0,2	10,2	0,3	49,5	12,1	4,6	0,3	62,2	15,3	4,2	0,3	1,2	0,4	10,4	0,8	51,4	9,3	4,9	0,9	57,9	12,4	4,8	1,2
<i>Usp18</i>	1,1	0,2	7,6	0,3	236,7	45,4	-0,2	0,2	293,7	60,3	-0,5	0,4	1,1	0,2	8,0	0,6	309,9	64,6	-0,2	0,5	347,1	41,5	-0,4	0,6

Tabelle 15: Validierung der ausgewählten Gene mittels quantitativer Real Time-PCR in primären Mikrogliazellen des Gehirns von Wildtyp- und Rs1h $^{\gamma Y}$ -Mäusen. Farbliche Kodierung der relativen Quantifizierung (RQ) jeweils in Bezug auf die unstimulierte Referenz (Wildtyp). Stimulationszeit 24h. Zusätzliche Angabe von Avg ΔC_T und jeweilige SD-Werte. n=9 pro Stimulationsansatz. Dargestellte Werte alphabetisch nach Genname sortiert. Avg, average (Mittelwert); Rs1h $^{\gamma Y}$, Retinoschisin knockout Maus; SD, standard deviation (Standardabweichung).

Ob ein signifikanter Unterschied zwischen den primären Mikrogliazellen aus dem Gehirn von Wildtyp- und Rs1h $^{\gamma Y}$ -Mäusen bestand, wurde über einen zweiseitigen Student t-Test ($p < 0,05$) ermittelt. Dabei wurden nur Gene berücksichtigt, die in beiden IFN β -Stimulationen (100 und 1000 U/ml) einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen zeigten. In der 24h-Stimulation waren die Gene *Apol9a*, *Apol9b*, *Irgm1*, *Mx1*, *Rtp4* und *Usp18* in den Mikrogliazellen von Rs1h $^{\gamma Y}$ -Mäusen deutlich höher exprimiert im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Genau umgekehrt verhielt es sich für *Arginase1* und *Mpeg1*. Der 6h-Stimulationsansatz zeigte eine höhere Expression für *Ube1l* in den Rs1h $^{\gamma Y}$ -Mäusen und für *Cmpk2* und *Mx1* in den Wildtyp-Mäusen (siehe Tabellen 15 und 16).

6h	Wildtyp Unstimuliert				Wildtyp IFN β 100 U/ml				Wildtyp IFN β 1000 U/ml				Rs1h-Y Unstimuliert				Rs1h-Y IFN β 100 U/ml				Rs1h-Y IFN β 1000 U/ml			
	Gen	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD			
		RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD	RQ	RQ SD	Avg ΔC_T	Avg ΔC_T SD			
<i>Apol9a</i>	1,1	0,3	12,6	1,0	106,5	18,5	5,9	0,5	113,7	39,3	5,8	0,4	0,9	0,2	11,3	1,6	126,5	63,7	4,0	1,5	159,7	73,9	3,7	1,6
<i>Apol9b</i>	1,0	0,4	10,0	0,7	78,6	22,9	3,6	0,6	81,2	16,2	3,6	0,4	0,8	0,2	9,3	0,7	68,3	24,3	3,0	0,7	75,6	24,6	2,8	0,8
<i>Arginase1</i>	0,9	0,2	14,5	0,5	5,0	3,4	12,2	1,1	5,9	4,1	12,0	1,1	0,9	0,5	14,1	1,3	8,0	7,2	11,3	1,1	10,2	9,9	11,2	1,4
<i>Ccl2</i>	1,1	0,2	8,0	0,4	11,9	3,9	4,6	0,6	15,3	10,7	4,5	1,2	0,8	0,3	7,6	0,8	7,8	3,0	4,4	1,2	7,8	3,5	4,5	1,4
<i>Cmpk2</i>	1,3	0,5	11,3	0,6	1455,5	345,8	1,1	0,3	1793,9	676,6	0,9	0,5	0,8	0,2	10,4	0,9	921,9	149,2	0,2	0,9	896,4	151,9	0,2	0,9
<i>Cxcl10</i>	1,3	0,6	7,0	0,8	1343,4	441,2	-3,1	0,4	1352,5	620,1	-3,1	0,5	1,0	0,5	6,9	0,7	1339,1	277,7	-3,6	0,6	1646,2	688,3	-3,8	0,6
<i>Cxcl2</i>	1,2	0,7	12,2	0,8	0,8	0,4	12,9	1,1	0,7	0,6	13,2	0,9	0,8	0,3	11,6	1,2	1,2	0,7	11,2	1,2	1,9	1,7	11,0	1,7
<i>Il6</i>	1,0	0,2	8,3	0,4	6,9	1,8	5,7	0,5	6,2	2,1	5,8	0,3	0,9	0,2	6,4	0,9	11,4	8,9	3,1	1,9	8,7	9,8	3,7	1,5
<i>iNos</i>	0,9	0,3	13,1	0,5	5,0	1,4	10,6	0,7	4,3	1,5	10,8	0,7	0,9	0,3	12,0	2,0	11,7	6,1	8,4	1,8	11,6	9,8	8,7	2,6
<i>Irgm1</i>	0,9	0,3	8,3	0,9	33,6	14,0	2,9	0,3	29,0	11,1	3,2	0,4	1,1	0,4	8,4	0,8	50,8	42,4	3,1	0,4	80,5	69,2	2,7	0,4
<i>Mpeg1</i>	0,9	0,4	4,3	1,1	2,0	0,5	3,0	1,7	2,0	0,3	3,0	1,5	1,2	0,5	3,9	0,4	2,3	0,6	2,9	0,2	2,1	0,8	3,1	0,3
<i>Mx1</i>	1,4	0,6	14,8	1,1	2111,1	306,2	4,0	0,4	2706,5	833,6	3,7	0,3	0,8	0,4	13,7	1,0	1210,7	327,5	2,9	0,7	1040,1	344,3	3,2	0,7
<i>Rtp4</i>	0,9	0,3	8,6	1,4	56,2	21,4	2,5	1,5	71,5	41,0	2,2	1,7	0,9	0,2	8,5	0,5	58,7	17,7	2,5	0,6	51,0	19,0	2,7	0,5
<i>Sp100</i>	1,0	0,3	10,4	0,5	27,1	8,5	5,6	0,4	27,3	10,9	5,6	0,5	1,0	0,2	9,6	0,5	33,0	7,1	4,6	0,5	29,5	7,0	4,8	0,4
<i>Trim30</i>	1,0	0,2	8,1	0,7	24,5	2,8	3,5	0,4	25,5	7,6	3,5	0,3	0,9	0,1	7,2	0,3	34,4	12,7	2,0	0,4	33,5	9,7	2,0	0,3
<i>Ube1l</i>	1,1	0,3	10,8	0,6	22,1	2,8	6,4	0,5	26,4	6,3	6,2	0,4	1,0	0,2	10,2	0,6	32,9	7,2	5,2	0,8	37,4	6,5	5,0	0,7
<i>Usp18</i>	1,2	0,3	8,0	0,9	161,9	53,9	0,9	0,7	194,5	91,2	0,7	0,7	0,8	0,2	7,9	0,7	142,8	50,0	0,4	0,5	175,0	58,2	-0,2	0,2

Tabelle 16: Validierung der ausgewählten Gene mittels quantitativer Real Time-PCR in primären Mikrogliazellen des Gehirns von Wildtyp- und Rs1h-Y-Mäusen. Farbliche Kodierung der relativen Quantifizierung (RQ) jeweils in Bezug auf die unstimulierte Referenz (Wildtyp). Stimulationszeit 6h. Zusätzliche Angabe von Avg ΔC_T und jeweilige SD-Werte. N=9 pro Stimulationsansatz. Dargestellte Werte alphabetisch nach Genname sortiert. Avg, average (Mittelwert); Rs1h-Y, Retinoschisin knockout Maus; SD, standard deviation (Standardabweichung).

4.3 Interferon- β Einfluss auf Mikrogliafunktionen

Die Genexpressionsanalysen ergaben einen deutlichen Einfluss von IFN β auf transkriptioneller Ebene, vor allem bei an Immunregulation beteiligten Genen. Wichtige Aufgaben der Mikroglia innerhalb einer Immunantwort sind Migration und Phagozytose. Um eine Auswirkung der IFN β -Stimulation auf funktioneller Ebene nachzuweisen wurden ein Migrations- und ein Phagozytose-Assay durchgeführt.

4.3.1 IFN β -Effekt auf das Migrationsverhalten von BV-2 Mikroglia

Im RNA-Mikroarray und in der qRT-PCR zeigten sich einige Migrationsgene (*Cxcl10*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl2*) hochreguliert. Nachdem Mikrogliazellen als hochmotil gelten und die Migration zum Ort von Gewebeschädigung, Infektion und Inflammation eine der essentiellen Funktionen von Mikroglia ist, wurde zuerst das Migrationsverhalten von BV-2 Mikroglia untersucht. Dazu wurde der unter 3.5.1 beschriebene Migrations-Assay benutzt.

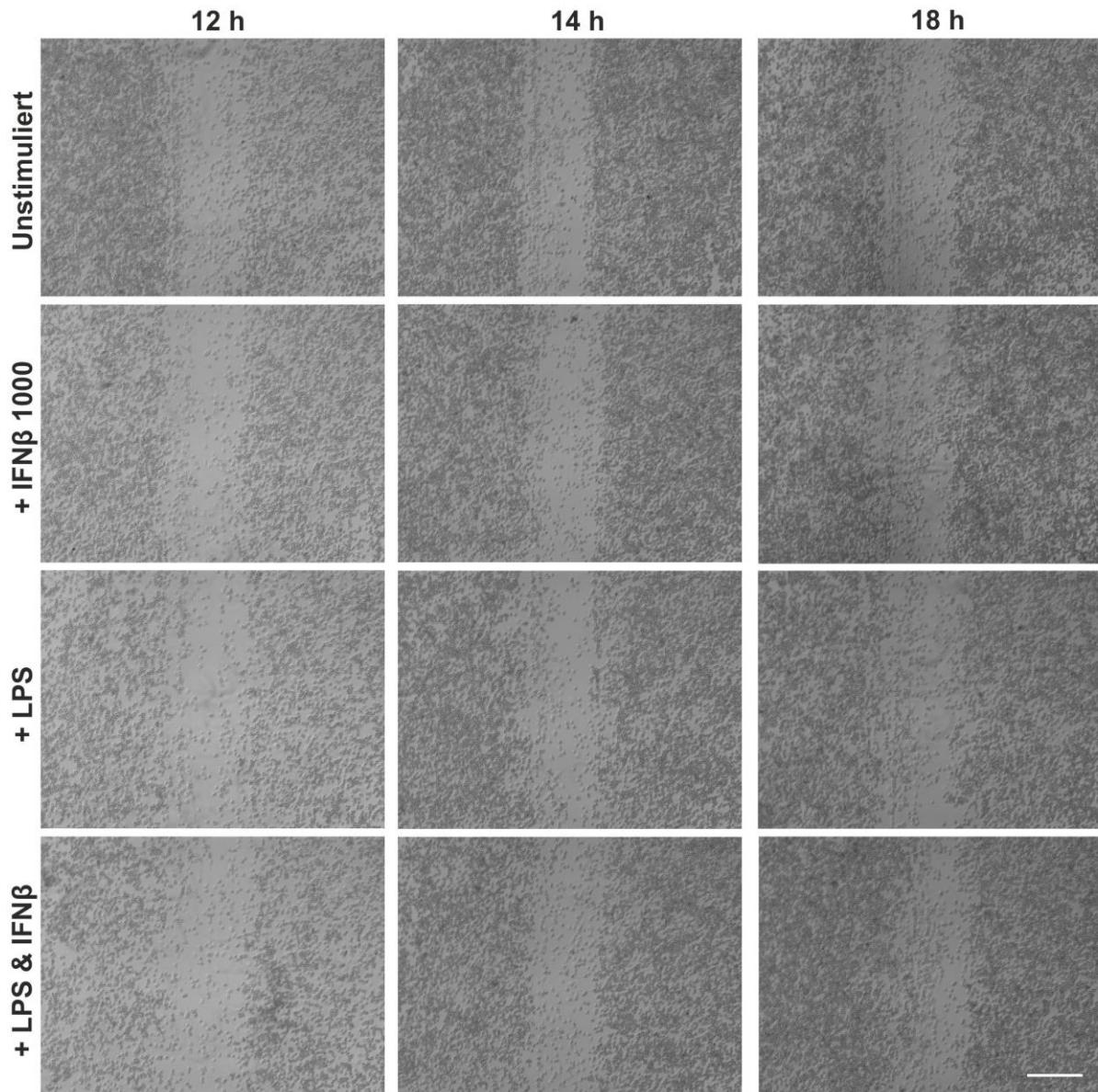


Abbildung 7: Effekte von LPS und IFN β auf das Migrationsverhalten von BV-2-Mikroglia nach 12 h, 14 h und 18 h. Der Ansatz mit IFN β 100 U/ml wird hier nicht gezeigt. Der Skalierungsbalken repräsentiert eine Länge von 2,5 mm.

Es folgte die Untersuchung der Migration zu den Zeitpunkten 6h, 12h, 14h, 18h und 24h. 6h Versuchsdauer erwiesen sich als zu kurz und 24h als zu lang, es kam entweder zu keiner aussagekräftigen Zellwanderung oder die Migration war zu weit fortgeschritten um eine akkurate Zählung zu gewährleisten. Die Stimulierung mit IFN β zeigte zu den Zeitpunkten 12h, 14h und 18h anhand der Aufnahmen keinen Effekt auf die Migration im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle oder den LPS-behandelten Zellen (siehe Abbildung 7). Die Auszählung der migrierten Zellen nach dem unter 3.5.1 beschriebenen Muster zeigte keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 8).

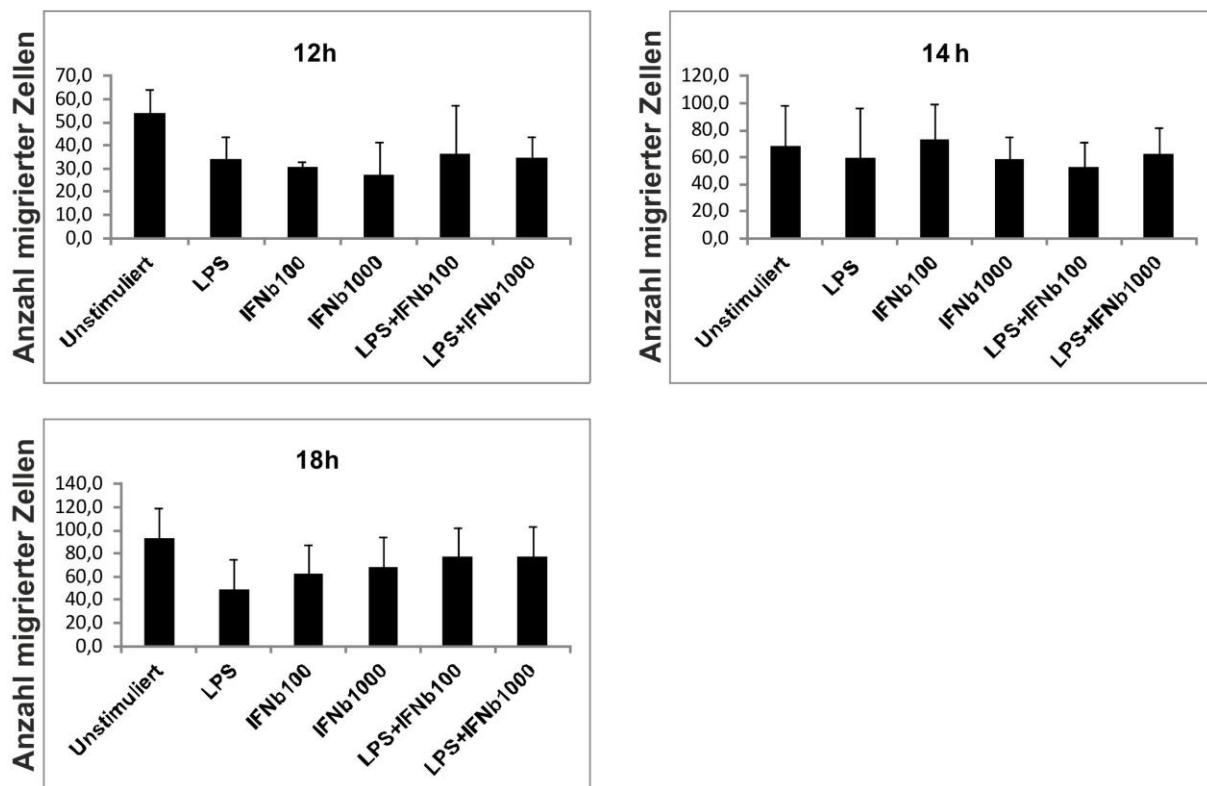


Abbildung 8: Anzahl der migrierten BV-2 Zellen \pm SD zu den Zeitpunkten 12h, 14h und 18h. Die Stimulierung mit LPS 50 ng/ml und/oder IFN β in der Konzentration 100 oder 1000 U/ml zeigte keine statistisch signifikante Änderung der Migration. Genauer Versuchsaufbau und Auszählungsmodus siehe 3.5.1. n=6. P > 0,05; Student t-test. SD, standard deviation (Standardabweichung).

4.3.2 IFN β -Effekt auf die Phagozytoseaktivität von BV-2 Mikroglia

Ob IFN β überhaupt einen Effekt auf die Phagozytoseaktivität in BV-2 Mikrogliazellen hat, wurde in einem Phagozytose-Assay wie unter 3.5.2 beschrieben ermittelt. Zunächst wurde die Inkubation der Stimulanzien und der zu phagozytierenden Latexbeads auf 6h angesetzt. Dies zeigte keine zufriedenstellende Partikelaufnahme seitens der BV-2 Zellen und so wurde die Inkubationszeit auf 24 h erhöht. Hier konnte eine deutliche Induktion der Partikelaufnahme durch IFN β im Vergleich zu unstimulierten Zellen gezeigt werden (siehe Abbildung 9 A und B). Auch die Stimulation mit LPS erhöhte die Phagozytoseleistung (siehe Abbildung 9 C) und die gemeinsame Inkubation steigerte die Aktivität nochmals (siehe Abbildung 9 D).

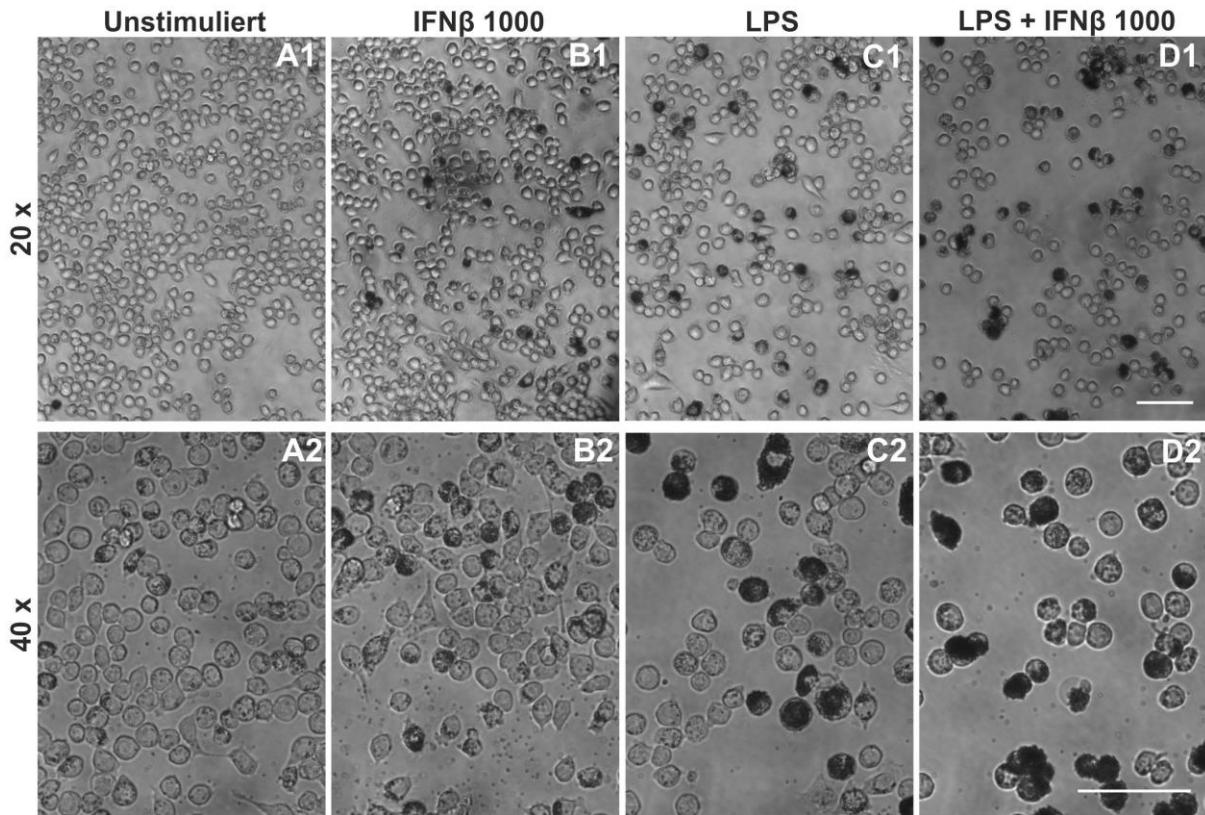


Abbildung 9: Effekte von $IFN\beta$ und LPS auf das Phagozytoseverhalten von BV-2 Mikrogliazellen. Deutlich erhöhte Partikelaufnahme durch $IFN\beta$ - und LPS-Stimulierung. Genauer Versuchsaufbau siehe 3.5.2. A1-D1 zeigt Zellen in 20x, A2-D2 in 40x Vergrößerung. Der Skalierungsbalken repräsentiert eine Länge von 0,5 mm.

Die Auszählung der positiven (Phagozytoseaktivität hochreguliert) Zellen erfolgte in der 40x Vergrößerung. Dazu wurden drei Bildausschnitte pro Triplikat in drei unabhängigen Versuchen ausgezählt. Als positiv wurden Zellen gewertet die zu 50% und mehr mit Partikeln ausgefüllt waren. Hierbei erwies sich die Phagozytoseaktivität in allen drei Stimulationsansätzen ($IFN\beta$ 1000 U/ml, LPS 50 ng/ml und $IFN\beta$ +LPS) statistisch signifikant gesteigert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (siehe Abbildung 10).

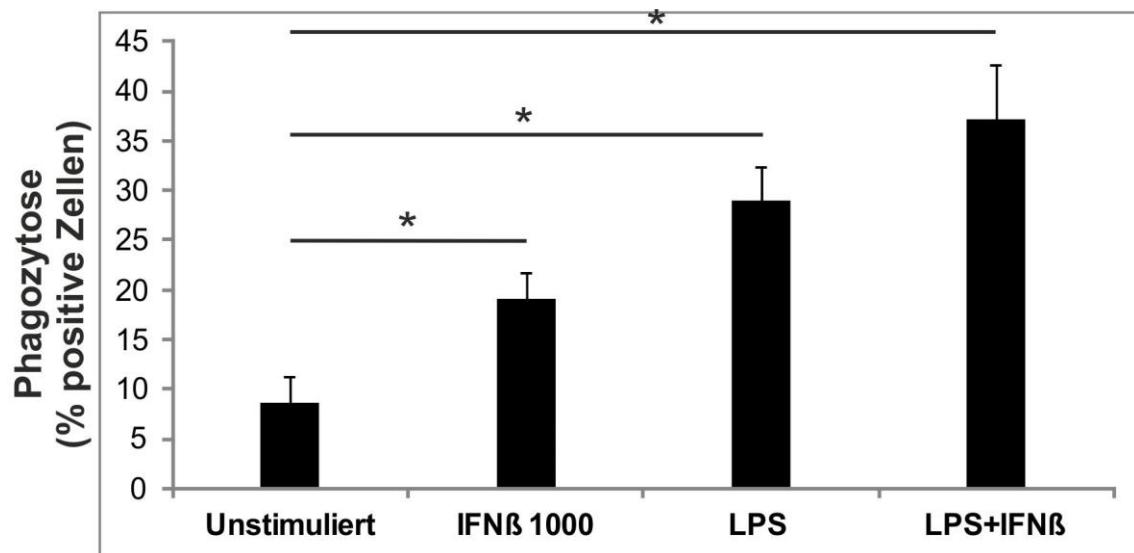


Abbildung 10: Phagozytoseaktivität von BV-2 Mikrogliazellen unter $IFN\beta$ - und LPS-Stimulation. Die Durchschnittswerte $\pm SD$ eines jeden Stimulationsansatz werden als positive Zellen in Prozent graphisch dargestellt. Positive Zellen entsprechen Zellen, die $\geq 50\%$ mit Latexbeads gefüllt sind. Genauer Auszählmodus siehe unter 3.5.2. $n=9$; $*P < 1,2 \cdot 10^{-13}$; Student t-test. SD, standard deviation (Standardabweichung).

Es fiel auf, dass die Zelldichte in den Ansätzen mit LPS (LPS allein und LPS+IFNβ) deutlich geringer war im Vergleich zu den unstimulierten bzw. IFNβ-behandelten Ansätzen.

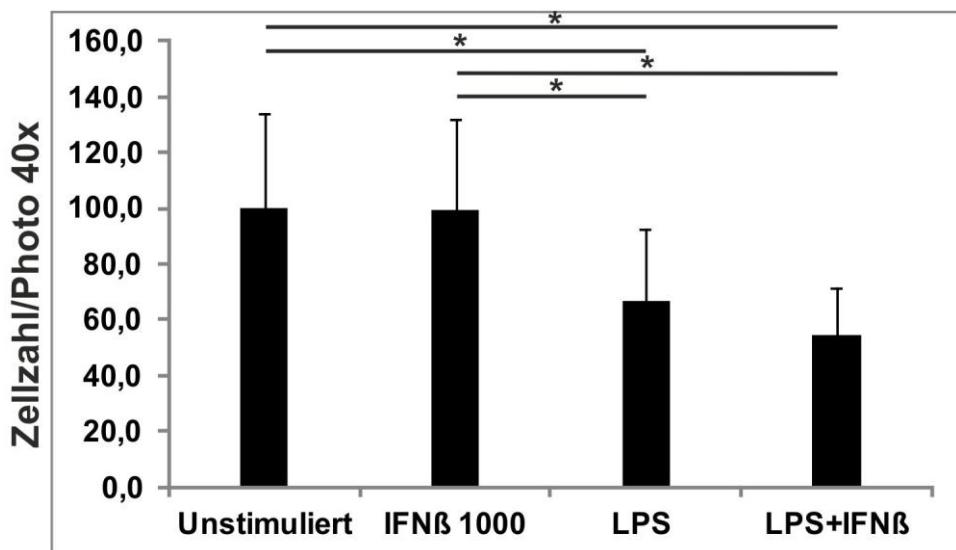


Abbildung 11: Einfluss von LPS auf die Zelldichte. Die Durchschnittswerte $\pm SD$ der Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt (40x Vergrößerung) eines jeden Stimulationsansatz werden graphisch dargestellt. $N=9$; $*P < 1,6 \cdot 10^{-4}$; Student t-test. SD, standard deviation (Standardabweichung).

Die Auswahl der drei Bildausschnitte (40x Vergrößerung) erfolgte stets nach dem gleichen zufälligen Muster, sie geben also einen Gesamteindruck eines Wells wieder.

Die Auswertung der Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt zeigt eine signifikant geringere Zellzahl in den LPS-Ansätzen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen und IFN β allein (siehe Abbildung 11).

4.4 Änderungen der Aktinfilamentanordnung durch Interferon- β : Immunzytochemie in BV-2 Mikroglia

Die Aufgaben des Zytoskeletts sind vielfältig und erfordern ständige Anpassung. So ändert sich auch die Morphologie der Mikrogliazellen mit ihren unterschiedlichen Aktivierungszuständen. Wie bereits unter 1.2.1 erläutert ist die gebräuchlichste Einteilung in ruhende, ramifizierte und aktivierte, amöboide Zellkörper. Wobei letzterer Zustand eher mit einem proinflammatorisch, schädlichen Wirkprofil assoziiert wird. Im Gegensatz zu den ramifizierten Mikrogliazellen, welche mit der Überwachung und Aufrechterhaltung der Homöostase und Gewebsintegrität des Hirnparenchys, also einem neuprotektiven Wirkprofil in Verbindung gebracht werden. Das folgende Experiment sollte Hinweise auf einen durch IFN β alternativ aktivierte Zustand von Mikrogliazellen ergeben.

Während der Durchführung des Migrations- und des Phagozytose-Assays fielen in der Durchlichtmikroskopie unter dem Einfluss von IFN β ausgeprägte Zellfortsätze auf und so wurde eine Phalloidin-Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen (siehe 3.6.2). Durch Stabilisation und Anfärben des Aktinskeletts von BV-2 Mikrogliazellen konnten die Morphologieänderungen unter dem Einfluss von IFN β , LPS und LPS + IFN β genauer beurteilt werden.

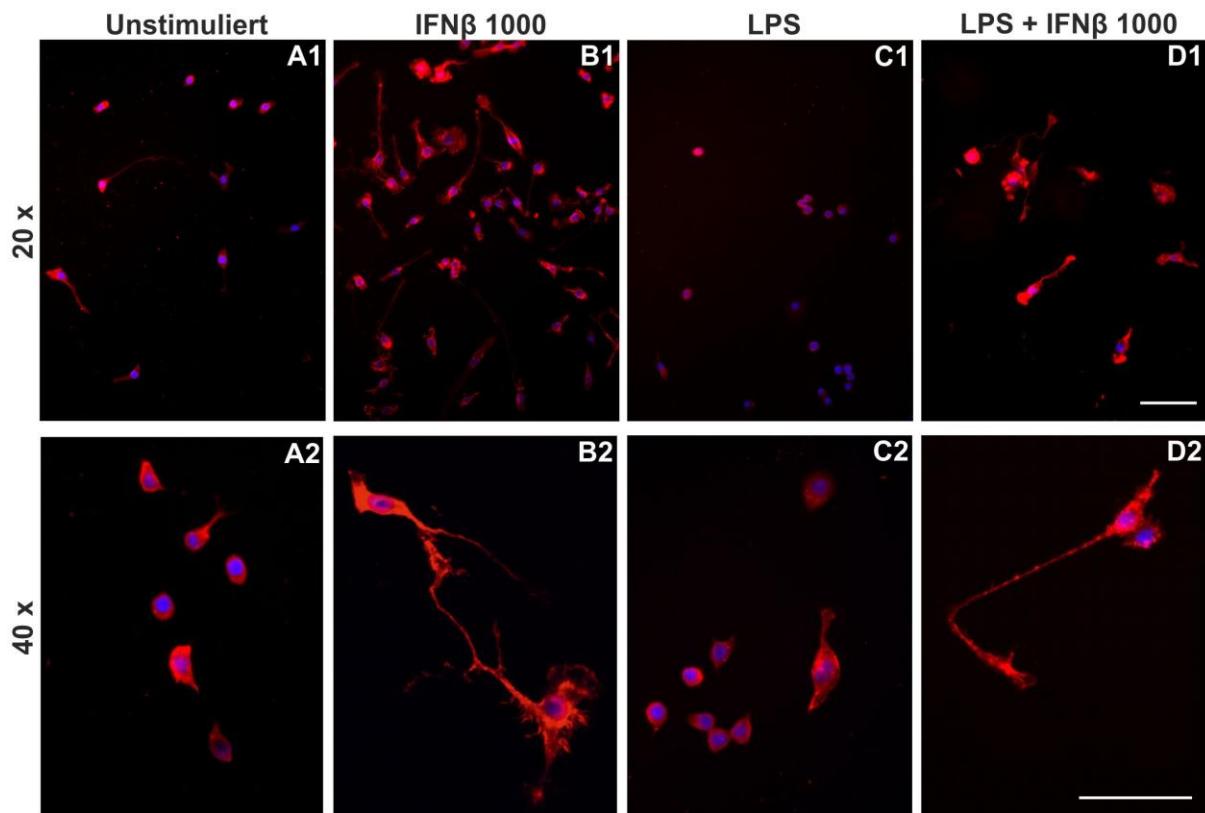


Abbildung 12: Effekte von $IFN\beta$ und LPS auf die Aktinfilamentanordnung von BV-2 Mikrogliazellen nach 24h-Stimulation. A1-D1 zeigt Zellen in 20x, A2-D2 in 40x Vergrößerung. Anfärbung der Aktinfilamente mit Phalloidin (rot) und Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). Der Skalierungsbalken repräsentiert eine Länge von 0,5 mm.

In der unstimulierten Kontrolle zeigten sich die Zellen überwiegend rund mit ein oder zwei kurzen Fortsätzen, sowie einzelnen ramifizierten Zellen (siehe Abbildung 12 A1 und A2). Unter LPS-Stimulierung waren die Zellen fast durchweg amöboid (siehe Abbildung 12 C1 und C2), ein Hinweis auf den gesteigerten Aktivierungszustand der Zellen. Die mit $IFN\beta$ 1000 U/ml behandelten Zellen zeigten eine ausgeprägte Ramifizierung (siehe Abbildung 12 B1 und B2), sowie multiple *spikes*, die insbesondere bei stärkerer Vergrößerung zu sehen sind (siehe Abbildung 13). Die mit LPS und $IFN\beta$ simultan stimulierten Zellen zeigten eine dem $IFN\beta$ -Stimulationsansatz ähnliche Morphologie mit Ramifizierung und *spike*-Fortsätzen (siehe Abbildung 12 D1 und D2).

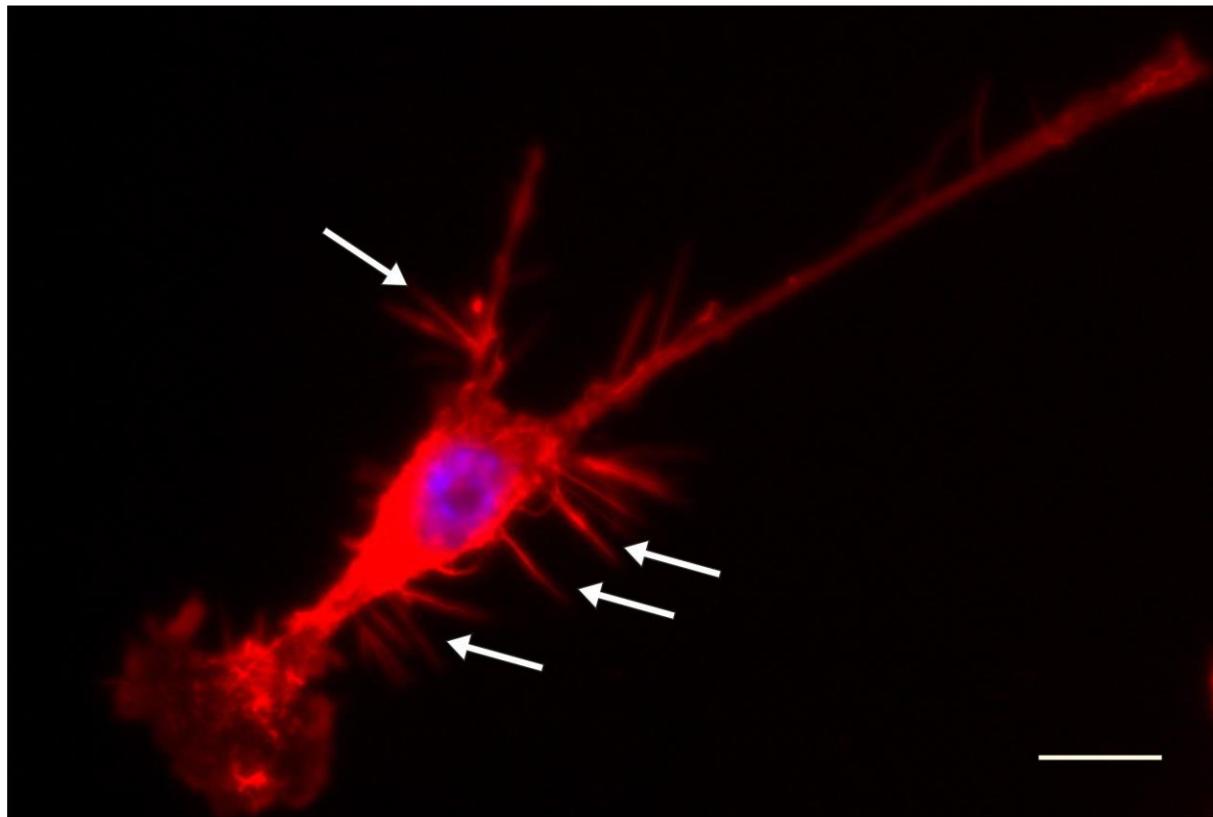


Abbildung 13: Effekt von $IFN\beta$ auf die Aktinfilamentanordnung von BV-2 Mikrogliazellen nach 24h Inkubation mit Schwerpunkt auf spike-Fortsätze (weiße Pfeile). Aufnahme in 40x Vergrößerung. Anfärbung der Aktinfilamente mit Phalloidin (rot) und Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). Der Skalierungsbalken repräsentiert eine Länge von 0,5 mm.

5. Diskussion

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Langmann konnte bereits die zielgerichtete Modulation von Mikrogliazellen durch Docosahexaensäure, Luteolin und Curcumin gezeigt werden. Nun sollte in dieser Dissertation der Effekt von IFN β auf Mikrogliazellen näher untersucht werden und als potentiell interessante Therapieoption bei Erkrankungen mit einer Mikrogliaüberaktivierung in der Pathogenese identifiziert werden. IFN β wird bereits erfolgreich bei neurodegenerativen Erkrankungen wie MS eingesetzt, auch wenn der genaue Wirkmechanismus nicht komplett entschlüsselt ist. Es stellt sich also die Frage ob IFN β nicht auch einen positiven Effekt auf andere neurodegenerative Erkrankungen, im ZNS aber auch in der Retina, über die Beeinflussung von Mikrogliazellen haben könnte.

5.1 Das immunmodulatorische Potential von Interferon- β

In einem ersten Schritt wurden transkriptionelle Veränderungen in BV-2 Mikrogliazellen unter IFN β -Stimulation festgehalten. Die Ergebnisse aus Mikroarray und qRT-PCR (siehe 4.1) zeigten eine stark durch IFN β induzierte Expression in einer Reihe von Genen, die primär in der Immunregulation involviert sind. Es galt nun diese Gene im Rahmen von Mikrogliaaktivierung und neurodegenerativen Erkrankungen einzuordnen.

Die Einteilung der ausgewählten 38 Gene in funktionelle Kategorien (siehe Abbildung 5) erfolgte durch Literaturrecherche. Die grösste Gruppe nahmen dabei die Gene der Immunregulation ein. Davon werden einige eher proinflammatorisch und neurotoxisch eingestuft, wie zum Beispiel *IL-6* (Kishimoto et al., 1992). Aber auch *TNF α* wirkt proinflammatorisch über die Aktivierung von Immunzellen und der Induktion von Zytokin- und Chemokinausschüttung (Aggarwal et al., 2012, Kishimoto et al., 1992). *Tnf α* zeigte sich in unseren Experimenten allerdings durch IFN β alleine nicht signifikant (RQ>2) hochreguliert. Anderen Genen wie *IL-10* und *Arginase-1* konnten antiinflammatorische Funktionen nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass Arginase-1-exprimierende Makrophagen als Suppressoren von Th2-abhängiger Entzündung und Fibrose fungieren (Pesce et al., 2009). *IL-10* unterdrückt

proinflammatorische Reaktionen und wirkt limitierend auf durch Entzündung entstehende Gewebeschädigung (Ouyang et al., 2011).

Häufig lässt sich einem Gen aber keine eindeutig positive, antiinflammatorische oder negative, proinflammatorische Funktion zuordnen. So besitzt *PECAM-1* sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. Es fördert zwar die transendotheliale Leukozytenmigration, aber anderseits dämpft es auch die Leukozytenaktivierung, unterdrückt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und hält die Integrität von Gefäßwänden aufrecht (Privratsky et al., 2010).

Die Stickstoffmonoxid-Synthase iNOS besitzt ebenfalls diametrale Eigenschaften: Einerseits schützt Stickstoffmonoxid (NO) vor viralen Infektionen, intrazellulären Bakterien und Parasiten, anderseits wurde iNOS-abhängige Gewebeschädigung in Tiermodellen von Autoimmunerkrankungen wie Experimenteller allergischer Enzephalomyelitis oder Uveitis (EAE, EAU) beobachtet. Die Forschungsergebnisse zu der Rolle von iNOS/NO in Autoimmunerkrankungen sind allerdings nicht einheitlich. Andere Studien konnten zeigen, dass die genetische oder pharmakologische Depletion von iNOS mit einer erhöhten Inzidenz und Krankheitsschwere von EAE assoziiert ist. Innerhalb des Immunsystems scheint iNOS/NO also sowohl pathologische als auch protektive Effekte auszuüben (Bogdan, 1998).

Die Bedeutung der immunologischen GTPase *Irgm1* ist auch in EAE untersucht worden. Über *Irgm1* ist bereits bekannt, dass es die Immunabwehr gegenüber intrazellulären Pathogenen reguliert (Hunn et al., 2010). Nun konnten Xu et al. Zeigen, dass *Irgm1*-defiziente Mäuse über Steigerung der Apoptose autoreaktiver CD4+ T-Zellen resistent gegenüber der Induktion von EAE sind (Xu et al., 2010).

TRIM30 ist durch verschiedene Mechanismen an der Immunregulation beteiligt. Zum einen hat es sich als negativ regulierend auf die NLRP3 Inflammasom-Aktivierung gezeigt. Zum anderen wirkt es als negativer Regulator auf die *Toll-like* Rezeptor-vermittelte NF-κB-Aktivierung. Beide Signalwege tragen bei exzessiver Aktivierung zur Pathogenese von Autoimmun- und chronischen Erkrankungen bei (Hu et al., 2010, Shi et al., 2008).

CD80 (=B7-1) wird ebenfalls in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen gebracht. Studien konnten zeigen, dass die B7-CD28 Kostimulation über Regulierung der T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle in der Stimulierung der Anfangs- und der Effektorphase von Autoimmunität spielt (Anderson et al., 1999).

USP18 und *UBE1I* wirken ebenfalls steuernd auf das Immunsystem ein. *Ube1I* aktiviert ISG15, ein durch Typ I Interferone stark induziertes Protein, welches anscheinend eine wichtige Rolle in angeborener Immunität spielt (Yuan and Krug, 2001, Zhang and Zhang, 2011). *USP18* codiert dagegen für eine wichtige ISG15-spezifische Protease und ist notwendig um die zelluläre Balance von ISG15-Proteinen aufrechtzuerhalten (Malakhova et al., 2006).

Die in 4.1.1 erwähnten bereits bekannten Interferon-induzierbaren Gene *MX1*, *MX2*, *OAS2*, *STAT1* und *IRF7* sind an der Immunregulation durch Vermittlung der antiviralen Eigenschaften von Typ I Interferonen beteiligt (Haller and Kochs, 2002, Honda et al., 2005, Kakuta et al., 2002, Cheon et al., 2011).

Die dem Lipoproteinmetabolismus zugeordneten Gene *APOL9a* und *9b* stellen eine Untergruppe der für *High-density* Lipoproteine (HDL) kodierenden Gene dar (Duchateau et al., 1997). HDLs haben nachweislich antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften (Assmann and Nofer, 2003, Barter et al., 2004). *CD11b* ist Teil von *MAC-1*, dem Komplementfaktor C3 (CR3), welcher als Integrin eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion spielt. Aber zusätzlich konnten weitere Funktionen von CR3 identifiziert werden, wie die Regulation von T-Zellen oder die Mitwirkung an Phagozytose (Todd, 1996, Wagner et al., 2001). Ebenfalls eine Rolle im Immunsystem spielen die Zelladhäsionsgene *ICAM-1* und *VCAM-1*, welche zur Superfamilie der Immunglobuline gehören und die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen vermitteln (Petruzzelli et al., 1999). Erhöhte Level von ICAM-1 und VCAM-1 werden mit inflammatorischen Pathologien wie Atherosklerose oder neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Amyotrophe Lateralsklerose in Verbindung gebracht (Petruzzelli et al., 1999).

Die Gene *CXCL10*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CCL2* sind stark chemotaktisch wirksam und initiieren so Migration. Insbesondere *CCL2*, *CXCL10* und *CXCL2* werden dabei mit Inflammation assoziiert (Gerard and Rollins, 2001, Liu et al., 2011, Wolpe et al., 1989), während für *CXCL1* ein neuroprotektiver Effekt gezeigt wurde. So wurde in der chronischen Phase von EAE, dem Mausmodell von MS, eine verminderte Entzündung und Demyelinierung und eine gesteigerte Remyelinierung in *Cxcl1*-überexprimierenden Mäusen beobachtet (Omari et al., 2009). Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass in CXCR2-Knockout-Mäusen eine verzögerte Wundheilung stattfindet, ein Prozess der unter anderem auf der Rekrutierung von Immuneffektorzellen beruht und anscheinend *Cxcl1*-vermittelt ist (Devalaraja et al.,

2000). Es gibt anderseits auch Daten die *CCL2* zwar für Migration und Proliferation von Mikroglia verantwortlich machen, aber zeigen konnten, dass *CCL2* nicht direkt eine Entzündungsantwort von Mikroglia auslöst und *Ccl2*-behandelte Mikrogliazellen keinen neurotoxischen Effekt haben (Hinojosa et al., 2011). Dies ist passend zu den Ergebnissen von Elhofy et al., welche *Ccl2*-überexprimierende Mäuse untersuchten. Sie berichteten von einer signifikant milderer klinischen Krankheitsschwere bei gleicher Anzahl von CD4+ und CD8+ T-Zellen und einer größeren Menge von ZNS-infiltrierenden Monozyten in *Ccl2*-transgenen Mäusen. Wobei gleichzeitig die ZNS Antigen-spezifischen T-Zellen deutlich weniger proinflammatorisches Interferon- γ produzierten (Elhofy et al., 2005). Weiterhin konnten Studien mit *Cxcr3*-defizienten Mäusen zeigen, dass *Cxcl10* zusätzlich zur proinflammatorischen Rolle eventuell eine regulatorische Funktion im ZNS ausübt. So wurde von einer reduzierten Krankheitsausprägung von EAE im Zusammenhang mit der *Cxcl10/Cxcr3*-Interaktion berichtet (Liu et al., 2006a, Muller et al., 2007).

CMPK2 kodiert für ein Enzym des Nukleotid-*Salvage-Pathway*, aber es wird ein Zusammenhang dieses Gens mit Makrophagenaktivierung und inflammatorischen Reaktionen vermutet (Xu et al., 2008).

Die Gruppe der Schlafengene wurden der Zelldifferenzierung zugeordnet, auch wenn ihre Funktionen noch nicht für alle Mitglieder genau erforscht sind. *Schlafen-4* zeigte sich im Mikroarray stark durch IFN β induziert und frühere Studien konnten zeigen, dass dieses Gen während Makrophagenaktivierung hochreguliert ist und eventuell als Modulator in der Myelopoese fungiert (van Zuylen et al., 2011). Eine weitere Gruppe ordnete ebenfalls einige Schlafengene der Zelldifferenzierung zu, insbesondere wirken sie anscheinend modulierend auf die T-Zellentwicklung und – aktivierung (Geserick et al., 2004).

Es ließ sich kein eindeutiges durch IFN β induziertes pro- oder antiinflammatorisches Genexpressionsmuster erkennen, da eine Vielzahl von Genen mit vielfältigen und teils gegensätzlichen Funktionen durch IFN β hochreguliert wurden (siehe 4.1). Die Diversität des Expressionsmusters, insbesondere der an der Immunregulation beteiligten Gene, erlaubt also keine Einteilung von IFN β in einen toxischen oder protektiven Mikrogliaphänotyp-induzierenden Wirkstoff. Es lässt eher auf eine immunmodulierende Wirkung in Mikrogliazellen schließen.

5.2 Keine signifikante Beeinflussung des Migrationspotentials durch LPS- oder IFN β -Stimulation

Migration von Immunzellen ist ein Vorgang, der ebenfalls nicht einfach in positiv oder negativ für das betroffene Gewebe eingestuft werden kann. Die Einwanderung und Ansammlung von Immuneffektorzellen, unter anderem Mikroglia, in ein spezifisches Gewebe ist bei einer Reihe von Krankheiten mit Entzündung zu beobachten und weist diesem Vorgang eine kritische Funktion in der Pathogenese dieser inflammatorischen Erkrankungen zu. Anderseits ist die Migration von Immunzellen auch wichtig um protektive Immunantworten zu vermitteln und so Gewebe vor weiterer Schädigung zu schützen und Regeneration zu ermöglichen (Luster et al., 2005, Devalaraja et al., 2000).

Im Mikroarray und den nachfolgenden qRT-PCR-Validierungen wurde die Hochregulierung von einigen für Migration verantwortlichen Genen gezeigt (siehe 4.1.1), die bereits in 5.1 näher betrachtet wurden. Aufgrund der Ergebnisse auf Transkriptomebene wurde nun ebenfalls ein Effekt auf funktioneller Ebene erwartet. Der in dieser Dissertation verwendete Migrations-Assay ergab allerdings keine signifikante Änderung des Migrationsverhaltens von BV-2 Mikrogliazellen unter IFN β oder LPS-Stimulation (siehe 4.3.1). Dies beruht eventuell auf einer zu geringen Vorstimulationsdauer der Zellen. Die Zellen wurden für 2h mit dem entsprechenden Stimulanz vorbehandelt, dann wurde eine Wunde im Kreuzmuster in den Zellrasen geritzt ($t=0h$) um anschließend nach mehrstündiger ($t=6, 12, 14, 18$ und 24 h) erneuter Inkubation die Zahl der in das Kreuzmuster eingewanderten Zellen zu beurteilen. Diese zweistündige Vorstimulation in Kombination mit der darauffolgenden Inkubationsdauer war eventuell nicht ausreichend um eine Änderung der Zellphysiologie durch das jeweilige Stimulanz zu bewirken. Die Inkubationsdauer zu verlängern zeigte sich als nicht empfehlenswert, da eine längere Inkubationsdauer nach Einritzen des Musters bereits nach 24h einen Verlust der Genauigkeit der Zellauszählung durch sich überlappende Zellkörper ergab. Unter Umständen würde eine deutlich verlängerte Vorstimulationszeit, 24h statt 2h, bei geringerer Zellaussaat und kürzerer Inkubationszeit beide Probleme umgehen. Eventuell wäre der Stimulanzeffekt durch die verlängerte Vorstimulation dann nicht nur auf Transkriptomebene, sondern auch auf funktioneller Ebene bemerkbar. Die

geringere Zellaussaat würde die längere Versuchsdauer ermöglichen ohne die Genauigkeit der Auswertung zu gefährden.

5.3 Gesteigerte Phagozytoseaktivität unter IFN β - und LPS-Stimulierung

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Aufrechterhaltung der Homöostase im zentralen Nervensystem und der Retina ist Phagozytose. Mikrogliale Phagozytose von Pathogenen initiiert die angeborene Immunantwort und stellt somit eine der wichtigsten Abwehrfunktionen dieser Zellen dar. Zusätzlich dient Phagozytose auch der Entfernung von Zelltrümmern und Ablagerungen. Die Entfernung apoptotischer und nekrotischer Zelltrümmer mittels Phagozytose durch Mikroglia ist aber nicht nur ein reiner Müllbeseitigungsdienst. Im Rahmen von neurodegenerativen und autoimmunologischen Erkrankungen fallen vermehrt Ablagerungen, Zelltrümmer und funktionsgestörte Elemente an (Sokolowski and Mandell, 2011). Dabei kann es sich zum Beispiel um Myelintrümmer bei Multipler Sklerose, Beta-Amyloid bei Morbus Alzheimer oder apoptotische Photorezeptorzellen bei Retinitis pigmentosa handeln. Die effektive Beseitigung dieses Zellabfalls durch Phagozytose ist essentiell für Entwicklung und Homöostase und bildet die Ausgangsposition für Regenerationsprozesse (Tremblay et al., 2011). Defekte in diesem Ablauf und vermehrter Anfall von Zellschrott werden mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen, der Produktion von Autoantikörpern, Autoimmunität und neurodegenerativen, insbesondere auch retinaler Degeneration, in Verbindung gebracht (Erwig and Henson, 2007, Erwig and Henson, 2008, Sokolowski and Mandell, 2011).

Werden die Mikrogliazellen durch Pathogene, zum Beispiel einem bakteriellen Befall des umgebenden Gewebes alarmiert, kommt es neben der Phagozytose zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Hanisch et al., 2001, Hausler et al., 2002). Diese zytotoxische Reaktion ist darauf ausgerichtet den Eindringling abzutöten (Nagl et al., 2002). Anscheinend kann es aber auch im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen nebst der gesteigerten Phagozytose zur Induzierung einer proinflammatorischen Mikrogliaantwort kommen, ähnlich der Reaktion auf Pathogene (Sokolowski and Mandell, 2011). Diese Antwort stellt wohl eine Überreaktion und Maladaption in neurodegenerativen Erkrankungen dar.

Es wird dagegen angenommen, dass die Beseitigung von apoptotischen Zellen durch Phagozytose Inflammation unterdrückt und sich regulierend auf

Immunreaktionen auswirkt (Savill and Fadok, 2000). Werden apoptotische Zellen oder Myelintrümmer phagozytiert, schütten Mikrogliazellen antiinflammatorische Faktoren aus (Liu et al., 2006b, Magnus et al., 2001).

In Hinblick auf diese Forschungsergebnisse wäre also die Aktivierung eines Mikrogliatyps von Interesse, der eine gesteigerte Phagozytoseaktivität zeigt um toxische Zelltrümmer und Ablagerungen zu beseitigen. Gleichzeitig sollte aber keine proinflammatorische Antwort getriggert werden und im Gegenteil eine antiinflammatorische, Regeneration fördernde Mikrogliareaktion ausgelöst werden.

Die Ergebnisse des durchgeführten Phagozytose-Assays ergaben eine deutliche Steigerung der Phagozytoseaktivität von BV-2 Mikrogliazellen unter IFN β - und LPS-Stimulierung (siehe 4.3.2). Bei der Auswertung der Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt fiel die signifikant geringere Zellzahl in den LPS-Ansätzen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen und IFN β allein auf (siehe Abbildung 11). Dies deutet auf eine Schädigung der Zellen mit Zelluntergang durch LPS hin, möglicherweise über die Induktion eines proinflammatorischen, zelltoxischen Zytokinprofils. Dagegen zeigten die IFN β -behandelten Zellen trotz Steigerung der Phagozytose kein erhöhtes Zellsterben im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Eventuell ist dies auf die Induktion eines alternativ-aktivierten Mikrogliaphänotyp mit erhöhter Phagozytoseleistung und protektivem, antiinflammatorischem Charakter zurückzuführen.

5.4 Induktion eines alternativen aktivierten Mikrogliaphänotyps

Bereits in der Einleitung unter 1.2.1 wurde auf die unterschiedlichen Morphologien von Mikrogliazellen eingegangen und wie diese mit eher neuroprotektiven oder neurotoxischen Wirkprofilen assoziiert werden. Die ramifizierten Mikrogliazellen dienen der Überwachung ihrer Umwelt um die Aufrechterhaltung der Homöostase zu gewährleisten. Der amöboide, aktivierte Phänotyp produziert Entzündungsmediatoren, welche zwar bei der Beseitigung von Pathogenen hilfreich sind, aber bei Überaktivierung der Mikrogliazellen in eine pathologische Form der Inflammation übergehen kann und so zu neurodegenerativen Erkrankungen beiträgt (Kettenmann et al., 2011, Saijo and Glass, 2011). Ein klassisches Mittel um Mikrogliazellen in Kultur zu aktivieren ist LPS, welches sich in amöboider Zellmorphologie und der Ausschüttung proinflammatorischer Produkte äussert (abd-

el-Basset and Fedoroff, 1995). Im gesunden Gehirn liegen Mikrogliazellen üblicherweise ramifiziert vor, aber in Kultur zeigen auch unstimulierte Zellen einen überwiegend amöboiden Zelltyp. Dies ist eventuell auf die Kultivierungsmethoden in einer 2D-Umgebung *in vitro* im Gegensatz zur dreidimensionalen Umgebung *in vivo* zurückzuführen (Pottler et al., 2006).

Auch in der in dieser Arbeit durchführten Immunzytochemie mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie (siehe 4.4) zeigten die unstimulierten BV-2 Mikrogliazellen einen überwiegend amöboiden Zelltyp. Ausgehend von einem fast ausschließlich amöboiden Phänotyp in den mit LPS stimulierten Ansätzen, kann die LPS-Aktivierung als erfolgreich eingestuft werden. Die ausgeprägte Ramifizierung mit den zusätzlichen kurzen Fortsätzen, *spikes*, der IFN β -behandelten Zellen deuten auf einen die Homöostase unterstützenden, neuroprotektiven Phänotyp hin. Die kurzen Fortsätze könnten *Membrane ruffling* darstellen, eine Formation aus beweglichen Zelloberflächenprotrusionen, bestehend aus einem Netzwerk von frisch polymerisierten Aktinfilamenten. Es wird angenommen, dass *Membrane ruffling* ein Zeichen für erhöhte Phagozytoseaktivität ist oder alternativ eine Voraussetzung für gerichtete Migration ist (Ridley, 1994). Dies wäre passend zu den Resultaten des Phagozytose-Assays mit der durch IFN β gesteigerten Phagozytoseleistung (siehe 4.3.2). Die mit LPS und IFN β stimulierten Zellen zeigten ebenfalls eine ramifizierte Morphologie. Dies lässt eine dämpfende Wirkung von IFN β auf die LPS-aktivierten Mikrogliazellen vermuten, auch wenn dies nicht auf Transkriptomebene gezeigt werden konnte (siehe 4.1).

6. Zusammenfassung und Ausblick

In neurodegenerativen und autoimmunologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems und der Netzhaut werden verschiedene neurotoxische Prozesse beobachtet. Hierbei scheinen überaktivierte Mikrogliazellen eine erhebliche Rolle in der Pathogenese zu spielen. Mikrogliazellen präsentieren sich dabei mit einem zweischneidigen Wirkprofil. Mikroglia können zytotoxisch wirken und so degenerative und autoimmunologische Mechanismen unterstützen, aber anderseits besitzen sie eine Reihe von protektiven Funktionen. Im Rahmen einer auf Mikroglia gezielten pharmakologischen Therapie wäre also eine differenzierte Modulation dieser Zellen wünschenswert, die die schädlichen Wirkungen dämpft und die protektiven Eigenschaften fördert.

Interferon- β (IFN β) wird schon länger als Medikament bei der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose verwendet. Die exakten Wirkmechanismen sind bis dato nicht komplett entschlüsselt, aber ein Teil der förderlichen Wirkung wird auf ein modulierendes Eingreifen in das überaktivierte Immunsystem zurückgeführt.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden welchen Effekt IFN β auf Mikrogliazellen hat, und wie sich dieser auf transkriptioneller- und funktioneller Ebene äußert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN β in Mikroglia der BV-2 Zelllinie und primären murinen Mikrogliazellen des Gehirns einen deutlichen Effekt zeigt. IFN β aktiviert Mikrogliazellen durch die Induktion einer Vielzahl von, sowohl pro- wie auch antiinflammatorischen, Genen. Eine Steigerung der Phagozytoseaktivität durch IFN β -Behandlung wurde ebenfalls beobachtet. Im Gegensatz zu LPS-stimulierten Mikroglia, welche gleichermaßen eine erhöhte Phagozytoseleistung zeigten, nahmen die Zellen aber durch die IFN β -Stimulation keinen Schaden. Die Ergebnisse zur Änderung der Zellmorphologie ergaben einen ramifizierten, „protektiven“ Phänotyp für IFN β -behandelte Mikrogliazellen, ein Effekt der sich auch bei gleichzeitiger Stimulierung mit LPS durchsetzen konnte. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur die Induktion eines alternativ aktivierten, potentiell protektiven Mikrogliaphänotyps durch IFN β vermuten.

Darum stellt sich die Frage ob IFN β nicht als potentielle Therapieoption bei neurodegenerativen und retinalen Erkrankungen mit Mikrogliaaktivierung in der Pathogenese in Betracht zu ziehen ist. Hier wäre insbesondere der Schritt zu *in vivo* Experimenten von großem Interesse, weil nur so die langfristigen Effekte von IFN β

beobachtet werden könnten. Aus der Behandlung von Multiple Sklerose-Patienten mit IFN β weiss man, dass die Wirkung klinisch erst nach einiger Zeit einsetzt und auch die Änderungen auf Transkriptomebene längerfristig abweichend von den initialen Genexpressionsänderungen zu Beginn der Therapie sind. Mit Hinblick auf die besondere Ausrichtung dieser Arbeitsgruppe ist die Wiederholung der Ergebnisse in retinalen primären Mikrogliazellen ein weiterer wichtiger Schritt, insbesondere in Mausmodellen retinaler Degeneration.

Literaturverzeichnis

ABD-EL-BASSET, E. & FEDOROFF, S. (1995) Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J Neurosci Res*, 41, 222-37.

AGGARWAL, B. B., GUPTA, S. C. & KIM, J. H. (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119, 651-65.

ANDERSON, D. E., SHARPE, A. H. & HAFLER, D. A. (1999) The B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmune disease of the central nervous system. *Curr Opin Immunol*, 11, 677-83.

ASSMANN, G. & NOFER, J. R. (2003) Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med*, 54, 321-41.

BARTER, P. J., NICHOLLS, S., RYE, K. A., ANANTHARAMAIAH, G. M., NAVAB, M. & FOGLERMAN, A. M. (2004) Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*, 95, 764-72.

BLASI, E., BARLUZZI, R., BOCCHINI, V., MAZZOLLA, R. & BISTONI, F. (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*, 27, 229-37.

BOGDAN, C. (1998) The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity. *J Exp Med*, 187, 1361-5.

BORDEN, E. C., SEN, G. C., UZE, G., SILVERMAN, R. H., RANSOHOFF, R. M., FOSTER, G. R. & STARK, G. R. (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 975-90.

CHABOT, S., WILLIAMS, G. & YONG, V. W. (1997) Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferonbeta-1b. *J Clin Invest*, 100, 604-12.

CHEN, L., WU, W., DENTCHEV, T., ZENG, Y., WANG, J., TSUI, I., TOBIAS, J. W., BENNETT, J., BALDWIN, D. & DUNAIEF, J. L. (2004) Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res*, 79, 239-47.

CHEON, H., YANG, J. & STARK, G. R. (2011) The functions of signal transducers and activators of transcriptions 1 and 3 as cytokine-inducible proteins. *J Interferon Cytokine Res*, 31, 33-40.

DE JONG, E. K., DE HAAS, A. H., BROUWER, N., VAN WEERING, H. R., HENSENS, M., BECHMANN, I., PRATLEY, P., WESSELING, E., BODDEKE, H. W. & BIBER, K. (2008) Expression of CXCL4 in microglia in vitro and in vivo and its possible signaling through CXCR3. *J Neurochem*, 105, 1726-36.

DELOGU, L. G., DEIDDA, S., DELITALA, G. & MANETTI, R. (2011) Infectious diseases and autoimmunity. *J Infect Dev Ctries*, 5, 679-87.

DENNIS, G., JR., SHERMAN, B. T., HOSACK, D. A., YANG, J., GAO, W., LANE, H. C. & LEMPICKI, R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 4, P3.

DEVALARAJA, R. M., NANNEY, L. B., DU, J., QIAN, Q., YU, Y., DEVALARAJA, M. N. & RICHMOND, A. (2000) Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 115, 234-44.

DHIB-JALBUT, S. & MARKS, S. (2006) Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 74 Suppl 1, S17-24.

DIRSCHERL, K., KARLSTETTER, M., EBERT, S., KRAUS, D., HLAWSCH, J., WALCZAK, Y., MOEHLE, C., FUCHSHOFER, R. & LANGMANN, T. (2010) Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a

unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *J Neuroinflammation*, 7, 3.

DUCHATEAU, P. N., PULLINGER, C. R., ORELLANA, R. E., KUNITAKE, S. T., NAYA-VIGNE, J., O'CONNOR, P. M., MALLOY, M. J. & KANE, J. P. (1997) Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J Biol Chem*, 272, 25576-82.

EBERT, S., SCHOEBERL, T., WALCZAK, Y., STOECKER, K., STEMPFL, T., MOEHLE, C., WEBER, B. H. & LANGMANN, T. (2008) Chondroitin sulfate disaccharide stimulates microglia to adopt a novel regulatory phenotype. *J Leukoc Biol*, 84, 736-40.

EBERT, S., WEIGELT, K., WALCZAK, Y., DROBNIK, W., MAUERER, R., HUME, D. A., WEBER, B. H. & LANGMANN, T. (2009) Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *J Neurochem*, 110, 1863-75.

EICHLER, G. S. (2012) Bioinformatics/biostatistics: microarray analysis. *Methods Mol Biol*, 823, 347-58.

EICHLER, G. S., HUANG, S. & INGBER, D. E. (2003) Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI): for integrative analysis of expression profiles. *Bioinformatics*, 19, 2321-2.

ELHOFY, A., WANG, J., TANI, M., FIFE, B. T., KENNEDY, K. J., BENNETT, J., HUANG, D., RANSOHOFF, R. M. & KARPUS, W. J. (2005) Transgenic expression of CCL2 in the central nervous system prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Leukoc Biol*, 77, 229-37.

ERWIG, L. P. & HENSON, P. M. (2007) Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol*, 171, 2-8.

ERWIG, L. P. & HENSON, P. M. (2008) Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, 15, 243-50.

FOSTER, G. R., MASRI, S. H., DAVID, R., JONES, M., DATTA, A., LOMBARDI, G., RUNKELL, L., DE DIOS, C., SIZING, I., JAMES, M. J. & MARELLI-BERG, F. M. (2004) IFN-alpha subtypes differentially affect human T cell motility. *J Immunol*, 173, 1663-70.

FUJINAMI, R. S., VON HERRATH, M. G., CHRISTEN, U. & WHITTON, J. L. (2006) Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev*, 19, 80-94.

GALLIGAN, C. L., PENNELL, L. M., MUROOKA, T. T., BAIG, E., MAJCHRZAK-KITA, B., RAHBAR, R. & FISH, E. N. (2010) Interferon-beta is a key regulator of proinflammatory events in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler*, 16, 1458-73.

GARCIA-MONTOJO, M., DE LAS HERAS, V., BARTOLOME, M., ARROYO, R. & ALVAREZ-LAFUENTE, R. (2007) Interferon beta treatment: bioavailability and antiviral activity in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol*, 13, 504-12.

GEHRIG, A., LANGMANN, T., HORLING, F., JANSSEN, A., BONIN, M., WALTER, M., POTHS, S. & WEBER, B. H. (2007) Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 891-900.

GERARD, C. & ROLLINS, B. J. (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2, 108-15.

GESERICK, P., KAISER, F., KLEMM, U., KAUFMANN, S. H. & ZERRAHN, J. (2004) Modulation of T cell development and activation by novel members of the

Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. *Int Immunol*, 16, 1535-48.

GLASS, C. K., SAIJO, K., WINNER, B., MARCHETTO, M. C. & GAGE, F. H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-34.

GUPTA, N., BROWN, K. E. & MILAM, A. H. (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 76, 463-71.

HAGHJOOY JAVANMARD, S., SAADATNIA, M. M., HOMAYOUNI, V. V., NIKOOGOFTAR, M. M., MAGHZI, A. H., ETEMADIFAR, M., CHAITANYA, V. G., MCGEE, J. C., MINAGAR, A. & ALEXANDER, J. S. (2012) Interferon-beta-1b protects against multiple sclerosis-induced endothelial cells apoptosis. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 1368-74.

HALLER, O. & KOCHS, G. (2002) Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 3, 710-7.

HANISCH, U. K. & KETTENMANN, H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10, 1387-94.

HANISCH, U. K., PRINZ, M., ANGSTWURM, K., HAUSLER, K. G., KANN, O., KETTENMANN, H. & WEBER, J. R. (2001) The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur J Immunol*, 31, 2104-15.

HAUSLER, K. G., PRINZ, M., NOLTE, C., WEBER, J. R., SCHUMANN, R. R., KETTENMANN, H. & HANISCH, U. K. (2002) Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci*, 16, 2113-22.

HENDRIKS, J. J., TEUNISSEN, C. E., DE VRIES, H. E. & DIJKSTRA, C. D. (2005) Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev*, 48, 185-95.

HEUSS, N. D., LEHMANN, U., NORBURY, C. C., MCPHERSON, S. W. & GREGERSON, D. S. (2012) Local activation of dendritic cells alters the pathogenesis of autoimmune disease in the retina. *J Immunol*, 188, 1191-200.

HINOJOSA, A. E., GARCIA-BUENO, B., LEZA, J. C. & MADRIGAL, J. L. (2011) CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J Neuroinflammation*, 8, 77.

HONDA, K., TAKAOKA, A. & TANIGUCHI, T. (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 25, 349-60.

HONDA, K., YANAI, H., NEGISHI, H., ASAGIRI, M., SATO, M., MIZUTANI, T., SHIMADA, N., OHBA, Y., TAKAOKA, A., YOSHIDA, N. & TANIGUCHI, T. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434, 772-7.

HOSSEINI-MOGHADDAM, S. M., MOUSAVI, A. & ALAVIAN, S. M. (2009) Is beta-interferon a promising therapeutic option for the management of hepatitis C? *J Antimicrob Chemother*, 63, 1097-103.

HU, Y., MAO, K., ZENG, Y., CHEN, S., TAO, Z., YANG, C., SUN, S., WU, X., MENG, G. & SUN, B. (2010) Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J Immunol*, 185, 7699-705.

HUNN, J. P., FENG, C. G., SHER, A. & HOWARD, J. C. (2010) The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mamm Genome*, 22, 43-54.

IMAMOTO, K. & LEBLOND, C. P. (1978) Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. *J Comp Neurol*, 180, 139-63.

JAITIN, D. A., ROISMAN, L. C., JAKS, E., GAVUTIS, M., PIEHLER, J., VAN DER HEYDEN, J., UZE, G. & SCHREIBER, G. (2006) Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta. *Mol Cell Biol*, 26, 1888-97.

KAKUTA, S., SHIBATA, S. & IWAKURA, Y. (2002) Genomic structure of the mouse 2',5'-oligoadenylate synthetase gene family. *J Interferon Cytokine Res*, 22, 981-93.

KALVAKOLANU, D. V. (2003) Alternate interferon signaling pathways. *Pharmacol Ther*, 100, 1-29.

KAPPOS, L., FREEDMAN, M. S., POLMAN, C. H., EDAN, G., HARTUNG, H. P., MILLER, D. H., MONTALBAN, X., BARKHOF, F., RADU, E. W., BAUER, L., DAHMS, S., LANIUS, V., POHL, C. & SANDBRINK, R. (2007) Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet*, 370, 389-97.

KAPPOS, L., TRABOULSEE, A., CONSTANTINESCU, C., ERALINNA, J. P., FORRESTAL, F., JONGEN, P., POLLARD, J., SANDBERG-WOLLHEIM, M., SINDIC, C., STUBINSKI, B., UITDEHAAG, B. & LI, D. (2006) Long-term subcutaneous interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting MS. *Neurology*, 67, 944-53.

KARLSTETTER, M., LIPPE, E., WALCZAK, Y., MOEHLE, C., ASLANIDIS, A., MIRZA, M. & LANGMANN, T. (2011) Curcumin is a potent modulator of microglial gene expression and migration. *J Neuroinflammation*, 8, 125.

KATO, T., KITAURA, M., INABA, K., WATANABE, Y., KAWADE, Y. & MURAMATSU, S. (1992) Suppression of macrophage Ia antigen expression by endogenous interferon-alpha/beta. *J Interferon Res*, Spec No, 29-41.

KETTENMANN, H., HANISCH, U. K., NODA, M. & VERKHRATSKY, A. (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91, 461-553.

KISHIMOTO, T., AKIRA, S. & TAGA, T. (1992) Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 258, 593-7.

KOZOVSKA, M. E., HONG, J., ZANG, Y. C., LI, S., RIVERA, V. M., KILLIAN, J. M. & ZHANG, J. Z. (1999) Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology*, 53, 1692-7.

KRADY, J. K., BASU, A., ALLEN, C. M., XU, Y., LANOUE, K. F., GARDNER, T. W. & LEVISON, S. W. (2005) Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 54, 1559-65.

KREUTZBERG, G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.

KUHL, U., PAUSCHINGER, M., SCHWIMMBECK, P. L., SEEBERG, B., LOBER, C., NOUTSIAS, M., POLLER, W. & SCHULTHEISS, H. P. (2003) Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*, 107, 2793-8.

KUTZELNIGG, A., LUCCHINETTI, C. F., STADELMANN, C., BRUCK, W., RAUSCHKA, H., BERGMANN, M., SCHMIDBAUER, M., PARISI, J. E. & LASSMANN, H. (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128, 2705-12.

LANGMANN, T. (2007) Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol*, 81, 1345-51.

LASSMANN, H. (2008) Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 274, 45-7.

LASSMANN, H., BRUCK, W., LUCCHINETTI, C. & RODRIGUEZ, M. (1997) Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 3, 133-6.

LEAMAN, D. W., CHAWLA-SARKAR, M., JACOBS, B., VYAS, K., SUN, Y., OZDEMIR, A., YI, T., WILLIAMS, B. R. & BORDEN, E. C. (2003) Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. *J Interferon Cytokine Res*, 23, 745-56.

LING, E. A. & WONG, W. C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7, 9-18.

LIU, L., HUANG, D., MATSUI, M., HE, T. T., HU, T., DEMARTINO, J., LU, B., GERARD, C. & RANSOHOFF, R. M. (2006a) Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3-/- mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 176, 4399-409.

LIU, M., GUO, S., HIBBERT, J. M., JAIN, V., SINGH, N., WILSON, N. O. & STILES, J. K. (2011) CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22, 121-30.

LIU, Y., HAO, W., LETIEMBRE, M., WALTER, S., KULANGA, M., NEUMANN, H. & FASSBENDER, K. (2006b) Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci*, 26, 12904-13.

LUE, L. F., RYDEL, R., BRIGHAM, E. F., YANG, L. B., HAMPEL, H., MURPHY, G. M., JR., BRACHOVA, L., YAN, S. D., WALKER, D. G., SHEN, Y. & ROGERS, J. (2001) Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia*, 35, 72-9.

LUSTER, A. D., ALON, R. & VON ANDRIAN, U. H. (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*, 6, 1182-90.

MAGNUS, T., CHAN, A., GRAUER, O., TOYKA, K. V. & GOLD, R. (2001) Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol*, 167, 5004-10.

MALAKHOVA, O. A., KIM, K. I., LUO, J. K., ZOU, W., KUMAR, K. G., FUCHS, S. Y., SHUAI, K. & ZHANG, D. E. (2006) UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *Embo J*, 25, 2358-67.

MCGEER, P. L., ITAGAKI, S., BOYES, B. E. & MCGEER, E. G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-91.

MCRAE, B. L., SEMNANI, R. T., HAYES, M. P. & VAN SEVENTER, G. A. (1998) Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol*, 160, 4298-304.

MENDES, A. & SA, M. J. (2011) Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. *Arg Neuropsiquiatr*, 69, 536-43.

MERSON, T. D., BINDER, M. D. & KILPATRICK, T. J. (2010) Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS. *Neuromolecular Med*, 12, 99-132.

MULLER, M., CARTER, S. L., HOFER, M. J., MANDERS, P., GETTS, D. R., GETTS, M. T., DREYKLUFT, A., LU, B., GERARD, C., KING, N. J. & CAMPBELL, I. L. (2007) CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune

encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol*, 179, 2774-86.

NAGL, M., KACANI, L., MULLAUER, B., LEMBERGER, E. M., STOIBER, H., SPRINZL, G. M., SCHENNACH, H. & DIERICH, M. P. (2002) Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 1165-8.

NARAYANAN, S., DE STEFANO, N., FRANCIS, G. S., ARNAOUTELIS, R., CARAMANOS, Z., COLLINS, D. L., PELLETIER, D., ARNASON, B. G. W., ANTEL, J. P. & ARNOLD, D. L. (2001) Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol*, 248, 979-86.

NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-8.

OEHMICHEN, M. (1982) Are resting and/or reactive microglia macrophages? *Immunobiology*, 161, 246-54.

OMARI, K. M., LUTZ, S. E., SANTAMBROGIO, L., LIRA, S. A. & RAINES, C. S. (2009) Neuroprotection and remyelination after autoimmune demyelination in mice that inducibly overexpress CXCL1. *Am J Pathol*, 174, 164-76.

OUYANG, W., RUTZ, S., CRELLIN, N. K., VALDEZ, P. A. & HYMOWITZ, S. G. (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*, 29, 71-109.

PATANI, R., BALARATNAM, M., VORA, A. & REYNOLDS, R. (2007) Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33, 277-87.

PATY, D. W. & LI, D. K. (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*, 43, 662-7.

PERRY, V. H. (2010) Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol*, 120, 277-86.

PERRY, V. H., NICOLL, J. A. & HOLMES, C. (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 6, 193-201.

PESCE, J. T., RAMALINGAM, T. R., MENTINK-KANE, M. M., WILSON, M. S., EL KASMI, K. C., SMITH, A. M., THOMPSON, R. W., CHEEVER, A. W., MURRAY, P. J. & WYNN, T. A. (2009) Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog*, 5, e1000371.

PETRUZZELLI, L., TAKAMI, M. & HUMES, H. D. (1999) Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med*, 106, 467-76.

POTTLER, M., ZIERLER, S. & KERSCHBAUM, H. H. (2006) An artificial three-dimensional matrix promotes ramification in the microglial cell-line, BV-2. *Neurosci Lett*, 410, 137-40.

PRINZ, M., SCHMIDT, H., MILDNER, A., KNOBELOCH, K. P., HANISCH, U. K., RAASCH, J., MERKLER, D., DETJE, C., GUTCHER, I., MAGES, J., LANG, R., MARTIN, R., GOLD, R., BECHER, B., BRUCK, W. & KALINKE, U. (2008) Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity*, 28, 675-86.

PRIVRATSKY, J. R., NEWMAN, D. K. & NEWMAN, P. J. (2010) PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci*, 87, 69-82.

PROVIS, J. M., DIAZ, C. M. & PENFOLD, P. L. (1996) Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol*, 3, 213-22.

RANI, M. R. & RANSOHOFF, R. M. (2005) Alternative and accessory pathways in the regulation of IFN-beta-mediated gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, 25, 788-98.

RAO, N. A., KIMOTO, T., ZAMIR, E., GIRI, R., WANG, R., ITO, S., PARARAJASEGARAM, G., READ, R. W. & WU, G. S. (2003) Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 22-31.

RASMUSSEN, S., WANG, Y., KIVISAKK, P., BRONSON, R. T., MEYER, M., IMITOLA, J. & KHOURY, S. J. (2007) Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing--remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 130, 2816-29.

RIDLEY, A. J. (1994) Membrane ruffling and signal transduction. *Bioessays*, 16, 321-7.

ROGERS, J. & LUE, L. F. (2001) Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 39, 333-40.

RUDICK, R. A. & CUTTER, G. (2007) Interferon-beta for multiple sclerosis: Long-term benefits? *Ann Neurol*, 61, 283-5.

SAIJO, K. & GLASS, C. K. (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 11, 775-87.

SANFORD, M. & LYSENG-WILLIAMSON, K. A. (2011) Subcutaneous recombinant interferon-beta-1a (Rebif(R)): a review of its use in the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Drugs*, 71, 1865-91.

SAVILL, J. & FADOK, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407, 784-8.

SAWADA, M., IMAMURA, K. & NAGATSU, T. (2006) Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 373-81.

SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.

SCHUETZ, E. & THANOS, S. (2004) Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets*, 5, 619-27.

SHI, M., DENG, W., BI, E., MAO, K., JI, Y., LIN, G., WU, X., TAO, Z., LI, Z., CAI, X., SUN, S., XIANG, C. & SUN, B. (2008) TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol*, 9, 369-77.

SMITH, J. A., DAS, A., RAY, S. K. & BANIK, N. L. (2011) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull*, 87, 10-20.

SOKOLOWSKI, J. D. & MANDELL, J. W. (2011) Phagocytic clearance in neurodegeneration. *Am J Pathol*, 178, 1416-28.

STEELE, M. R., INMAN, D. M., CALKINS, D. J., HORNER, P. J. & VETTER, M. L. (2006) Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 977-85.

STREIT, W. J. (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40, 133-9.

STREIT, W. J., WALTER, S. A. & PENNELL, N. A. (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 57, 563-81.

TEIGE, I., TRESCHOW, A., TEIGE, A., MATTSSON, R., NAVIKAS, V., LEANDERSON, T., HOLMDAHL, R. & ISSAZADEH-NAVIKAS, S. (2003) IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 170, 4776-84.

TENOEVER, B. R., NG, S. L., CHUA, M. A., MCWHIRTER, S. M., GARCIA-SASTRE, A. & MANIATIS, T. (2007) Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science*, 315, 1274-8.

TODD, R. F., 3RD (1996) The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3). *J Clin Invest*, 98, 1-2.

TREMBLAY, M. E., STEVENS, B., SIERRA, A., WAKE, H., BESSIS, A. & NIMMERJAHN, A. (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*, 31, 16064-9.

UZE, G., SCHREIBER, G., PIEHLER, J. & PELLEGRINI, S. (2007) The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol*, 316, 71-95.

VAN ZUYLEN, W. J., GARCEAU, V., IDRIS, A., SCHRODER, K., IRVINE, K. M., LATTIN, J. E., OVCHINNIKOV, D. A., PERKINS, A. C., COOK, A. D., HAMILTON, J. A., HERTZOG, P. J., STACEY, K. J., KELLIE, S., HUME, D. A. & SWEET, M. J. (2011) Macrophage activation and differentiation signals regulate schlafen-4 gene expression: evidence for Schlaf-4 as a modulator of myelopoiesis. *PLoS One*, 6, e15723.

VITALE, G., DE HERDER, W. W., VAN KOETSVELD, P. M., WAAIJERS, M., SCHOORDIJK, W., CROZE, E., COLAO, A., LAMBERTS, S. W. & HOFLAND, L. J. (2006) IFN-beta is a highly potent inhibitor of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell growth in vitro. *Cancer Res*, 66, 554-62.

WAGNER, C., HANSCH, G. M., STEGMAIER, S., DENEFLÉH, B., HUG, F. & SCHOELS, M. (2001) The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function. *Eur J Immunol*, 31, 1173-80.

WEIMAR, W., HEIJINK, R. A., SCHALM, S. W., VAN BLANKENSTEIN, M., SCHELLEKENS, H., MASUREL, N., EDY, V. G., BILLIAU, A. & DE SOMER, P. (1977) Fibroblast interferon in HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Lancet*, 2, 1282.

WOLPE, S. D., SHERRY, B., JUERS, D., DAVATELIS, G., YURT, R. W. & CERAMI, A. (1989) Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 612-6.

XU, H., WU, Z. Y., FANG, F., GUO, L., CHEN, D., CHEN, J. X., STERN, D., TAYLOR, G. A., JIANG, H. & YAN, S. S. (2010) Genetic deficiency of Irgm1 (LRG-47) suppresses induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting apoptosis of activated CD4+ T cells. *Faseb J*, 24, 1583-92.

XU, Y., JOHANSSON, M. & KARLSSON, A. (2008) Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem*, 283, 1563-71.

YONG, V. W., CHABOT, S., STUVE, O. & WILLIAMS, G. (1998) Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology*, 51, 682-9.

YUAN, W. & KRUG, R. M. (2001) Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J*, 20, 362-71.

ZANG, S., GUO, R., ZHANG, L. & LU, Y. (2007) Integration of statistical inference methods and a novel control measure to improve sensitivity and specificity of data analysis in expression profiling studies. *J Biomed Inform*, 40, 552-60.

ZHANG, D. & ZHANG, D. E. (2011) Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *J Interferon Cytokine Res*, 31, 119-30.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Apol	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
Atp5b	Adenosintriphosphat-Synthase
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
Ccl	<i>Chemokin (C-C-motif) ligand</i>
Cd	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
Cmpk	<i>Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cxcl	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
Cxcr	<i>Chemokine (CXC motif) Rezeptor</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EAU	Experimentelle allergische Uveitis
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
FCS	Fötales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
F	<i>forward</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	<i>hour</i> (Stunde(n))

HHV	Humanes-Herpes-Virus
Icam	<i>Intercellular adhesion molecules</i>
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β Rezeptor
II	Interleukin
iNos	i-NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase
Irf	<i>Interferon regulatory factor</i>
Irgm	<i>Immunity-related GTPase family</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
Jak	Januskinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LPS	Lipopolysacharid
M	Molar
m	Milli
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MCSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
min	Minute(n)
Mhc	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Mm	Maus (Mus Musculus)
Mpeg	<i>Macrophage expressed gene</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
Mx	<i>Myxovirus (influenza virus) resistance</i>
n	Nano
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
NO	Stickstoffmonoxid
Oas	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase</i>
OD _x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
P18	Tag 18 nach der Geburt (p = postnatal)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Pecam	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qRT-PCR	Quantitative Real Time (Echtzeit)- PCR
R	<i>reverse</i>
RIN	RNA Integrity Number
RMA	Robust Multi-chip Analysis
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQ	Relative Quantifizierung
Rs1h ^{-/Y}	Retinoschisis knockout-Maus
RT	Raumtemperatur
Rtp	<i>Receptor (chemosensory) transporter protein</i>
SAM	<i>significance analysis of microarrays</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
sec	Sekunden
Slfn	Schlafen
Stat	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
t	<i>time</i> (Zeitpunkt)
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

Tlr	<i>Toll-like receptor</i>
Tnf	Tumornekrosefaktor
Trim	<i>Tripartite motif containing</i>
Tyk	Tyrosinkinase
U	<i>enzyme unit</i>
Uba/Ube	<i>Ubiquitin-activating enzyme</i>
ÜN	Über Nacht
Usp	<i>Ubiquitin specific peptidase</i>
Vcam	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
w/v	<i>weights per volume</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
ϵ	Extinktionskoeffizient
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Primäre Mikrogliazellen: Vergleich Zellmorphologie.....	3
Abbildung 2:	Aktivierung des Jak/STAT- Signalwegs durch Typ I Interferon.....	7
Abbildung 3:	DasTaqman®-Prinzip zur Quantifizierung von Nukleinsäuren....	25
Abbildung 4:	Migrations-Assay: Auszählmethode.....	28
Abbildung 5:	Einteilung qRT-PCR Gene in funktionelle Kategorien.....	32
Abbildung 6:	Gene expression dynamics inspector (GEDI).....	36
Abbildung 7:	Migrationsverhalten von BV-2-Mikroglia.....	39
Abbildung 8:	Auswertung der migrierten BV-2 Zellen.....	40
Abbildung 9:	Phagozytoseverhalten von BV-2 Mikrogliazellen.....	41
Abbildung 10:	Auswertung der Phagozytoseaktivität von BV-2 Zellen.....	42
Abbildung 11:	Zellüberleben im Phagozytose-Assay.....	42
Abbildung 12:	Aktinfilamentanordnung von BV-2 Mikrogliazellen.....	44
Abbildung 13:	Aktinfilamentanordnung von BV-2 Zellen: Nahaufnahme.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zellen, ihre Eigenschaften und Herkunft.....	11
Tabelle 2:	Oligonukleotide und Roche-Sonden für Taqman®-Assay.....	11
Tabelle 3:	Enzyme, jeweilige Anwendung und Hersteller.....	13
Tabelle 4:	Chemikalien, jeweilige Verwendung und ihre Hersteller.....	13
Tabelle 5:	Kits und Hersteller.....	14
Tabelle 6:	Medien und Zusätze.....	14
Tabelle 7:	Puffer und Lösungen.....	15
Tabelle 8:	Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller.....	15
Tabelle 9:	Geräte.....	15
Tabelle 10:	Software und Webapplikationen.....	16
Tabelle 11:	Mikroarraydaten der zur qRT-PCR-Validierung ausgewählten Gene...	31
Tabelle 12:	Mikroarraydaten der bekannten IFN β -induzierten Gene.....	33
Tabelle 13:	qRT-PCR-Validierung in BV-2 Zellen, 24h.....	34
Tabelle 14:	qRT-PCR-Validierung in BV-2 Zellen, 6h.....	35
Tabelle 15:	qRT-PCR-Validierung in primären Mikroglia, 24h.....	37
Tabelle 16:	qRT-PCR-Validierung in primären Mikroglia, 6h.....	38

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht ohne die Unterstützung und das Verständnis meiner Familie, zahlreicher Freunde und Kollegen entstanden, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Thomas Langmann, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Dissertationsthemas in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Seine Tür war stets offen um jede meiner Fragen zu beantworten und mich mit seinem Ideen- und Erfahrungsreichtum in dieser Arbeit voranzutreiben.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber möchte ich mich dafür bedanken an seinem Institut eine Dissertation durchführen zu dürfen. Herrn Prof. Dr. André Gessner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei meinen Kollegen und Freunden am Institut bedanke ich mich für viele anregende Gespräche, ob nun über fachlich relevantes oder einfach nur richtig gute Musik.

Dr. Marcus Karlstetter bin ich dankbar für zahlreiche große und kleine Tipps sowie seiner eigenen Begeisterung für Forschung, die mir immer wieder eine Motivation war. Ohne Yana Walczak wäre gar nichts passiert, sie zeigte mir alle wichtigen Handgriffe und hat auch danach noch geduldig jede noch so kleine Frage beantwortet. Vielen Dank dafür! Myriam Mirza, Felix Grassmann, Sarah Hill und Alexander Aslanidis danke ich für die gute Zeit im Labor.

Meinem Mann Michel bin dankbar für eine Geduld die seinesgleichen sucht, insbesondere beim Endspurt. Mein Bruder Benjamin hat mal wieder die Rolle des großen Bruders übernommen und meine Fehler (beim Korrekturlesen) ausgebügelt.

Am meisten danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und diese Promotion überhaupt ermöglicht haben und mich jederzeit und in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Patricia Weber, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den aufgelisteten Hilfsmitteln erstellt zu haben.

Regensburg, den 07.01.2013

Patricia Weber