

Aus dem Institut für Anatomie

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

Charakterisierung der TGF- β regulierten Expression von CD74 in Mikrogliazellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Jannik Benjamin Jahn | geb. am 02.07.1994 in Jever

aus Oldenburg

Rostock | 09.09.2022

Dissertation

Universitätsmedizin Rostock



Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Thomas Stahnke

Einrichtung: Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Björn Spittau

Einrichtung: Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe Anatomie und Zellbiologie

Drittgutachter: PD Dr. rer. nat. Kirsten Hattermann-Koch

Einrichtung: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Anatomisches Institut

Datum der Verteidigung: 14.03.2023

Dissertation

Universitätsmedizin Rostock

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.1	Mikroglia	1
1.1.1	Ursprung und Entwicklung	1
1.1.2	Physiologische Funktionen von Mikroglia	2
1.1.3	Mikroglia bei Erkrankungen des ZNS	2
1.2	Transforming Growth Factor β	6
1.2.1	TGF- β Familie	6
1.2.2	Funktion und Verteilung	6
1.2.3	TGF- β Synthese	6
1.2.4	Signalweg und Interaktion	8
1.2.5	TGF- β in Mikroglia	9
1.3	CD74	11
1.3.1	Struktur und Allgemeines	11
1.3.2	Die Synthese und Assoziation mit MHC2	11
1.3.3	CD74 in Mikroglia und Pathologien des zentralen Nervensystems	12
1.4	Zielsetzung	14
II.	Material	16
2.1	Einwegmaterialien	16
2.2	Laboraüstung	17
2.2.1	Geräte	17
2.2.2	Software	17
2.3	Reagenzien & Chemikalien	18
2.4	Zellkultur	19
2.5	Lösungen, Puffer und Gele	20
2.5.1	Angefertigte Puffer und Lösungen	20
2.5.2	Gebrauchsfertige Puffer, Lösungen und Gele	21
2.6	Proteine, Enzyme, Antigene und Inhibitoren	21
2.6.1	Antigene und rekombinante Proteine	21

2.6.2	Enzyme und Inhibitoren	21
2.7	Kits	21
2.8	Antikörper	22
2.8.1	Primärantikörper	22
2.8.2	Sekundärantikörper und gekoppelte Antikörper	22
2.8.3	FACS-Antikörper.....	22
2.9	Primer.....	22
III.	Versuchstiere und Zelllinien	23
3.1	Übersicht zu den Zell- und Mauslinien	23
3.2	BV2-Zellreihe.....	23
3.3	Primäre Mikroglia	23
3.4	TGF- β Rezeptor 2 defiziente Mäuse	23
IV.	Methoden	26
4.1	BV2 Zellreihe	26
4.1.1	Kultivierung	26
4.1.2	Passage.....	26
4.1.3	Behandlung.....	26
4.1.4	Expressionsanalytik	27
4.1.4.1	RNA Isolation	27
4.1.4.2	cDNA-Synthese	27
4.1.4.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	28
4.1.4.4	Auswertung.....	29
4.1.5	Proteinanalytik	30
4.2	Primäre Mikroglia	30
4.2.1	Zellkultur, Präparation und Passage.....	30
4.2.2	Immunzytochemie (ICC).....	31
4.2.3	RNA-Expressionsanalytik	32
4.2.3.1	Behandlung.....	32
4.2.3.2	RNA-Isolation.....	32
4.2.3.3	Real Time – qPCR (RT-qPCR).....	33
4.2.4	Proteinanalytik	34

4.2.4.1	Proteinisolation	34
4.2.4.2	Quantitative Analyse	35
4.2.4.3	SDS-PAGE	35
4.2.4.4	Western Blot	36
4.2.4.5	Immundetektion	36
4.2.5	Durchflusszytometrie von <i>in vitro</i> Zellen	36
4.2.6	Durchflusszytometrie von <i>ex vivo</i> Zellen	37
4.2.6.1	Isolation von Mikroglia mittels Percoll®	37
4.2.6.2	Isolierung von Peritonealmakrophagen	38
4.2.6.3	Immunfärbung.....	38
4.2.7	Immunhistochemie (IHC).....	39
4.2.7.1	Deletion des TGF- β Rezeptors 2	39
4.2.7.2	Hirnentnahme	39
4.2.7.3	Immunfärbung.....	39
4.2.8	Statistische Analyse.....	40
V.	Ergebnisse	41
5.1	Hemmung des TGF- β Signalwegs durch den TGF- β R1 Inhibitor	41
5.2	BV2 Zelllinie	43
5.2.1	Regulation der CD74 Expression von BV2 Zellen durch TGF- β	43
5.2.2	Die durch TGF- β 1 vermittelte Reduktion der durch LPS induzierten CD74-Synthese in BV2 Zellen.....	45
5.3	Primäre Mikroglia	47
5.3.1	Die durch TGF- β 1 vermittelte Hemmung der durch LPS induzierten CD74 Expression in primären Mikrogliazellen	47
5.3.2	Die Regulation der CD74-Synthese in primären Mikrogliazellen durch TGF- β 1	49
5.3.3	Die durch den TGF- β R1 Inhibitor und LPS regulierte CD74 Expression und Proteinsynthese in Mikroglia aus einer Glia-Mischkultur	52
5.3.4	Die durch T β RI induzierte und LPS reduzierte Oberflächenpräsentation von CD74 auf primären Mikrogliazellen.....	54
5.3.5	Die altersabhängige Oberflächenpräsentation von Mikrogliazellen nach einer ex-vivo Analyse von p7- und p30-Tieren	57
5.4	Induktion der CD74- und MHC2-Synthese in mgT β R2 ^{-/-}	59

VI. Diskussion	61
6.1 Aktivierung und Inhibition des TGF- β Signalweges durch einen rekombinanten TGF- β 1 und TGF- β Rezeptor Inhibitor	61
6.2 Eine durch LPS induzierte und TGF- β 1 regulierte Genexpression von CD74 in BV2 Zellen und primären Mikroglia	61
6.3 Die durch TGF- β regulierte Cd74 Expression und die CD74 Präsentation in der Glia-Mischkultur	63
6.4 Eine durch LPS induzierte und TGF- β 1 regulierte Erhöhung des Anteils der p41 Untereinheit am gesamten CD74	65
6.5 Eine altersabhängige Oberflächenpräsentation von CD74 auf <i>ex vivo</i> isolierten Mikroglia und Peritonealmakrophagen	67
6.6 Der <i>in vivo</i> Nachweis einer verstärkten CD74 Synthese durch Mikroglia in transgenen und TGF- β Rezeptor 2 defizienten Mäusen	68
6.7 Limitationen	68
6.8 Fazit und Ausblick	70
VII. Zusammenfassung.....	74
VIII. Thesen.....	76
IX. Literaturverzeichnis	78
Danksagung.....	92
Lebenslauf	94
Eidesstattliche Versicherung	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stufen der Entwicklung von Mikroglia	1
Abbildung 2: Synthese von TGF- β 1	7
Abbildung 3: Signaltransduktion über den TGF- β Rezeptor	8
Abbildung 4: Konstruktion der Mauslinie Cx3cr1 ^{CreERT2} :R26-yfp,Tgfb β 2 ^{fl/fl}	24
Abbildung 5: Das TGF- β R2 Gen vor (oben) und nach (unten) der Deletion durch ein durch Tamoxifen aktiviertes CreERT.	39
Abbildung 6: Die Regulation von SMAD-Zellkerntranslokationen durch TGF- β 1 und T β RI	41
Abbildung 7: Eine durch TGF- β 1 vermittelte Hemmung der durch LPS induzierten Expression von CD74 in BV2.....	43
Abbildung 8: Reduktion der durch LPS induzierten CD74 Synthese durch TGF- β 1 in BV2 Zellen.....	45
Abbildung 9: Reduktion der durch LPS induzierten CD74 Expression in primären Mikroglia durch TGF- β 1.....	47
Abbildung 10: Reduktion der durch LPS induzierten CD74-Synthese durch TGF- β 1 in primären Mikrogliazellen	49
Abbildung 11: Induktion der CD74-Synthese durch den TGF- β R1 Inhibitor und eine Reduktion der Cd74-Expression durch LPS in primären Mikrogliazellen.....	52
Abbildung 12: Die durch T β RI induzierte und LPS reduzierte Oberflächenpräsentation von CD74	54
Abbildung 13: Die altersabhängige CD74-Oberflächenpräsentation von Mikroglia im Vergleich mit Peritonealmakrophagen	57
Abbildung 14: Induktion der CD74- und MHC2-Synthese in mgT β R2 ^{-/-}	59

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AD	Alzheimer Krankheit (engl. Alzheimers Disease)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APC	Allophycocyanin
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
Aβ	β-Amyloid
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD74	Cluster of Differentiation 74
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	Cre-Rekombinase
CSF1	Colony-stimulating
Cx3cr1	Fractalkin Rezeptor
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAM	Krankheits-assoziierte Mikroglia (engl. Disease-associated microglia)
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM F/12	Engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Erythro-myeloische Vorläuferzelle
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
ERT	Humaner Östrogenrezeptor
eYfp	Enhanced yellow fluorescent protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomic DNA
HAM	Highly-activated microglia
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HD	Chorea Huntington, engl. Huntington's Disease
HRP	Horseradish Peroxidase
ICC	Immunzytochemie
ICD	Intrazelluläre Domäne
IFN-γ	Interferon-γ
Ii	Invariante Kette
IKB	Inhibitor of nuclear factor kappa-B
IL	Interleukin
IRF8	Interferon-Regulationsfaktor 8
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
LAP	Latency-associated protein
LLC	Large-latency complex
LPS	Lipopolysaccharid

LTBP	Latent TGF- β binding protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCAO	Okklusion der mittleren Zerebralarterien
MFI	Median Fluorescence Intensity
MGnD	Microglia neurodegenerative phenotype
mgTgf β 2 ^{-/-}	Mikroglia von mikroglia-spezifisch TGF- β -R2 defizienten Tieren
MHC2	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 2
MIF	Macrophage Migration inhibitory Factor
MIF-2	D-Dopachrom-Tautomerase
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Multiple Sklerose
NF- κ B	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
ng	Nanogramm
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	<i>Morbus Parkinson</i> , engl. Parkinson's Disease
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PVDF	Polycylnidenfluorid
RFI	Relative Fluorescence Intensity
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis-Processed Protein Family
RIPA	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
SBE	Smad binding element
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SLC	Small-latency complex
SPPL2a	Signal peptid peptidase-like 2A
T β R1	TGF- β Rezeptor 1
T β RI	TGF- β R1 Kinase Inhibitor
TAFK1	TGF- β -associated kinase 1
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TGF	Transforming Growth Factor
TGF- β R2	TGF- β Rezeptor 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. Einleitung

1.1 Mikroglia

1.1.1 Ursprung und Entwicklung

Mikroglia wurden erstmalig 1939 durch del Rio-Hortega klassifiziert [1]. Sie sind die charakteristischen immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) [2, 3]. Im murinen Hirn liegt der Anteil von Mikroglia bei 5-13 % der Zellen, beim Menschen bei 0,5-13 % [4, 5].

In der frühen Embryonalentwicklung bilden sich aus erythro-myeloischen Vorläuferzellen (Abbildung 1, EMP) und abhängig von den Transkriptionsfaktoren PU.1 und IRF8 primitive Makrophagen (Abbildung 1, A1 und A2) [6, 7]. Während der weiteren pränatalen Entwicklung wandern diese primitiven Makrophagen (Abbildung 1, A2) in das entstehende ZNS, um dort eine eigenständige Population von Mikroglia zu entwickeln. Diese Wanderung der Zellen wird u. a. durch Interleukin-34 und die Interaktion des Colony-stimulating Factors 1 (CSF1) mit dem CSF1-Rezeptor gesteuert [8–11]. Die Mikroglia vermehren sich stark und reifen in den Mäusen bis zum 14. postnatalen Tag (p14) aus (Abbildung 1, M0) [12, 13]. Diese Ausreifung findet maßgeblich unter dem Einfluss von TGF- β 1 und einem aktivierten TGF- β Signal in den Mikroglia statt [14]. Die entstehende Population von Mikroglia bleibt in der Zahl stabil und erneuert sich aus sich selbst heraus [15–17]. Dabei ist sie, anders als bei peripheren Immunzellen, unabhängig von zirkulierenden Monozyten und Knochenmarkstammzellen, die unter physiologischen Bedingungen kaum zur Population der Mikroglia beitragen [10].

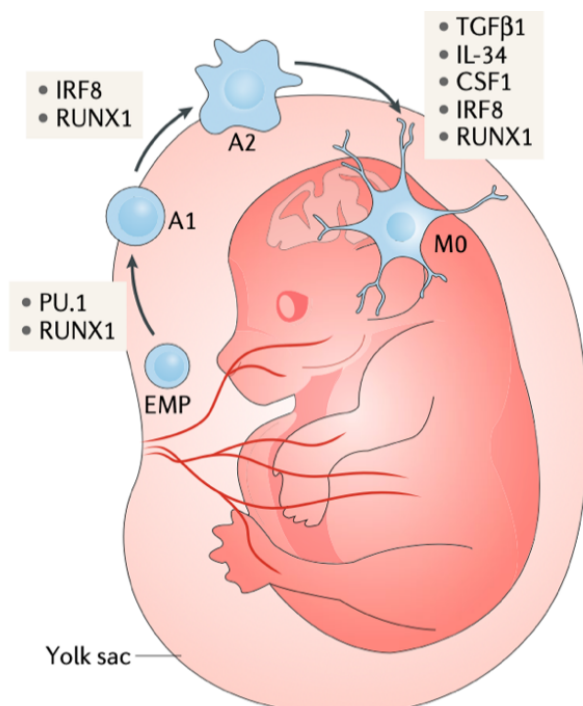


Abbildung 1: Stufen der Entwicklung von Mikroglia [18].

1.1.2 Physiologische Funktionen von Mikroglia

Mikroglia übernehmen vielfältige Aufgaben im zentralen Nervensystem. Bei der Entwicklung und Plastizität des ZNS sind sie unerlässlich für die Neurogenese, aber auch bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen spielen sie eine wichtige Rolle [19–21]. Die neuronale Plastizität ist abhängig von den Mikroglia [22, 23], da sie maßgeblich an der Bildung und Trennung von Synapsen beteiligt sind [24, 25]. Außerdem unterstützen sie die Oligodendro- und Myelinogenese durch die Ausschüttung von Zytokinen [26–28]. Mikroglia beeinflussen das Überleben und die Erneuerung von Neuronen positiv und für kortikale Neuronen sind sie sogar überlebensnotwendig [29, 30]. Als Vertreter des Immunsystems wachen die Mikroglia über das ZNS und reagieren auf pathologische Vorgänge. Um diese Funktion erfüllen zu können, durchziehen sie das gesamte Parenchym mit ihren weit verzweigten Fortsätzen [31]. Verschiedene Rezeptoren, darunter die Toll-like Rezeptoren, Nod-like Rezeptoren und RIG-like Rezeptoren, befähigen die Mikroglia dazu, auf bestimmte Muster zu reagieren, die als Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs) und Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs) klassifiziert werden. Die vielfältigen Signalwege können in verschiedenen Kombinationen und Synergien aktiviert werden, damit die notwendige komplexe Immunantwort ausgelöst werden kann [32].

1.1.3 Mikroglia bei Erkrankungen des ZNS

Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer Veränderung und zur Proliferation der Mikroglia [33, 34]. Sie reagieren auf Verletzungen, initiieren und unterstützen Reparaturen und Remodeling [35]. Bei Kontakt mit Pathogenen bilden sie die immunologische Abwehr des ZNS, wobei sie auch weitere Immunzellen rekrutieren können [36]. In der aktuellen Forschung rücken die Mikroglia wegen ihrer Beteiligung an der Neuroinflammation und der Neurodegeneration verstärkt in den Fokus. Die Aufklärung und Charakterisierung der genauen Funktion der Mikroglia bei Erkrankungen können möglicherweise zu neuen therapeutischen Ansätzen führen [37–39]. Die Aktivierung von Mikroglia wurde lange Zeit ähnlich wie bei den M1- und M2-Stadien von Makrophagen beschrieben. Demnach befinden sich die Mikroglia regulär in einem ruhenden M0-Zustand, in dem sie die Umgebung überwachen und unverzüglich auf endogene und exogene Reize reagieren können [31]. Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ) oder Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) versetzen Mikroglia *in vitro* in einen Zustand, der anhand der Morphologie und Expressionsmuster als M1-Aktivierung bezeichnet wird [40]. Dieser Zustand wird mit der inflammatorischen Reaktion auf Verletzungen oder Pathogene in Verbindung gebracht [41, 42]. Zytokine, wie IL4, 10 und 13 oder TGF- β , können wiederum die Aktivierung in einen anti-inflammatorischen M2-Zustand konvertieren. Mikroglia exprimieren in diesem Zustand regulatorische, protektive und

regenerative Gene [4, 43–45]. Anti-inflammatorische Zytokine dominieren in diesem Zustand, wodurch die Fibrosierung, Reparatur und Regeneration der Umgebung und des extrazellulären Raumes angestoßen werden [4, 42, 46]. Für die Erklärung verschiedener Erkrankungsmodelle wurde eine Dysregulation dieser M1- und M2-Zustände in den Mikroglia angenommen [47–49]. Die Beschreibung in diesem starren Modell von zwei Zuständen konnte der *in vivo* Forschung aber nicht standhalten, weshalb verstärkt über ein Kontinuum zwischen M1- und M2-Zustand diskutiert wurde [50–52]. Auch wenn dieses Kontinuum gut auf Mikroglia *in vitro* angewandt werden konnte, wurde über eine Übertragung auf *in vivo* Zustände zunehmend kontrovers diskutiert, da die Signatur der Mikroglia in ihrer Komplexität und Dynamik mit diesen Modellen nicht angemessen beschrieben werden kann [53, 54]. Neuerungen ergaben sich durch die Beschreibung von krankheits-assoziierten Mikroglia (DAMs, engl. disease-associated microglia) und Mikroglia mit einem neurodegenerativen Phänotyp (MGnD, engl. microglia neurodegenerative phenotype). In verschiedenen Studien wurden die als DAM und MGnD beschriebenen Mikroglia miteinander identifiziert [18]. In anderen Studien wurden die MGnD dagegen teilweise als Endzustand bei einer Chronifizierung oder einer massiven Pathologie beschrieben, wobei es zu einer völligen Entkopplung von regulatorischen Signalen kommt, wie z. B. des TGF- β Signalwegs [18]. Im Folgenden werden diese Mikroglia wegen einer bisher fehlenden wissenschaftlichen Differenzierung als DAMs zusammengefasst.

DAMs wurden von mehreren Forschungsgruppen als relevant im Rahmen des Prozesses der Alzheimer-Erkrankung beschrieben (AD, engl. Alzheimers Disease). AD ist eine durch ein verstärktes Auftreten von β -Amyloid-Plaques gekennzeichnete neurodegenerative Krankheit, die mit einer zunehmenden Hirnatrophie und kognitiven Einschränkungen verbunden ist [55]. In den murinen AD-Modellen 5XFAD und APP-PS1 und auch bei Alzheimerpatient*Innen wurden Mikroglia mit ähnlicher Expressionssignatur gefunden und als DAMs abgegrenzt [18, 56–58]. Diese Mikroglia befinden sich in einer räumlichen Nähe zum β -Amyloid ($A\beta$) und weisen ein pro-inflammatorisches Expressionsmuster auf [37]. Im Krankheitsverlauf spielen die Mikroglia eine bilaterale Rolle. Einerseits können sie β -Amyloid phagozytieren, wodurch sie den Progress der AD verzögern können. Bei längerer und verstärkter Aufnahme der Plaques entwickeln die Mikroglia allerdings den neuroinflammatorischen Phänotyp DAM, der neurotoxisch wirkt und den Progress der Alzheimer-Krankheit beschleunigt [18]. Dabei sind sie u. a. auch am Verlust von Synapsen beteiligt [59]. Getriggert durch sterbende Neuronen und die Amyloid-Plaques bilden die Mikroglia ein Umfeld, dass zur Progression von Alzheimer und einer verstärkten Aggregation von $A\beta$ -Plaques führt [57].

Eine ähnlich gegensätzliche Rolle von DAMs wurde auch für die Multiple Sklerose (MS) beschrieben [60]. Die MS ist eine chronisch-entzündliche, schubweise verlaufende und demyelinisierende Erkrankung des ZNS [61]. Im entzündlichen Schub konnten Mikroglia identifiziert werden, die inflammatorische Zytokine und Proteasen ausschütten und dabei auch T-Zellen rekrutieren [37]. Dabei spielen u. a. der NF- κ B-, der JNK- und der ERK1/2-Signalweg eine maßgebliche Rolle [2]. Im Unterschied zu diesen beschriebenen inflammatorischen Reaktionen unterstützen die Mikroglia aber auch die Regeneration und Remyelinisierung von Axonen, beseitigen Myelin-Bruchstücke und schütten neurotrophe Faktoren aus [23]. Im murinen Modell der MS, der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE), führte eine vollständige Depletion der Mikroglia zu einer deutlichen Minderung der klinischen Symptomatik [62]. Masuda et al. konnten in Einzelzellstudien unterschiedliche DAM-Subpopulationen abgrenzen, die sowohl während der Demyelinisierung als auch während der Remyelinisierung auftreten [60]. Die Autoren gehen dabei von der Annahme aus, dass diese Mikroglia einem transkriptionalen Kontinuum folgen und sich den durch die Krankheit gestellten Anforderungen anpassen [60].

Neben AD und MS treten auch bei den Prozessen des Alterns im ZNS verstärkt inflammatorisch veränderte Mikroglia auf, die eine erhöhte Produktion von inflammatorischen Zytokinen, eine erhöhte Expression des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α), von IL6 und MHC2 und eine geringere Fähigkeit zur Phagozytose von β -Amyloid aufweisen [63]. Der Phänotyp zeigt eine verstärkte Tendenz zur Überreaktion auf eine Immunstimulation [64, 65]. Einzelzellanalysen im gealterten ZNS von Mäusen beschreiben einen stark aktivierten Phänotyp, der als HAM bezeichnet wurde (engl. highly-activated microglia), mit einer großen Ähnlichkeit zur Expressionssignatur von DAM und auch mit einer zusätzlich verstärkten Aktivierung der MIF/CD74 Achse [66]. Das pro-inflammatorische Zytokin Macrophage Migration inhibitory Factor (MIF) ist der natürliche Agonist von CD74 und wird im folgenden Kapitel zu CD74 genauer beschrieben. Der Beginn und die Progression von alters-assoziierten und neurodegenerativen Erkrankungen, wie AD und der Parkinson Krankheit (PD, engl. Parkinson's Disease), wird mit solchen Veränderungen der Mikroglia im gealterten ZNS in Verbindung gebracht [33]. Darüber hinaus wurden DAMs im murinen Modell des kortikalen Schlaganfalls, im SOD-1-Modell zur amyotrophen Lateralsklerose (ALS), und bei PD dokumentiert [56, 67]. Die Expressionssignaturen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mit modernen *in vivo* Studien immer weiter bis auf das Einzelzellniveau spezifiziert [18, 56]. Die starken Ähnlichkeiten wurden von Mathys et al. auf ein hoch konserviertes Transkriptionsprogramm zurückgeführt, das unter neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Anforderungen in den Mikroglia aktiviert wird [68]. Dabei sind allerdings homöostatische Gene, wie Tmem119, Cx3cr1 und P2ry12, herunterreguliert [18, 56, 68].

Funktionell steht hinter diesem Expressionsprogramm u. a. die Phagozytose von degenerativen Neuronen oder Proteinaggregaten, wie sie bei AD, PD und Chorea Huntington (HD, engl. Huntington's Disease) auftreten [56]. Als Auslöser dieser DAM-Signatur wurden u. a. Myelinfragmente, Proteinansammlungen, eine Neurodegeneration mit apoptotischen Neuronen und vermehrt ausgeschüttete Entzündungsmediatoren identifiziert [69]. Die Transformation von Mikroglia in DAMs löst eine Kaskade aus, in der u. a. verstärkt Apolipoprotein E (ApoE) exprimiert wird. Die Aktivierung von TREM2 auf Mikroglia durch ApoE wiederum ist ebenfalls ein wichtiger Schritt bei der Transformation von Mikroglia in DAMs. Die als DAMs, MDnG oder HAMs abgegrenzten Mikroglia sind wichtige Beteiligte bei der Neuroinflammation und der Neurodegeneration. Interessanterweise führt ein Mangel von TREM2, der ein wichtiger Rezeptor für die Transformation von homöostatischen Mikroglia in DAMs ist, im AD Mausmodell zu einer verstärkten Ansammlung von β -Amyloid und Plaques und zu einem verstärkten neuronalen Verlust [70, 71]. Die Konversion in DAMs spielt dabei durch die Entfernung von Proteinablagerungen und die Begrenzung von neurodegenerativen Schäden eine protektive Rolle [67].

Die genannten Beispiele machen deutlich, dass Mikroglia eine zentrale Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf von verschiedenen Erkrankungen spielen. Bisher ist allerdings unklar, bei welcher Erkrankung und zu welchem Zeitpunkt aktivierte Mikroglia schädlich oder protektiv wirken. Diese Zusammenhänge zu klären, ist ein wichtiger Gegenstand der aktuellen Forschung [18].

1.2 Transforming Growth Factor β

1.2.1 TGF- β Familie

Die Familie der Transforming Growth Factors β (TGF- β) ist eine Gruppe von verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die als Homo- oder Heterodimere auftreten und durch 33 verschiedene Gene kodiert werden. Die Faktoren der TGF- β Familie wirken als Transkriptionsfaktoren. Sie beeinflussen die Entwicklung, Proliferation und Differenzierung, die Wundheilung und das Immunsystem und bewahren die Homöostase von Zellen und Geweben [72]. In der vorliegenden Arbeit richtet sich der Fokus auf der Unterfamilie der TGF- β Faktoren, zu der TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 gehören. Ein besonderes Augenmerk wurde auf TGF- β 1 gerichtet. Dieser Faktor spielt eine wichtige Rolle bei der Immunregulation, der Kontrolle der Entwicklung, der Differenzierung, Aktivierung und Homöostase von Immunzellen und Mikroglia [73].

1.2.2 Funktion und Verteilung

Die verschiedenen TGF- β Isoformen erfüllen in Säugetieren komplexe Aufgaben. Studien an Mäusen mit einer spezifischen Deletion einer der TGF- β Isoformen konnten zeigen, wie wichtig und vielseitig die Beteiligung von TGF- β im Organismus ist. Mäuse mit einem homozygoten Knockout von TGF- β 1 (TGF- β 1^{-/-}-Mäuse) erleiden nach einer initial unauffälligen Entwicklung ungefähr 20 Tage postnatal ein ausgeprägtes Wasting-Syndrom mit einer multifokalen Immunreaktion, Gewebnekrosen und letalem Organversagen [74, 75]. TGF- β 2^{-/-}-Mäuse versterben kurz nach der Geburt aufgrund einer fehlerhaften synaptischen Übertragung im respiratorischen Zentrum des Hirnstammes [76]. TGF- β 3^{-/-}-Mäuse zeigen eine Störung bei der epithelial-mesenchymalen Interaktion mit Defekten der Lunge und der Entwicklung einer Gaumenspalte. Die Mäuse versterben innerhalb von 24 Stunden postnatal [77, 78]. Diese Versuche machen deutlich, wie vielfältig und komplex die TGF- β Isoformen in ihrer Funktion sind. Trotz dieser relevanten Unterschiede ist es ihnen gemeinsam, dass ein langfristiges Überleben ohne sie nicht möglich ist.

1.2.3 TGF- β Synthese

Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Translation von TGF- β als pro-TGF- β simultan mit dem latent TGF- β binding protein (LTBP). Pro-TGF- β bildet Homodimere, die über Disulfidbrücken nicht-kovalent an das latent TGF- β binding protein (LTBP) binden und einen ternären Komplex bilden, der als large-latency complex (LLC) bezeichnet wird (Abbildung 2, 1). Die Pro-Domäne des TGF- β , das als latency-associated protein (LAP) bezeichnet wird,

dient als Signalsequenz für die Dislokation des LLC in das trans-Golgi-Netzwerk, wo die Pro-Domäne vom TGF- β abgespalten wird (Abbildung 2, 2). Das LAP bleibt über starke nicht-kovalente Bindungen mit TGF- β assoziiert. Diese Verbindung wird small-latency complex (SLC) genannt. Der Komplex aus SLC und einem LTBP wird als LLC bezeichnet [79]. TGF- β wird als LLC aus den Zellen sezerniert (Abbildung 2, 3). Über das LTBP kommt es zu einer Interaktion und einer Einlagerung in die extrazelluläre Matrix (Abbildung 2, 4). Die Freisetzung von TGF- β erfolgt durch verschiedene Stimuli und Mechanismen, die zu einem großen Teil noch nicht identifiziert wurden (Abbildung 2, 5). Zwei Wege der Freisetzung von TGF- β sind bekannt. Gesichert ist ein von Integrin abhängiger Mechanismus, bei dem Integrin mit LAP interagiert und durch Traktion die Freisetzung von TGF- β aus dem LLC bewirkt. Darüber hinaus ist auch ein von Integrin unabhängiger Weg bekannt, bei dem Proteasen durch eine Spaltung des LAPs zu einer Freisetzung des TGF- β -Dimers führen [79, 80].

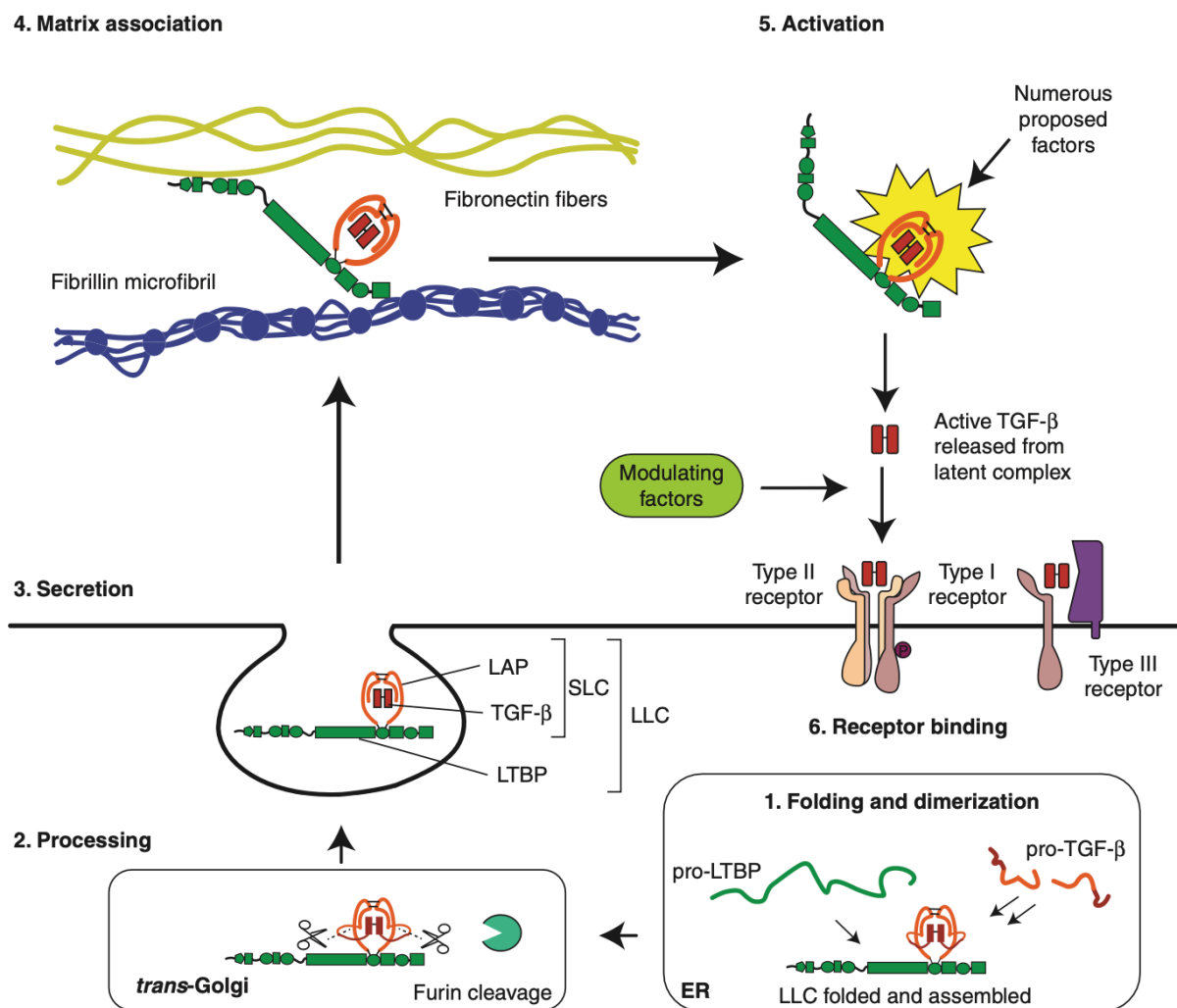


Abbildung 2: Synthese von TGF- β 1 [79].

1.2.4 Signalweg und InteraktionSupp

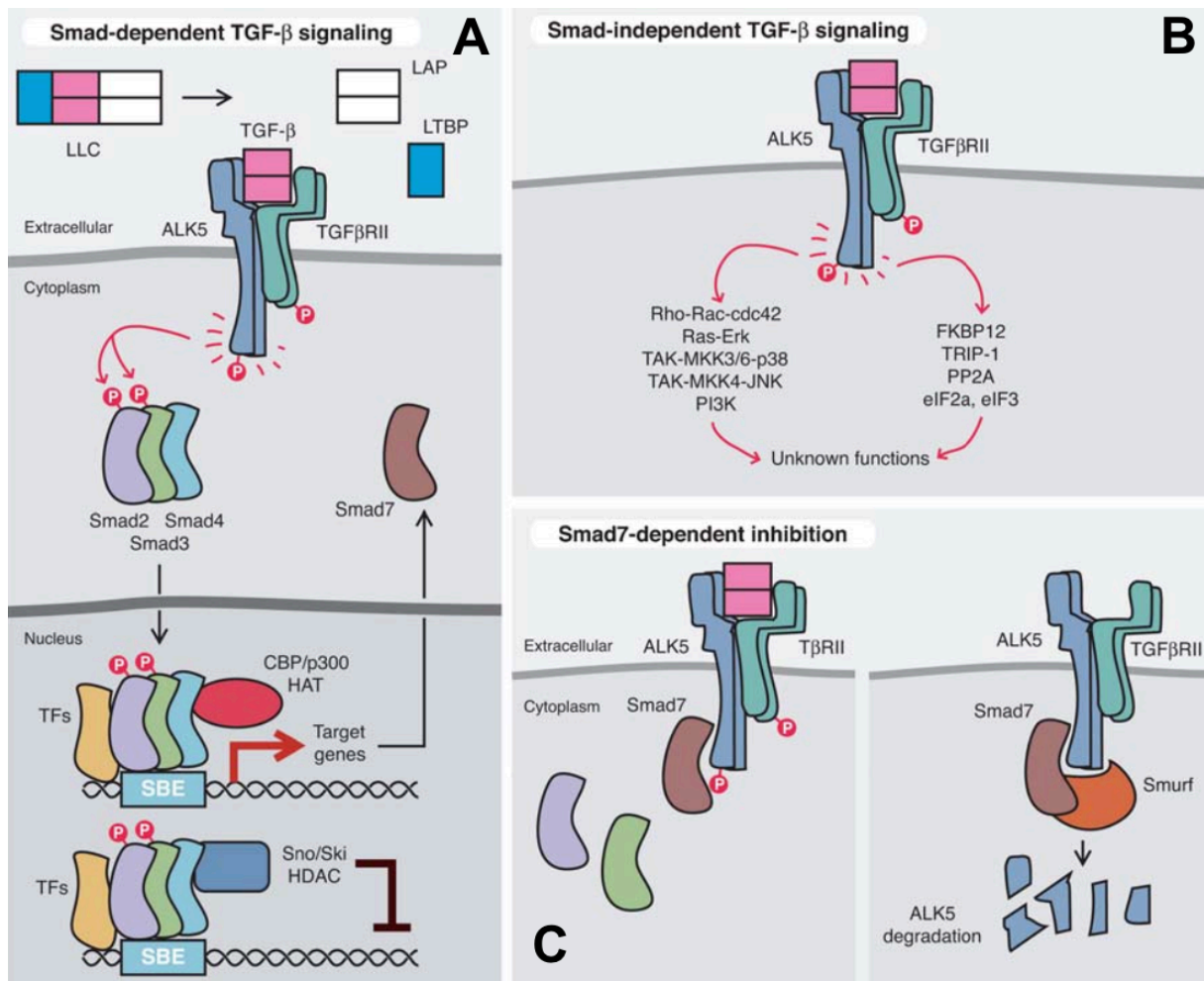


Abbildung 3: Signaltransduktion über den TGF- β Rezeptor [80].

TGF- β -Rezeptoren sind Transmembranrezeptoren, die ihre Wirkung als Serin/Threonin- und Tyrosinkinase entfalten [81]. Aktives TGF- β 1 bindet zunächst an ein TGF- β Rezeptor 2 Homodimer (T β R2), das dann zusammen mit zwei TGF- β Rezeptor 1 (T β R1) Homodimeren ein Tetramer bildet. T β R2 katalysiert die Phosphorylierung der T β R1-Untereinheiten und aktiviert damit die Kinaseaktivität des T β R1 [82]. Die T β R1-Einheiten entfalten dann ihre Funktion über verschiedene Signalwege, die in den klassischen von Smad abhängigen und in den nicht-klassischen von Smad unabhängigen Weg unterteilt werden. Die Smads sind eine Gruppe von intrazellulären Proteinen, die an der Signalweiterleitung über den TGF- β Signalweg beteiligt sind. Beim klassischen Weg (Abbildung 3, A) erfolgt die Signalweiterleitung über die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3, die danach einen Komplex mit Smad4 bilden. Dieser Komplex bindet nach der Translokation in den Nucleus als Transkriptionsfaktor das SBE (Smad binding element) und induziert dadurch die Expression von mit TGF- β assoziierten Genen. Die hohe Variabilität der durch TGF- β Rezeptoren ausgelösten Effekte

kommt durch das komplexe Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren zustande [80]. Eine regulatorische Funktion übernimmt das inhibitorische Smad7 (Abbildung 3, C), das bei der Aktivierung des Smad-Signalwegs im Sinne einer negativen Rückkopplung verstärkt gebildet wird. Es konkurriert mit Smad2 und Smad3 um den T β R1 und kann zu einem verstärkten Abbau des Rezeptors führen [80]. Darüber hinaus gibt es auch von Smad unabhängige Signalwege (Abbildung 3, B). Dazu gehören die Aktivierung des PI3K- und des mTOR-Signalwegs und der TAFK1 (TGF- β -associated kinase 1) mit einer konsekutiven Aktivierung des p38- und/oder des C-Jun-MAPK-Signalweges [83]. Außerdem kann es zu einer Degradierung von I κ B (inhibitor of nuclear factor kappa-B) und dadurch zu einer verminderten Suppression des NF- κ B Signalwegs kommen. Von Smad unabhängige Signalwege inhibieren den Zellzyklus, verstärken die epithelial-mesenchymale Transition und sind an der Immunsuppression und der Neuroprotektion beteiligt [84].

1.2.5 TGF- β in Mikroglia

TGF- β 1 ist maßgeblich an der Reifung von Mikroglia und der damit verbundenen Entwicklung der spezifischen Expressionssignatur beteiligt [14, 73, 85]. Grundlegende Funktionen der Mikroglia, wie z. B die Fähigkeit zur Eliminierung von Synapsen, sind abhängig vom TGF- β Signal [86]. TGF- β 1 ist unerlässlich für die Erhaltung der Homöostase der Mikroglia und übt anti-inflammatorische, immunregulatorische und antiproliferative Einflüsse auf die Mikroglia aus [87–89]. Neben Neuronen und Gliazellen schütten auch die Mikroglia selbst TGF- β 1 aus und wirken dadurch autokrin [14]. Mit β -Amyloid angereicherte Mikroglia-Kulturen bauen das Amyloid nach der Zugabe von TGF- β 1 verstärkt ab. Am Alzheimer Modell konnte *in vivo* gezeigt werden, dass durch Astrozyten ausgeschüttetes TGF- β 1 mit einer Verminderung von β -Amyloid Ablagerungen verbunden ist [90]. Außerdem reduziert TGF β 1 die durch A β induzierte Neurodegeneration und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen [91]. Ein dysreguliertes TGF- β 1 Signal ist mit Ablagerungen von β -Amyloid, der Bildung von neurofibrillären Tangles und einer Verstärkung der Neurodegeneration bei AD assoziiert [92].

Auch bei der PD, bei der inflammatorisch aktivierte Mikroglia auftreten, die entzündliche Zytokine produzieren, wirkt TGF- β 1 neuroprotektiv und hemmt die inflammatorische Aktivierung der Mikroglia [93].

Bei Schädigungen des Parenchyms, wie im Mausmodell nach einer Okklusion der mittleren Zerebralarterien (MCAO), vergrößert sich bei einer Inhibition des TGF- β 1 Signals die Nekrosezone [94, 95]. Auch bei der intrazerebralen Hämorrhagie wird durch TGF- β 1 die von den Mikroglia ausgelöste Neuroinflammation moduliert und begrenzt. Bei Patient*Innen mit intrazerebraler Hämorrhagie konnte beobachtet werden, dass ein früher Anstieg von TGF- β 1

im Plasma im Vergleich mit Patient*Innen mit einem späten Anstieg von TGF- β 1 im Plasma mit einem besseren Outcome verbunden ist [96].

Diese Beispiele verdeutlichen die anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte von TGF- β 1 bei Verletzungen und inflammatorischen oder degenerativen Veränderungen des zentralen Nervensystems [89, 91]. In DAMs als den zentralen Effektoren bei einer Neuroinflammation und Neurodegeneration sind die Signalwege von TGF- β 1 supprimiert [18].

1.3 CD74

1.3.1 Struktur und Allgemeines

CD74 (Cluster of Differentiation 74), der auch als invariante Kette (Ii) bezeichnet wird, ist ein einmalig die Membran durchspannendes Transmembranprotein mit zytosolischem N-Terminus (Typ 2 Transmembranprotein) [97]. Das entsprechende Gen liegt bei Mäusen auf dem Chromosom 18 [98] und kodiert für eine 31 kDa (p31) Variante oder eine 41 kDa (p41) Splicingvariante [99]. Der Anteil der p41 Variante liegt je nach Zelltyp bei 10-40 % [100].

Als Chaperon von MHC2 ist CD74 an der Antigenpräsentation beteiligt [97, 101] und erfüllt darüber hinaus auch als Rezeptor für den Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) von MHC2 unabhängige Funktionen [102, 103]. CD74 wird von immunologischen Zellen, wie T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APZ), aber auch von Epithel- und Endothelzellen exprimiert. Neben der Funktion bei der Präsentation von Antigenen spielt CD74 auch eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung der Zellen des Immunsystems. Es überträgt dabei proinflammatorische Reize und fördert die Entwicklung, Reifung und das Überleben der exprimierenden Zelle [97].

1.3.2 Die Synthese und Assoziation mit MHC2

Die Transkription von *Cd74* wird über bestimmte Kontrollelemente reguliert. Dazu gehören ein NF- κ B abhängiges Element, eine TATA- und CCAAT-Box und weitere mit dem MHC2 Promotor kommunizierende Elemente [104]. Nach der Synthese und einer posttranslationalen Glyko- und Acetylierung bildet CD74 Homotrimeren [97, 105]. Als Chaperon von MHC2 fördert die invariante Kette (CD74) das Zusammenfügen und die Faltung der α - und β -Ketten des MHC2-Komplexes [106]. Dazu bildet ein Ii₃-Homotrimer mit jeweils drei α - und β -Ketten des MHC2-Komplexes einen ($\alpha\beta$ Ii)₃-Komplex [105, 107]. An der Interaktion zwischen Ii und dem MHC2-Komplex ist die CLIP Domäne von CD74 maßgeblich beteiligt. Bei der Bildung des ($\alpha\beta$ Ii)₃-Komplexes bindet CLIP an die Antigenbindungsstelle des MHC2, stabilisiert sie und das MHC2 und verhindert dadurch eine frühzeitige oder unspezifische Peptidbindung [101, 108–110]. CD74 steuert den Transport von MHC2 aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Endosomen [105, 111], wobei sowohl ein direkter Weg über das trans-Golgi Netzwerk als auch ein indirekter Weg über die Zelloberfläche beschrieben wurde [112]. In den Endosomen wird CD74 durch Cathepsin S schrittweise gespalten, sodass nur das CLIP in der Antigenbindungsstelle verbleibt [108, 113]. Das CLIP wird dann in einem durch HLA-DM katalysierten Prozess durch ein Antigen ausgetauscht [114], das danach auf der Zelloberfläche durch MHC2 präsentiert wird [112]. CD74-defiziente Mäuse verfügen über eine eingeschränkte Präsentation von MHC2 und Antigenen auf der Zelloberfläche, wodurch die Bedeutung von CD74 für diese Funktion belegt wird [115].

CD74 erfüllt daneben auch von MHC2 unabhängige Funktionen. Es bildet mit den Co-Rezeptoren CD44 oder CXCR4 einen Rezeptorkomplex für den proinflammatorischen und aktivierenden MIF und D-Dopachrom-Tautomerase (MIF-2) [116, 117]. MIF ist ein Regulator des angeborenen Immunsystems und induziert inflammatorische Prozesse. Er wird von verschiedenen Zellen und u. a. auch von Mikroglia ausgeschüttet [118]. Die Signalübertragung von MIF über CD74 aktiviert sowohl den ERK/MAP-Kinase Signalweg als auch den PI3K/Akt-Signalweg, die beide anti-apoptotisch wirken und die Zellproliferation und Zelldifferenzierung stärken [119].

Über CD74 werden in Makrophagen die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung von T-Zellen angeregt [120]. Durch die Aktivierung der Cyclooxygenase-2, eine verstärkte Produktion von Prostaglandin E2 und eine konsekutive Interaktion mit p53 werden in den Zellen die Apoptose gehemmt und das Wachstum gefördert [118].

Über die Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen, T- und B-Zellen werden die Reifung, Proliferation und Inflammation angeregt [120–123]. Außerdem werden die Einwanderung von peripheren Monozyten und T-Zellen und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen induziert [117, 124–126].

CD74 gehört zu den Proteinen der Regulated Intramembrane Proteolysis-Processed Protein Family (RIP) [127]. In den Endosomen wird die intrazelluläre Domäne von CD74 (ICD) abgespalten, was durch die Signalpeptid peptidase-like 2A (SPPL2a) katalysiert wird [97]. Eine Aktivierung des CD74-Rezeptorkomplexes verstärkt durch die endosomale Aufnahme des aktivierten CD74 und zusätzlich über den aktivierten PI3K Signalweg die Freisetzung von CD74-ICD [123]. ICD aktiviert unter Beteiligung verschiedener Co-Faktoren NF- κ B [122, 123, 128].

1.3.3 CD74 in Mikroglia und Pathologien des zentralen Nervensystems

Aktiviert und stark CD74 exprimierende Mikroglia werden in einem Zusammenhang mit verschiedenen Pathologien des zentralen Nervensystems beschrieben. Dabei bildet CD74 einen Aktivierungsmarker etwa bei der experimentellen und murinen diabetischen Retinopathie oder bei einer zerebralen Ischämie bei Mäusen [129, 130].

Die Aktivierung von CD74 durch MIF kann eine protektive Wirkung entfalten. Der Knockout von MIF führt bei einem ischämischen Schlaganfall bei Mäusen zu einer verstärkten neuronalen Schädigung [131]. Auch in den anfänglichen Stadien der AD kommt CD74 eine protektive Rolle zu. Es interagiert dabei mit dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) und supprimiert die Produktion von β -Amyloid [132]. Dagegen wird *CD74* besonders stark auch bei bereits erhöhten Ablagerungen von β -Amyloid mit verstärkter Neuroinflammation exprimiert

und könnte hier möglicherweise ein Treiber für die Inflammation und Degeneration in den späten Stadien der AD sein [132]. Eine solche gegensätzliche Rolle von CD74 wurde auch beim Krankheitsbild der MS beobachtet. Dabei wurden sowohl in präaktiven als auch in remyelinisierenden Läsionen aktive und CD74 positive Mikroglia gefunden [133]. Die Beobachtungen bei MS und AD weisen darauf hin, dass CD74 sowohl an schädlichen als auch an protektiven Mechanismen der Mikroglia beteiligt ist.

Eine Beteiligung von CD74 an der Neuroinflammation konnte auch bei den Progressen der MS und PD nachgewiesen werden. Dabei konnten in den inflammatorischen Mikroglia eine Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges und von NF- κ B festgestellt werden [2, 37]. Beide Signalwege können durch CD74 aktiviert werden [97]. Die Aktivierung von NF- κ B ist einer der wichtigen Mechanismen bei der Entstehung von Neuroinflammation und Neurodegeneration [134]. Bei der Untersuchung von DAMs in verschiedenen Krankheitsmodellen des ZNS konnte *Cd74* im Modell der schweren Neurodegeneration bei PD, MS und AD als verstärkt exprimiert identifiziert werden [68, 135, 136]. Im Alterungsprozess treten stark aktivierte Mikroglia auf, die verstärkt *Cd74* exprimieren, und bei denen die Aktivierung von CD74 maßgeblich an der Aktivierung der Mikroglia beteiligt ist [66].

1.4 Zielsetzung

Mikroglia und ihre Aktivierung spielen eine wichtige Rolle bei der Neuroinflammation und der Neurodegeneration. Studien konnten zeigen, dass aktivierte Mikroglia bei bestimmten Erkrankungen sowohl protektive als auch schädliche Effekte ausüben können. Als Beleg dafür wurde bei verschiedenen Erkrankungen eine verstärkte Expression von *CD74* beschrieben, die teilweise mit einem protektiven, häufig aber auch mit einem schädlichen Effekt verbunden ist. Ein besseres Verständnis der genauen Rolle der Mikroglia und der Expression von *CD74* könnte möglicherweise in der Zukunft zu therapeutischen Optionen durch eine mögliche Beeinflussung der Expression und Präsentation von *CD74* führen.

Dabei sind DAMs zunehmend ein Gegenstand der aktuellen Forschung. *CD74* zeigt sich in den DAMs als eines der verstärkt exprimierten Gene, wobei der TGF- β Signalweg vermindert exprimiert und aktiviert wird [56]. Zöller et al. konnten einen Zusammenhang zwischen einer verstärkten *CD74* Expression und einem verminderten TGF- β Signal herstellen [89].

In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Expression von *Cd74* durch Mikroglia charakterisiert und die Regulation durch das TGF- β Signal genauer betrachtet werden. Dabei werden die folgenden Fragestellungen verfolgt:

1. Wie wird die Expression von *Cd74* durch die Aktivierung von Mikroglia und durch TGF- β 1 reguliert? Dazu werden BV2 Zellen und primäre Mikrogliazellen mit LPS und TGF- β 1 behandelt und die Expression von *Cd74* durch qPCR und Western Blot analysiert.
2. Zeigt sich eine Dynamik bei der Expression der Splicing-Varianten p31 und p41 von *CD74* in aktivierten Mikroglia? Beeinflusst TGF- β 1 diese Dynamik? Dazu werden die Anteile von p31 und p41 am gesamten *CD74* nach der Behandlung der primären Mikroglia mit LPS und TGF- β 1 durch Western Blot untersucht.
3. Hat TGF- β 1 einen Einfluss auf die Oberflächenpräsentation von *CD74* durch die Mikroglia? Dazu werden Mikroglia in der Glia-Mischkultur mit LPS und TGF- β Inhibitor behandelt und im Rahmen einer Durchflusszytometrie analysiert.
4. Verändert sich die Oberflächenpräsentation von *CD74* durch Mikroglia in verschiedenen Entwicklungsstufen und unterscheidet sich die Präsentation gegenüber anderen myeloiden Zellpopulationen? Dazu werden murine Mikroglia und Peritonealmakrophagen *ex vivo* an den Tagen 7 und Tag 30 nach der Geburt isoliert und durch Durchflusszytometrie untersucht.
5. Welchen Effekt hat die Deletion des TGF- β Rezeptors in den Mikroglia *in vivo* auf deren *CD74* Expression? Dabei wurde mit der Mauslinie *Cx3cr1^{CreERT2}:R26-*

yfp,Tgfr2^{fl/fl} der Einfluss von TGF- β auf die Mikroglia *in vivo* untersucht. Dazu wurden die Hirnschnitte von Mäusen des Wildtyps mit Hirnschnitten von TGF- β Rezeptor 2 Knockout-Tieren mit einem Laser-Konfokal-Mikroskop untersucht und verglichen.

II. Material

2.1 Einwegmaterialien

Material	Hersteller (Katalognummer)
Coverslips	Thermo Fisher (CB00100RA120MNT0)
Menzel™ Deckgläschen	Thermo Fisher (11961988)
Hohlnadeln	b.braun (4657519)
Kryoröhrchen	Thermo Fisher (374510)
Kulturflaschen T-25	TPP (90026)
Kulturflaschen T-75	SPL Lifesciences (70075)
Multiplate™ 96-Well PCR Plates	Biorad (MLL9601)
Multiwell Platten, 6-, 12- und 24-Well	Greiner (657160/665180/662160)
Objektträger, Menzel-Gläser	Thermo Fisher (630-1985)
Parafilm	Pechiney (P7793-1EA)
PCR Plate Sealing Films	Biorad (MSB1001)
PVDF Membran	Biorad (10026933)
Rasierklingen	Carl Roth (CK07.1)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf (0030108051)
Röntgenfilme	Agfa HealthCare (Curix HT1.00G PLUS)
Tissue Tek O. C. T Compound	Sakura Finetek (4583)
Trans-Blot Turbo Transfer Stacks	Biorad (1704275)
Zellschaber	Falcon (734-0385)
Zentrifugenröhrchen, konisch, 15 ml	Falcon (734-0451)
Zentrifugenröhrchen, konisch, 50 ml	Falcon (734-0448)

2.2 Laborausrüstung

2.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Produktname
Durchflusszytometer	Beckmann Coulter	CytoFlex
Elektrophoresezelle	Biorad	Mini-Protean® Tetra Cell
Homogenisator	Kleinfeld	Potter-Elvehjem mit PTFE Pistill
Inkubator	ThermoFisher	HeraCell 240
Kryostat	Leica	CM 3050 S
Laser-Konfokal-Mikroskopsystem	Nikon	C1 Confocal und Eclipse E600 Mikroskop (Laser 405/488/543 nm)
Mikroplatten-Photometer	ThermoFisher	ThermoFisher™ Multiscan™ FC
Neubauer Zählkammer	Marienfeld	Neubauer Improved
Proxima ECL Detektor	Isogen	Proxima
RT-qPCR System	BioRad	CFX-Connect™ Real-Time PCR Detection System
Scanner	Genetics	FastGene® B/G Gelpic Box
Sicherheitswerkbank	Hera	Herasafe™
Sonicator	FAUST	Wasserbad mit Sonicator
Spektrometer	Eppendorf	BioSpectrometer basic
Spektrophotometer	Implen	NanoPhotometer® NP80
Thermocycler	Eppendorf	ThermoMixer C
Thermomixer	Eppendorf	Centrifuge 5804 R
Wackeltisch	Unitwist	Unitwist RT
WesternBlot Transfersystem	Biorad	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System
Zentrifuge	Eppendorf	Mastercycler Nexus

2.2.2 Software

Software	Entwickler	Version
CFXConnect™	Biorad	2.0
CytExpert	Beckmann Coulter	2.1
FlowJo™	Bd Bioscience	10
Image J	National Institute of Health	1.52e
Prism	GraphPad Software	8.4.2
InkScape	Inkscape	1.0rc1

2.3 Reagenzien & Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller (Katalognummer)
Aceton	Roth (9372.1)
Albumin aus Rinderserum (Puder)	Sigma (A9647)
Chloroform	J. T. Baker (7366)
Corn Oil	Sigma (T5648-1G)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)	Dianova (711-165-152, 715-545-151)
DMEM/F-12	Gibco (11320033)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth (3051.3)
Entwickler und Fixierer	Canon
Ethanol unvergällt, 98 %	Walter CMP (04119-505-062)
FBS (fetales Kälberserum)	PAN Biotech (P30-3306)
Guanidinhydrochlorid	Roth (0035.1)
HBSS+	Sigma (P2636)
HBSS-	Roth (9119.1)
Isopentan/2-Methylbutan	Sigma (C8267)
Isopropanol	Roth (9866.2)
Methanol	J. T. Baker (8045)
Mounting Medium, Antifade	Vectashield® (H-1000-10)
NGS (Normal Goat Serum)	Sigma (G9023)
Paraformaldehyd	Roth (0335.3)
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma (D8537)
Penicillin Streptomycin (1000 U/ml)	Gibco (15140)
Poly-L-Lysine hydrobromide	Gibco (14175)
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x	Cell Signaling (5872S)
Reducing Agent, 30x	New England Biolabs (B7705S)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (2326.2)
Tamoxifen	Invitrogen (00-4958-02)
Trichloressigsäure	Roth (3962)
Triton X-100	Sigma Aldrich (X100)
Trypsin-EDTA, 0,05 %	Gibco (25300)
Trypsin-EDTA, 0,25 %	Invitrogen (25200)
Wasser, Nuclease-frei, autoklaviert, DEPC-behandelt	Roth (T143)
Zucker	Rewe

2.4 Zellkultur

Medium	Bestandteil	Anteil (%)
Gefriermedium	DMEM/F-12	70
	Fetales Kälberserum	20
	DMSO	10
Mikrogliaedium	DMEM/F-12	89
	Fetales Kälberserum	10
	Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml)	1
Mikrogliaedium serumfrei	DMEM/F-12	99
	Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml)	1

2.5 Lösungen, Puffer und Gele

2.5.1 Angefertigte Puffer und Lösungen

Lösung	Bestandteile
Blocklösung für Immunhistochemie	10 % NGS 0,3 % Triton X100 In PBS
Blocklösung für Immuncytochemie	10 % NGS 0,1 % Triton X In PBS
BSA, 5 %	In TBS-T
Dissektionspuffer	1 % BSA 1 mM EDTA In HBSS
FACS Buffer	1 % FBS In PBS
Paraformaldehyd, 4 %	In PBS
Poly-L-Lysin, 0,01 %	In Wasser
TBS-T	1 % Tween 20 In TBS
TBS 10X	1,5 M NaCl 1 M Tris-HCL In H ₂ O _{dest.}

2.5.2 Gebrauchsfertige Puffer, Lösungen und Gele

Gebrauchsfertige Puffer, Lösungen und Gele	Hersteller (Katalognummer)
Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat	ThermoFisher (32109)
SDS Blue Loading Buffer 3X	NewEnglandBiolabs (B7703S)
Percoll®	Sigma (P1644)
Pierce™ RIPA Buffer	ThermoFisher(A89900)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Buffer	Biorad(10026938)
TriFast™	peqGOLD (30-2010)
Tris/Glycine/SDS Buffer	Biorad (1610772)
4-15 % MiniPROTEAN TGX Precast Gel	Biorad (4561086)

2.6 Proteine, Enzyme, Antigene und Inhibitoren

2.6.1 Antigene und rekombinante Proteine

Name	Quelle	Hersteller (Katalognummer)
LPS (Lipopolysaccharid)	<i>E. Coli</i> 026:B6	Sigma (L8274)
Recombinant human TGFβ-1	CHO-derived	Peprtech (100-21C)

2.6.2 Enzyme und Inhibitoren

Name	Hersteller
DNase 1	NewEnglandBiolabs (M0303S)
TGF-β R1 Kinase Inhibitor	Sigma Aldrich (616454)

2.7 Kits

Name	Hersteller
Luna® Universal One-Step RT-qPCR	New England Biolabs (E3005L)
Luna® Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs (M3003L)
Monarch® Total RNA Miniprep Kit	New England Biolabs (T2010S)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (23225)
Protoscript® II cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs (E6560)

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Hersteller (Katalognummer)
CD74	Rat	BD biosciences (555317)
IBA1	Rabbit	WAKO (019-19741)
MHC II	Rat	Santa Cruz (sc59318)
SMAD1/2/3	Mouse	Santa Cruz (sc-7960)
β-Actin	Rabbit	Cell Signaling (4970)

2.8.2 Sekundärantikörper und gekoppelte Antikörper

Ziel	Konjugat	Hersteller (Katalognummer)
Anti-Rat IgG	HRP	Abcam (ab97057)
Anti-Rabbit IgG	HRP	Cell Signaling (7074S)
Anti-Rat IgG	Alexa Fluor [®] 488	Abcam (150157)
Anti-Rabbit IgG	Alexa Fluor [®] 594	Abcam (150080)
Isolectin B4	Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen (121411)

2.8.3 FACS-Antikörper

Antigen	Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller (Katalognummer)
CD74 (CLIP)	Alexa Fluor [®] 647	Biologend (151004)
F4/80	Alexa Fluor [®] 488	Biorad (MCA497A488)
TruStain fcX [™] (CD16/32)	-	Biologend (101320)

2.9 Primer

Gen	Sequenz	Hersteller
CD74		Eurofins Genomics
Forward	5'-CCGCCTAGACAAGCTGACC-3'	
Reverse	5'-ACAGGTTTGGCAGATTTTCGGA-3'	
GAPDH		Eurofins Genomics
Forward	5`- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	
reverse	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	

III. Versuchstiere und Zelllinien

3.1 Übersicht zu den Zell- und Mauslinien

Name	Quelle
NMRI	Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France)
Cx3cr1 ^{CreERT2} ;R26-yfp,Tgfb ^{fl/fl}	Anatomisches Institut der Universität Rostock
BV2	Anatomisches Institut der Universität Rostock

3.2 BV2-Zellreihe

Die murine BV2-Zelllinie stammt aus primären und neonatalen Mikroglia, die im Jahre 1990 durch einen raf/myc-Transfer mittels Retrovirus (J2) immortalisiert wurden [137]. Sie sind wegen ihrer Ähnlichkeit von vielen ihrer morphologischen, funktionellen und phänotypischen Merkmale mit denen von primären Mikroglia ein geeigneter Substituent für primäre Mikroglia [138].

3.3 Primäre Mikroglia

Für *in vitro* Untersuchungen von primären Mikroglia und eine *ex vivo* Analyse von Mikroglia und Peritonealmakrophagen wurden NMRI Mäuse verwendet. Die Mäuse stammten von Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Der Zugang zu Wasser und Nahrung war unbegrenzt. Die Mäuse wurden bei 22 °C ± 2 °C in einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden gehalten. Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den ethischen Richtlinien der Universität Rostock durchgeführt. Die Prozeduren wurden vom Tierexperimentellen Komitee der Universität Rostock und vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (7221.3-1-064/18) genehmigt.

3.4 TGF-β Rezeptor 2 defiziente Mäuse

Zöller et al. publizierten die Rekombination von Mauslinien für eine postnatale Deletion des TGF-β Rezeptors 2 (TGF-β R2) [89]. Die Mauslinie Cx3cr1^{CreERT2} enthält eine für den LoxP-Lokus spezifische Cre-Rekombinase (Cre), die wiederum mit einer mutierten Variante des humanen Östrogenrezeptors (ERT) fusioniert ist. Die mutierte Variante ist wenig sensitiv für endogenes Östradiol, allerdings stark sensitiv für Tamoxifen. Die CreERT-Rekombinase liegt im Zytosol gebunden an das Hitzeschockprotein (HSP) vor. Eine Induktion durch Tamoxifen führt zu einer Ablösung der CreERT vom HSP. Danach transloziert die Rekombinase in den Nukleus und schneidet die von LoxP flankierte DNA-Sequenz aus [139]. Die Expression von CreERT wird durch den Promotor für Cx3cr1 induziert und ist dann in den Mikroglia und

weiteren Monozyten und Lymphozyten aktiv. Da sich die Mikroglia postnatal aus der bestehenden Population erneuern, kann hier die Deletion des TGF- β R2 stabil gehalten werden. Die defizienten Monozyten und Lymphozyten werden fortlaufend von den Progenitorzellen im Knochenmark erneuert. Da die Progenitorzellen vor der Ausreifung Cx3cr1-negativ sind, sind sie vom Knock-out nicht betroffen [140, 141], wodurch ein für die Mikroglia spezifischer Knock-out erreicht werden kann.

Die spezifische zu deletierende Sequenz wurde über eine TGF- β R2 Flox-Mauslinie eingebracht. In dieser Mauslinie enthält die loxP flankierte Sequenz die Exons 2 und 3 des TGF- β R2 Gens (Abbildung 4, oben) [142]. Zur Bestätigung der Rekombination wurde die Rosa26R-eYfp-Mauslinie verkreuzt (Abbildung 4, unten). Das enhanced yellow fluorescent protein (eYfp) ist ein Fluoreszenzprotein, dessen Gen in den Rosa26 Lokus des murinen Genoms eingebracht wurde. Vor dem eYFP-Gen ist eine von LoxP flankierte Stop-Sequenz inseriert, die durch eine erfolgreiche Aktivierung der CreERT-Rekombinase deletiert wird. Danach wird eYFP als Reporter produziert [143]. Aus der Kombination der beiden Mauslinien ergibt sich dadurch die in der vorliegenden Studie verwendete Mauslinie $Cx3cr1^{CreERT2};Tgfbr2^{fl/fl};Rosa26^{YFP}$.

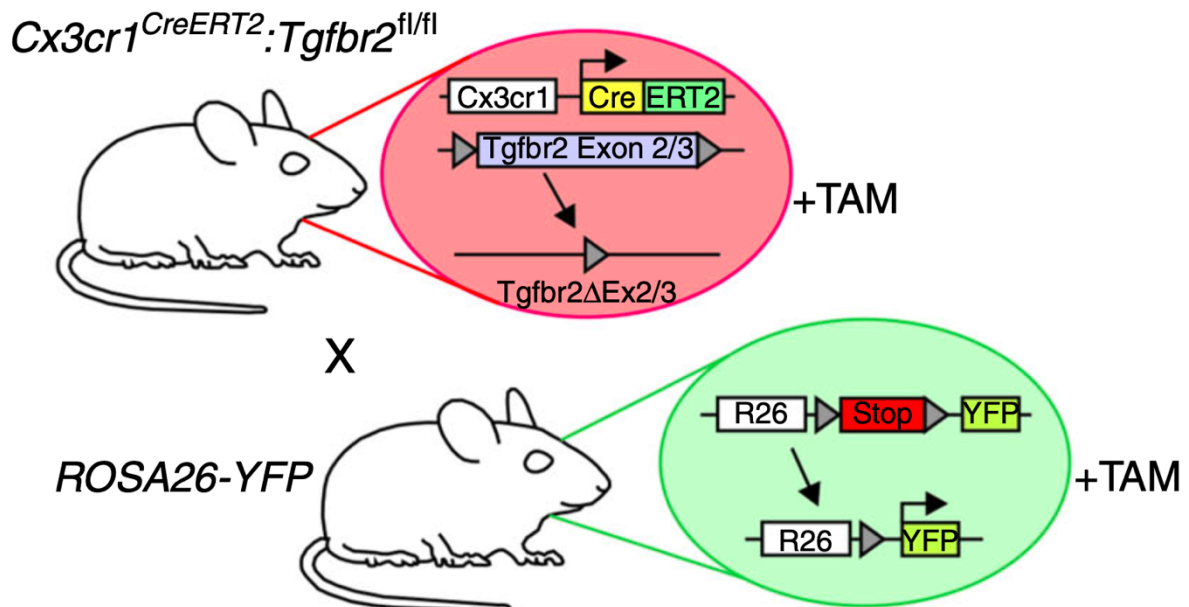


Abbildung 4: Konstruktion der Mauslinie $Cx3cr1^{CreERT2};R26-yfp,Tgfbr2^{fl/fl}$ [89].

Alle an Tieren vorgenommenen Prozeduren entsprachen den nationalen und internationalen Ethikrichtlinien für Tiere. Es erfolgte eine tierschutzrechtliche Genehmigung durch die örtliche Behörde unter der Nummer (7221.3-1-064/18) (einschließlich einer Ausnahmegenehmigung).

Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 22 °C und in einem 12 Stunden Tag-Nacht Zyklus gehalten. Dabei war der Zugang zu Wasser und Futter jederzeit gewährleistet.

IV. Methoden

4.1 BV2 Zellreihe

4.1.1 Kultivierung

Die Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank statt. Die BV2 Zellen wurden bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Gefriermedium gelagert. Nach Bedarf erfolgte das Auftauen der Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad. Die erwärmte Zellsuspension wurde 10 Minuten bei $1000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand wurde dann verworfen. Nach einer Resuspendierung in einem serumhaltigen Medium wurden die Zellen in T-75 Kulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte in einem Mikroglia-Medium in einem Inkubator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit.

4.1.2 Passage

Zwei bis drei Tage nach der Kultivierung in der T-75 Kulturflasche erreichten die BV2 Zellen regelhaft Konfluenz. Zur Mobilisierung wurde den zuvor zweimal in PBS gewaschenen BV2 Zellen 4 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) zugesetzt. Nach 15 Minuten waren die Zellen vollständig gelöst. Durch die Zugabe von Mikroglia-Medium wurde die Lyse unterbrochen. Die Zellsuspension wurde abgenommen und für 10 Minuten bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde nach einer Resuspendierung und einer erneuten Zentrifugation gewaschen und dann in PBS resuspendiert. Für die Behandlung wurden die Zellen nach einer Bestimmung der Zellkonzentration in der Zählkammer mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro cm^2 in 6-Well Platten ausgesiedelt. Zusätzlich wurden pro Passage 10^6 Zellen in eine T-75 Kulturflasche ausgesiedelt, um einen erneuten Kultivierungszyklus beginnen zu können.

4.1.3 Behandlung

Die Behandlung erfolgte nach 24-48 Stunden, wenn die BV2 Zellen in den 6-Well-Platten Konfluenz erreicht hatten. Nach der Abnahme des Mediums wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurde serumfreies Medium zugegeben. Nach 2 Stunden im serumfreien Medium erfolgte die Behandlung durch eine Zugabe nach dem folgenden Schema:

Ansatz	Substanz [Konzentration]
1	Kontrolle
2	TGF- β 1 [5 ng/ml]
3	Lipopolysaccharid [1 ng/ml]
4	TGF- β 1 [5 ng/ml] & Lipopolysaccharid [1 ng/ml]

4.1.4 Expressionsanalytik

4.1.4.1 RNA Isolation

Die RNA wurde aus den BV2 Zellen mittels Trifast™ gewonnen. Zentrifugiert wurde bis auf erwähnte Ausnahmen bei 12000 x g und 4 °C.

Die nach dem Schema von 4.1.3 behandelten Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und anschließend wurde 1 ml Trifast™ zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schwenker wurde das Homogenisat in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Durch ein wiederholtes Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde eine Durchmischung erreicht. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Durch eine anschließende Zentrifugation von 15 Minuten wurde das Gemisch aufgetrennt. Die die RNA enthaltende obere Phase wurde entnommen, ohne die gebildete Interphase mit aufzunehmen. Anschließend erfolgte eine Präzipitation der RNA durch die Zugabe von 0.5 ml Isopropanol. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde durch Mischen auf dem Vortex und wiederholtes Zentrifugieren in 75%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Pellet wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 80 µl RNase-freiem Wasser und bei kurzer Erwärmung auf 50 °C gelöst.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Photometer. Im Schnitt wurden RNA-Konzentrationen von 300-900 ng/µl erreicht. Die Reinheit wurde anhand der Adsorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dabei wurden bei $A_{260/280}$ Werte von 1,975 bis 2,110 erreicht, weshalb ein qualitativ hochwertiger RNA Extrakt angenommen wurde. Die Proben wurden weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

4.1.4.2 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mittels NEB ProtoScript® 2 in cDNA umgeschrieben. Der verwendete Kit beruht auf einer von RNA abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase). Dabei wurden die unten angegebenen Ansätze verwendet und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht:

Bestandteil	Menge
RNA	1 µg
d(T)23VN (50 µM)	2 µl
ProtoScript 2 Reaction Mix (10x)	10 µl
ProtoScript 2 Enzyme Mix (2x)	2 µl

Durch einen Austausch des Enzym-Mix gegen Nuklease-freies Wasser wurden Negativkontrollen (NRT) angesetzt. Die Inkubation erfolgte im Thermocycler nach dem folgenden Schema:

Schritt	Temperatur	Dauer (in Minuten)
1. Reaktionstemperatur	42 °C	60
2. Deaktivierung des Enzyms	80 °C	5

Die synthetisierte cDNA wurde danach mit einer qPCR analysiert oder bei -20 °C gelagert.

4.1.4.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die quantitative Analyse der Expression von CD74 und GAPDH in den Mikrogliazellen wurde mit einer RT-qPCR durchgeführt, wofür der NEB Luna[®] qPCR Master Mix verwendet wurde. Dabei konnte mit dem SYBR Green I Farbstoff über ein Fluoreszenzsignal die Menge an PCR-Produkt in Echtzeit ermittelt werden. Dabei SYBR Green I handelt es sich um eine interkalierende Substanz, die sich die in die doppelsträngige DNA einlagert. Dabei kommt es zu einer typischen Fluoreszenz, die durch das CFX Connect[™] Real-Time PCR Detection System gemessen wurde. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz die natürliche Hintergrundstrahlung übertrifft, bezieht sich nach der Definition auf den C_T.

Die Reaktionsansätze wurden nach dem folgenden Schema in technischen Duplikaten hergestellt.

Substanz	Menge (in µl)
Luna Universal qPCR Master Mix	10
Primer forward (GAPDH/CD74)	0,5 (entspricht 5 pmol)
Primer reverse (GAPDH/CD74)	0,5 (entspricht 5 pmol)
Reaction Mix	2
cDNA Produkt	2
H ₂ O	5

Für die NRT-Kontrolle wurde nach einem Austausch des Reaktions-Mix gegen Wasser ein GAPDH Primer verwendet. Die qPCR wurde im CFX ThermoConnect durchgeführt. Das Temperaturprotokoll wurde nach den Herstellervorgaben anhand des folgenden Schemas durchlaufen.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (in Sekunden)
Initiale Denaturierung	95	60
Denaturierung	95	15
Extension → 40 Wiederholungen	65	30
Schmelzkurvenbestimmung	60 → 90 (0,5 °C Schritte)	5 / Schritt

4.1.4.4 Auswertung

Für die Analyse wurde nach Livak et al. die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode verwendet [144]. Dabei wurde mit der CFXConnect™ Software für jeden Ansatz der C_T -Wert als Mittelwert der technischen Duplikate ermittelt. Für jede Behandlungsgruppe wurde dann der Wert ΔC_T berechnet, der der Differenz der RNA-Menge des Zielgens CD74 und der endogenen Kontrolle GAPDH entspricht:

$$\Delta C_T = C_{T(CD74)} - C_{T(GAPDH)}$$

Danach wurde für jede Gruppe der Wert $\Delta\Delta C_T$ ermittelt. Dabei wurde vom ΔC_T der jeweils behandelten Gruppen der ΔC_T der unbehandelten Kontrolle subtrahiert:

$$\Delta\Delta C_{T(Behandlung\ x)} = \Delta C_{T(Behandlung\ x)} - \Delta C_{T(Kontrolle)}$$

Danach wurde die relative Expression von CD74 einer behandelten Gruppe gegenüber der unbehandelten Kontrolle berechnet:

$$Relative\ Expression\ CD74_{Behandlung\ x} = 2^{-\Delta\Delta C_{T(Behandlung\ x)}}$$

Durch die Multiplikation mit 100 konnte die relative Expression in % angegeben werden, wobei die Kontrolle mit 100 % gleichgesetzt wurde.

4.1.5 Proteinanalytik

Die Proteinanalytik wurde wie im Abschnitt 4.2.4 durchgeführt. Bei den BV2 Zellen wurde das Vorgehen bei der Immundetektion modifiziert. Die PVDF Membran wurde für 12 Stunden mit Primärantikörpern gegen CD74 (bd bioscience, 1:500 in 5 % BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für je 15 Minuten erfolgte die Behandlung mit dem entsprechenden mit HRP gekoppelten Sekundärantikörper (1:10000 in 5 % BSA). Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS-T für je 15 Minuten wurde unter Rotlicht ECL-Substrat auf die Membran gegeben, die dann zwischen zwei transparente Folien eingebettet wurde. Danach wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und in Abhängigkeit von der Signalintensität wurde für einen Zeitraum von 10 Sekunden bis 20 Minuten belichtet. Danach wurden die Entwicklung und Fixierung durchgeführt. Der gesamte Vorgang wurde nach einem erneuten Blocken der Membran mit Primärantikörpern gegen β -Actin (Cell Signaling, 1:1500 in 5 % BSA) wiederholt. Die Digitalisierung erfolgte mit einer Gel Picture Box und die anschließende Analyse wurde mit ImageJ durchgeführt.

4.2 Primäre Mikroglia

4.2.1 Zellkultur, Präparation und Passage

Die Präparation der Mikroglia aus den Hirnen von Mäusen wurde am Tag oder Folgetag ihrer Geburt durchgeführt (P0/P1). Nach der Tötung der Mäuse durch Dekapitation wurden die Schädel in 4 °C kaltes, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltiges HBSS überführt. Unter dem Binokular wurden dann die Haut, der Schädelknochen, die Meningen und Gefäße manuell mit der Pinzette entfernt. Danach wurden die Hirne in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem HBSS gewaschen und in einem Gemisch aus 2 ml Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem HBSS und 1 ml 0,25%igem Trypsin-EDTA für 10 Minuten bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde durch die Zugabe von DMEM F/12 unterbrochen. Dem Gemisch wurde dann DNase I in einer Konzentration von 0,1 mg/ml zugesetzt. Die weitere Dissoziation des Gewebes erfolgte durch die Scherkräfte beim Pipettieren mit Pipettenspitzen eines sinkenden Durchmessers. Danach wurden grobe Gewebeteile durch eine Zentrifugation für 1 Minute bei 20 x g abgetrennt. Der Überstand wurde für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, das Pellet wurde in Mikrogliaedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt, die vorher mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet wurden. Dazu wurde 0,01%ige Poly-L-Lysin-Lösung für 2 Stunden bei 37 °C in die Kulturflaschen gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Kulturflaschen weiterverwendet. Die Aussaat erfolgte mit einer Dichte von drei Hirnen pro T-75 Kulturflasche oder einem Hirn pro T-25 Kulturflasche. Die primären Mikroglia wurden bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde an den Tagen 1 und Tag 2 nach der Präparation durch frisches Medium ausgetauscht. Nach 10 bis

12 Tagen hatte sich in der Flasche ein stabiler Astrozytenrasen gebildet, wobei die Mikroglia adhären auf diesem Rasen wuchsen. Nach 15 Minuten auf dem Schüttler bei 80 RPM wurden sie gelöst und anschließend entnommen.

10 µl dieser Suspension wurden dazu verwendet, um mittels der „Neubauer improved Zählkammer“ die Zellzahl zu ermitteln.

4.2.2 Immunzytochemie (ICC)

Die Mikroglia wurden nach dem im Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Verfahren aus der Mischkultur isoliert und mit einer Dichte von 10^4 Zellen pro cm^2 auf Deckgläser in 24-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Wells wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann wurde serumfreies Kulturmedium zugegeben. Nach 2 Stunden wurde die weitere Behandlung dann nach den Ansätzen in der folgenden Tabelle durchgeführt. Dafür wurde der TGF- β R1 Kinase Inhibitor (T β RI) in DMSO gelöst. Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurde allen Ansätzen DMSO in der äquivalenten Konzentration zugegeben.

Ansatz	Substanz [Konzentration]
1	DMSO [0,42 µl/ml]
2	TGF- β 1 [5 ng/ml] DMSO [0,42 µl/ml]
3	TGF- β R1 Kinase Inhibitor [1 mM] DMSO [0,42 µl/ml]
4	TGF- β 1 [5 ng/ml] TGF- β R1 Kinase Inhibitor [1 mM] DMSO [0,42 µl/ml]

Danach wurde das Medium entnommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 15 Minuten in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert. Nach einem erneuten Waschen wurden die Zellen für eine Stunde in Block-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 4 °C mit Smad1/2/3 Antikörper (Santa Cruz, Rabbit, 1:100 in Blocklösung) behandelt. Danach erfolgte nach einem dreimaligen Waschen mit PBS für je 15 Minuten eine Behandlung mit sekundären Antikörpern (Abcam, anti-rabbit, Alexa Fluor 594, 1:500 in Blocklösung) und Isolectin B4 (Invitrogen, 1:500 in Blocklösung) für 60 Minuten. Abschließend

wurde DAPI (Dianova, 1:10000 in PBS) zugegeben und die Deckgläschen wurden nach 10 Minuten zweimal mit PBS und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Fixierung auf Objektträger erfolgte mit dem Mounting Medium.

Mit einem Laser-Konfokal-Mikroskopsystems konnten die Zellen visualisiert werden, wobei Z-Stacks mit einer Schichtdicke von 0,5 µm und einer Gesamtdicke von 4 µm erstellt und mit der ImageJ-Software analysiert wurden.

4.2.3 RNA-Expressionsanalytik

4.2.3.1 Behandlung

Vor der Behandlung wurden die Zellen für zwei Stunden unbehandelt in serumfreiem Medium inkubiert. Für die Genom- und Proteomanalysen wurden danach die folgenden Behandlungsschemata verwendet:

Ansatz	Substanz (Konzentration)	Medium/Kultur	Dauer
1a	Kontrolle	Primäre Mikrogliia, Monokultur/Serumfreies Mikrogliaedium	6 und 24 Stunden
1b	TGF-β1 (5 ng/ml)		
1c	LPS (1ng/ml)		
1d	TGF-β (s. o.), Lipopolysaccharid (s. o.)		
2a	DMSO (0,42 µl/ml)	Gliä- Mischkultur/Mikrogliaemed ium	24 Stunden
2b	TGF-β R1 Kinase Inhibitor IV (1 mM) DMSO (0,42 µl/ml)		
2c	LPS (1 ng/ml) DMSO (0,42 µl/ml)		

4.2.3.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte durch eine Kombination der Phenol-Chloroform-Extraktion mittels PeqGold Trifast™ und der Verwendung von Silizium-beschichteten Säulen des NEB Monarch® Total RNA Miniprep Kits.

Dazu wurde das Medium in den 6-Well Platten abgenommen und die Mikroglia-Kultur wurde zweimal mit PBS gespült. Danach erfolgte eine Homogenisierung durch die Zugabe von 0,5 ml Trifast™. Eine vollständige Lösung der Mikroglia wurde durch ein manuelles Abtragen mit dem Zellschaber erreicht. Die in Kulturflaschen behandelten Zellen wurden auf dem Schüttler bei 80 RPM für 15 Minuten gelöst und dann abgenommen. Nach der Zentrifugation für 5

Minuten bei 2500 x g wurde das Pellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 0,5 ml Trifast™ zugegeben.

Die homogenisierten Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,1 ml Chloroform zugegeben. Nach behutsamem Invertieren wurde der Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde er für 15 Minuten bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere, die RNA enthaltende Phase wurde vorsichtig entnommen und mit dem NEB Monarch® Total RNA Miniprep Kit aufgearbeitet. Die folgenden Zentrifugationsschritte wurden jeweils für 30 Sekunden bei 16000 x g und 4 °C durchgeführt. Die entnommene die RNA enthaltende Phase wurde im Verhältnis 1:1 mit 98%igem Ethanol vermischt und auf eine Monarch® RNA Purification Column gegeben. Nach der Zentrifugation haftete die RNA an der Membran der Purification Column. Der Durchfluss wurde verworfen.

Durch eine Zentrifugation der Säule mit Monarch® RNA Wash Buffer wurde die RNA gewaschen und anschließend wurde DNase I auf den Filter gegeben, wodurch die verbliebene gDNA verdaut werden konnte. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch eine einmalige Zugabe von Monarch® RNA Priming Buffer und eine zweimalige Zugabe von Wash Buffer gewaschen und danach jeweils zentrifugiert. Abschließend wurde die Probe für zwei Minuten zentrifugiert, um eine vollständige Entfernung des Wash Buffers zu ermöglichen.

Die Säule wurde danach mit 40 µl Nuclease-freiem Wasser benetzt und durch eine Zentrifugation wurde die jetzt in Wasser gelöste RNA ausgewaschen und dann in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Konzentration und die Reinheit der Proben wurde mit einem NanoPhotometer® gemessen. Die Konzentration der RNA wurde durch die bei 260 nm gemessene Absorption ermittelt und lag bei 10-50 ng/µl. Die Reinheit wurde mit den Absorptionswerten bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) ermittelt. Dabei wurde regulär eine $A_{260/280}$ -Ratio von 1,975-2,11 erreicht, so dass die RNA in diesem Rahmen als rein befunden wurden. Die Proben wurden weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

4.2.3.3 Real Time – qPCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR der primären Mikroglia wurde mit dem NEB Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. In die Ansätze wurden jeweils gleiche Mengen RNA pipettiert. Der Mastermix enthält Reverse Transkriptase, die die RNA zu Beginn der RT-qPCR RNA in cDNA umschreibt. Danach erfolgte die Vervielfältigung. Die Zusammensetzung eines Ansatzes orientierte sich am folgenden Schema:

Substanz	Menge
Luna OneStep qPCR Master Mix	10 µl
Primer forward	0,8 µl (entspricht 8 pmol)
Primer reverse	0,8 µl (entspricht 8 pmol)
Luna Warm Start RT Enzyme Mix	1 µl
Isolierte mRNA	Variabel, bis 150 ng
Nuklease-freies Wasser	bis 20 µl pro Ansatz erreicht sind

Zusätzlich wurden NRT-Kontrollen mit dem Primer GAPDH angesetzt, um eine Kontamination mit gDNA ausschließen zu können. Diese Ansätze enthielten Wasser anstatt Reverser Transkriptase.

Die PCR erfolgte im CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System nach dem folgenden Zyklus:

Schritt	Temperatur	Dauer
cDNA-Synthese	55 °C	10 Minuten
Initial Denaturierung	95 °C	60 Sekunden
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden.
Extension	60 °C	30 Sekunden
→ 40x Wiederholungen		
Schmelzkurvenbestimmung	60 °C → 90 °C (0,5 °C Schrittfolge)	Sekunden pro Schritt

Die Analyse wurde danach so durchgeführt, wie es im Abschnitt 4.1.4.4 beschrieben wurde

4.2.4 Proteinanalytik

4.2.4.1 Proteinisolation

Die Isolation wurde mit einem Lysegemisch aus gebrauchsfertigem Pierce® RIPA Lysis and Extraction Buffer und Protease Inhibitor Cocktail durchgeführt. Bei den Experimentansätzen in der Monokultur (siehe 4.2.1) erfolgte die Isolation direkt in den Well-Platten: Das Medium wurde entnommen und nach dreimaligem Waschen mit 4 °C kaltem PBS wurden 150 µl des Lysegemisches in jedes Well gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 4 °C wurde der Boden

mit dem Zellschaber ausgekratzt und das Gemisch wurde dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Die Mikroglia aus den Ansätzen in der Mischkultur (siehe 4.2.1) wurden bei 80 RPM auf dem Schüttler für 15 Minuten aus der Mischkultur gelöst und danach entnommen. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 2500 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde in PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das PBS verworfen und das Pellet wurde in 100 µl des Lysegemisches gelöst.

Die Proben aus beiden Ansätzen wurden dann für weitere 10 Minuten bei 4 °C auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurden die Proben für dreimal 30 Sekunden im Wasserbecken mit Ultraschall behandelt, um eine bestmögliche Lösung der Proteine zu gewährleisten.

Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C für 15 Minuten. Der proteinreiche Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß dekantiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.4.2 Quantitative Analyse

Die quantitative Analyse der isolierten Proteinmengen wurde mit dem Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinsynthese erfolgte über eine zweischrittige Reaktion. In einer alkalischen Lösung wurden dabei Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen reduziert, die danach einen Komplex mit Bicinchoninsäure bildeten (BCA). Dieser Komplex hat eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Stärke der Absorption wurde mit einem Fotospektrometer gemessen und anhand einer an den FBS Standard ermittelten Standardkurve wurden die Ergebnisse in die Proteinkonzentration umgerechnet [145].

4.2.4.3 SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente dazu, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Für jede Probe wurde eine einheitliche Menge von Protein in SDS Loading Buffer gelöst. Die Proteine wurden danach bei 85 °C für 15 Minuten in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur denaturiert. Das anionische Tensid SDS bindet gleichmäßig an die Proteine, wodurch ein konstantes Verhältnis zwischen Ladung und Masse der Proteine erreicht wurde. Dadurch können die Proteine bei der Gelelektrophorese durch das Anlegen einer Spannung ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Ein zusätzlich aufgetragener Proteinstandard ermöglichte dabei die Größenzuordnung der Proteine in kDa.

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte in der Bio Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Es wurden 4-15 % Mini-PROTEAN® TGX Precast Gels verwendet. Nach dem Transfer

der Proben in die Gel-Taschen erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 120 Volt für 5 Minuten und anschließend 85 Volt für 60 Minuten bei variabler Stromstärke.

4.2.4.4 Western Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen, wofür das Bio-Rad TransBlot® Turbo™ System verwendet wurde. Die Membran wurde vor dem Transfer in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer gewaschen. Die Transfer Stacks wurden in Transferpuffer äquilibriert. Die Komponenten wurden nach der folgenden Reihenfolge von unten nach oben geschichtet: Anode, Transferstack, Membran, Gel, Transferstack, Kathode. Lufteinschlüsse wurden mit einem Roller entfernt. Der Transfer erfolgte für 7 Minuten bei 2,5 Ampere und maximal 25 Volt. Abschließend wurde die Membran entnommen, für 2 Minuten in Methanol belassen und danach in TBS-T gegeben.

4.2.4.5 Immundetektion

Die Membran wurde 90 Minuten in BSA (5 % in TBS-T, w/v) geblockt. Danach erfolgte die Behandlung mit Primärantikörpern gegen CD74 (bd bioscience, 1:200 in 5%igem BSA) über Nacht. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für jeweils 15 Minuten wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:8000 in 5%igem BSA, siehe 2.8.2) für 90 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte eine Visualisierung der Proteine durch die Zugabe von ECL-Reagenz und eine digitale Detektion der Fluoreszenz im Proxima® Detektor. Danach wurde die Membran für 90 Minuten geblockt und nach dreimaligem Waschen für je 15 Minuten mit einem Primärantikörper gegen β -Actin (Cell Signaling, 1:1000 in 5%igem BSA) und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:8000 in 5%igem BSA, siehe 2.8.2) behandelt. Nach erneutem Waschen erfolgte eine Visualisierung mit ECL und dem Proxima® Detektor. Die ermittelten Signale von CD74 und den an β -Actin gebundenen Antikörpern wurden mit der Software ImageJ densitometrisch analysiert und semiquantitativ verglichen.

4.2.5 Durchflusszytometrie von *in vitro* Zellen

Die primären Mikrogliazellen aus der Mischkultur wurden 12-14 Tage nach der Präparation behandelt. Die Behandlung erfolgte in der T-25 Kulturflasche an den Tagen 3, 5 und 7.

Ansatz	Substanz (Konzentration)
1	DMSO (0,42 µl/ml)
2	TGF-β R1 Kinase Inhibitor IV (1 mM), DMSO (0,42 µl/ml),
3	LPS (1 ng/ml), DMSO (0,42 µl/ml)

Nach der Behandlung wurden die Mikroglia bei 85 RPM auf dem Schüttler für 15 Minuten vom Astrozytenrasen gelöst und danach wurden sie mit dem Medium entnommen. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 x g wurde das Medium verworfen und das entstandene Pellet wurde in 200 µl FACS Buffer resuspendiert. Die Probe wurde dann zu je 100 µl auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach der Zugabe von 5 µl TruStain Block Antikörper wurde jede Probe für 10 Minuten inkubiert. Eine Probe wurde als Kontrolle ungefärbt gelassen, während der zweiten Probe 4 µl F4/80 Antikörper (Bio-Rad, Alexa Fluor 488) und 3 µl CD74 (CLIP) Antikörper (biolegend, Alexa Fluor 647) zugesetzt wurden. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4 °C wurden die Proben gewaschen. Dafür wurden jeder Probe 500 µl FACS Buffer hinzugefügt und nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 x g wieder abgenommen. Danach wurde der Messvorgang im Durchflusszytometer durchgeführt. Für die Analyse wurde die Software FlowJo™ verwendet.

4.2.6 Durchflusszytometrie von *ex vivo* Zellen

NMRI Mäuse im Alter von 7 und 30 Tagen (P7/P30) wurden durch eine zervikale Dislokation getötet und mit 20 ml 4 °C kaltem PBS perfundiert.

4.2.6.1 Isolation von Mikroglia mittels Percoll®

Zur Vorbereitung des Verfahrens wurde eine Stammlösung aus 90%igem Percoll® und 10%igem PBS X10 vorbereitet. Aus dieser Stammlösung wurden nach dem unten angegebenen Schema verschiedene Verdünnungsstufen erstellt.

Das Hirn wurde präpariert, mit einer Klinge zerkleinert und mit Dissektionspuffer in einen Glashomogenisator gegeben. Durch eine langsame Bewegung des Pistills wurde eine charakteristische Strömung zwischen Pistill und Gefäßwand erzeugt. Diese Strömung und die damit einhergehenden Scherkräfte sorgten für einen Aufschluss des Gewebes. Der entstandene zellreiche Dissektionspuffer wurde gesammelt und mehrmals durch frischen Puffer ersetzt. So konnte das Hirn in mehreren Durchgängen gelöst werden.

Die gewonnene Zellsuspension wurde für 12 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der die Mikroglia enthaltende Überstand wurde in 5 ml 37%ige Percoll-Lösung gegeben. Mit einer

Hohlnadel wurde das Gemisch mit 30%iger Percoll-Lösung über- und mit 70%iger Percoll-Lösung unterschichtet. Danach wurde eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 700 x g und 4 °C durchgeführt. Die Mikroglia befanden sich anschließend als feiner Ring angeordnet in der Grenzschicht zwischen der 30%igen und der 37% Percoll-Lösung. Sie wurden aspiriert und in FACS-Buffer gegeben.

Lösung	Stammlösung (ml)	PBS (ml)
30 %	2,55	5,95
37 %	3,89	6,62 + Gel Red
70 %	7,35	3,15

4.2.6.2 Isolierung von Peritonealmakrophagen

In den Peritonealraum der Mäuse wurde 4 °C kaltes PBS infundiert. Der Bauch wurde danach durch einen Fingerschlag abgeklopft. Die Suspension wurde mit der Hohlnadel entnommen und zu gleichen Teilen in FACS Buffer gegeben.

4.2.6.3 Immunfärbung

Das Protokoll für die Immunfärbung entspricht dem im Abschnitt 4.2.5 beschriebenen Verfahren.

4.2.7 Immunhistochemie (IHC)

4.2.7.1 Deletion des TGF- β Rezeptors 2

Nach der in der Arbeitsgruppe etablierten Technik wurden den $Cx3cr1^{CreERT2};R26-YFP/Tgfr2^{fl/fl}$ Mäusen an den Tagen 5 und 7 nach der Geburt jeweils 0,2 mg Tamoxifen in 10 μ l Corn Oil intraperitoneal appliziert. Die erfolgreiche Aktivierung von CreERT wurde durch eine Genotypisierung von Biopsien der Schwanzspitzen ermittelt [89]. Mäuse ohne Cre Rekombinaseaktivität wurden als Wildtyp-Kontrolle verwendet.

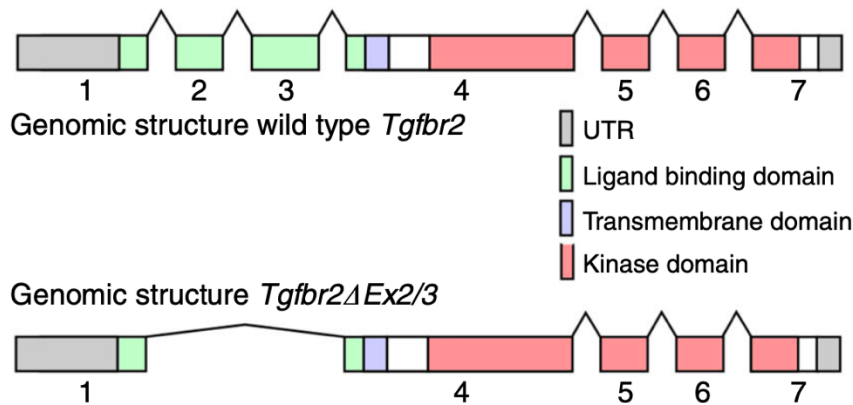


Abbildung 5: Das TGF- β R2 Gen vor (oben) und nach (unten) der Deletion durch ein durch Tamoxifen aktiviertes CreERT.

4.2.7.2 Hirnentnahme

Die Mäuse wurden am 14. postnatalen Tag (p14) tief sediert, durch eine zervikale Dislokation getötet und danach mit 10 ml eiskaltem PBS perfundiert. Anschließend wurde eine Perfusion mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) durchgeführt. Das Hirn wurde aus dem Schädel entnommen und die Meningen und Gefäße wurden entfernt. Danach wurde das Hirn für 24 Stunden bei 4 °C in 4%igem PFA inkubiert. Im Anschluss daran wurde es in eine 30%ige Saccharose-Lösung für 24 Stunden bei 4 °C überführt. Abschließend wurde das Hirn in Isopentan bei -50 °C gefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.7.3 Immunfärbung

Die Hirne wurden in TissueTek Medium eingebettet und am Kryostaten koronar in 50 μ m Schichtdicke geschnitten. Die Hirnschnitte wurden dreimal für 15 Minuten in PBS gewaschen und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur in Histochemie-Blocklösung inkubiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C nach dem unten beschriebenen Schema behandelt. Die Behandlung mit Sekundärantikörpern erfolgte nach einem dreimaligen Waschen für 15 Minuten in PBS. Diese Behandlung wurde 60 Minuten durchgeführt. Alle Antikörper wurden in Histochemie-Blocklösung angesetzt. Danach wurden die Hirnschnitte dreimal für 15 Minuten in PBS gewaschen und für 60 Minuten in der entsprechenden Antikörperkombination mit dem

Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellkerne für 10 Minuten mit DAPI (Dianova, 1:1000 in PBS) gefärbt. Nach einem weiteren dreimaligen Waschen wurden die Schnitte mit Mounting Medium auf Objektträgern fixiert. Es erfolgte dann eine Aufnahme der Bilder in 60-facher Vergrößerung mit Öl mit Nikon Eclipse E4000 mit Nikon Confocal C1. Anschließend wurde die Analyse der visualisierten Schnitte mit der Software „ImageJ“ durchgeführt.

Färbung	Antikörper	Sekundärer Antikörper
pMG	IBA 1 (WAKO, 1:500)	Goat anti rabbit, 1:500, Alexa Fluor 594
MHC II	MHCII (SantaCruz, 1:150)	Goat anti rat, 1:200, Alexa Fluor 488
pMG	IBA 1 (WAKO, 1:500)	Goat anti rabbit, 1:500, Alexa Fluor 594
MHC II	CD74(bd, 1:200)	Goat anti rat, Alexa Fluor 488, 1:200

4.2.8 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism durchgeführt. Durch einen Q-Q-Plot konnte die Normalverteilung der Stichproben grafisch bestätigt werden. Die Analysen für einen Vergleich zwischen zwei verschiedenen Gruppen wurden mit einem ungepaarten und zweiseitigem t-Test durchgeführt. Die Varianzanalyse zu drei oder mehr Gruppen wurde mit einer One-way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. Die Signifikanzen werden in der vorliegenden Arbeit als $p < .0332$ (*), $p < .0021$ (**), $p < .0002$ (***), $p < .00001$ (****) dargestellt.

V. Ergebnisse

5.1 Hemmung des TGF- β Signalwegs durch den TGF- β R1 Inhibitor

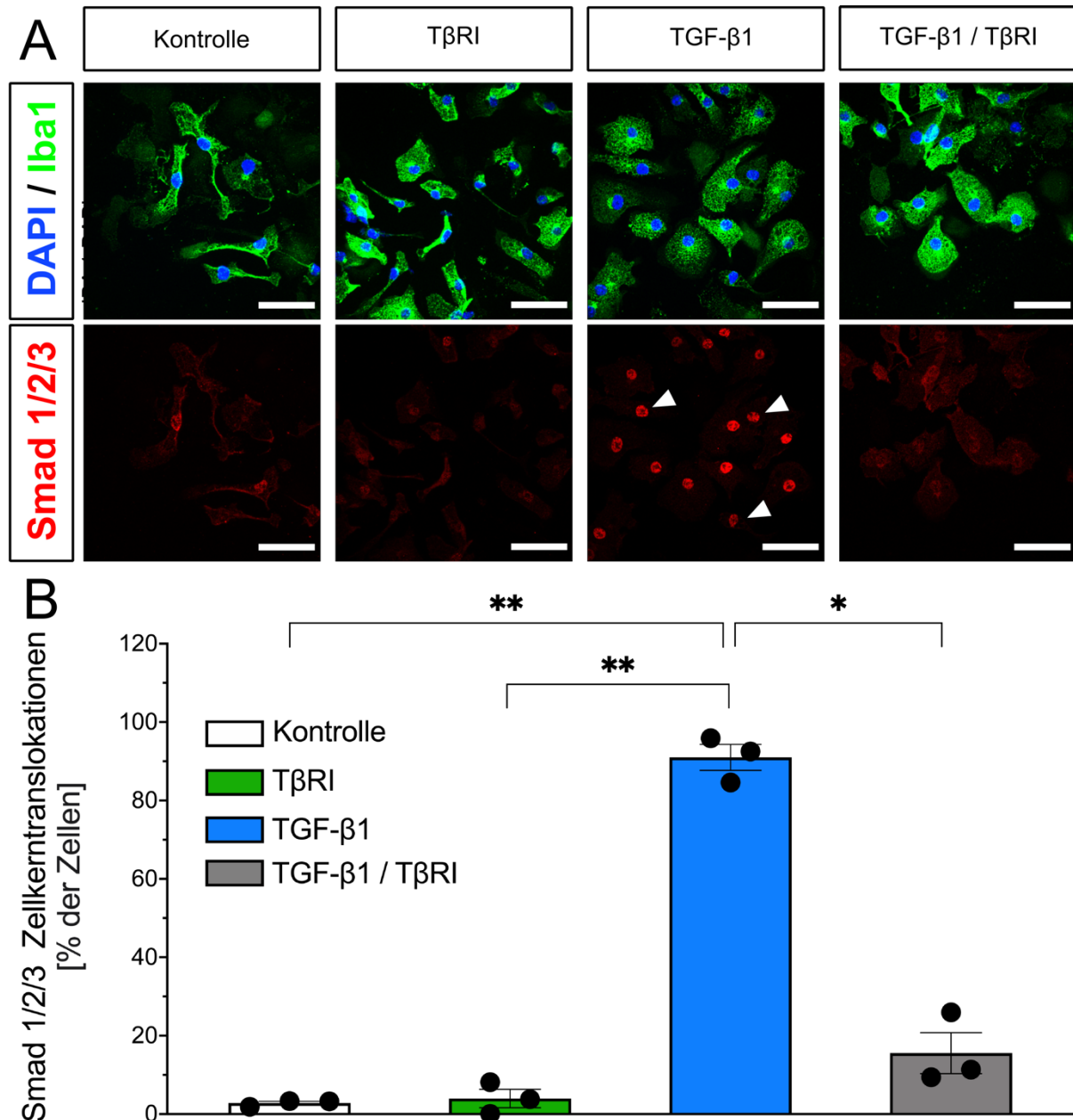


Abbildung 6: Die Regulation von SMAD-Zellkerntranslokationen durch TGF- β 1 und T β RI

A: Exemplarische immunzytochemische Färbung von Smad1/2/3 und Iba1. Iba1 wurde zur Identifizierung der Mikroglia angefärbt. Die weißen Pfeile markieren exemplarische Translokationen von Smad in den Zellkern. Die Skalen beziehen sich auf 50 μ m. B: Quantifizierung des Anteiles der Mikroglia mit einer Kerntranslokation von Smad1/2/3. Dargestellt wird der Mittelwert \pm SEM. Die statistische Analyse wurde mit einer One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. * p < .05, ** p < .01, n = 3.

Es wurde die Wirksamkeit des TGF- β R1 Inhibitors (T β RI) und von TGF- β 1 überprüft. Dazu wurde immunzytochemisch die Translokation von Smad1/2/3 in den Zellkern beobachtet. Die Bestimmung der Translokationen von Smad1/2/3 in den Zellkern erfolgte nach einer Inkubation

mit einem serumfreien Mikroglia-Medium für 2 Stunden und nach einer anschließenden Inkubation mit TGF- β 1 (5 ng/ml) und/oder TGF- β R1 Inhibitor (1 mM) für weitere 2 Stunden.

Die Kontrollgruppe zeigte einen Anteil von 2.79 % \pm 0.46 Mikroglia mit erkennbaren Kerntranslokationen von Smad1/2/3. In der mit T β RI behandelten Gruppe wiesen 3.97 % \pm 2.35 der Mikroglia Kerntranslokationen auf. Bei der mit TGF- β 1 behandelten Gruppe konnten bei 90.98 % \pm 3.35 der Mikroglia Smad1/2/3 Translokationen in den Kern festgestellt werden. Nach einer gleichzeitigen Behandlung mit TGF- β 1 und dem TGF- β R1 Inhibitor zeigten 15.54 % \pm 5.23 der Mikroglia Translokationen von Smad1/2/3 in den Zellkern, was einer statistisch signifikanten Abnahme um 75.45 % \pm 5.21 gegenüber der mit TGF- β 1 behandelten Gruppe entspricht.

Es konnten sowohl eine durch TGF- β 1 induzierte Aktivierung des von Smad abhängigen TGF- β Signalwegs als auch eine erfolgreiche Hemmung des Signalwegs durch den T β RI nachgewiesen werden.

5.2 BV2 Zelllinie

5.2.1 Regulation der CD74 Expression von BV2 Zellen durch TGF- β

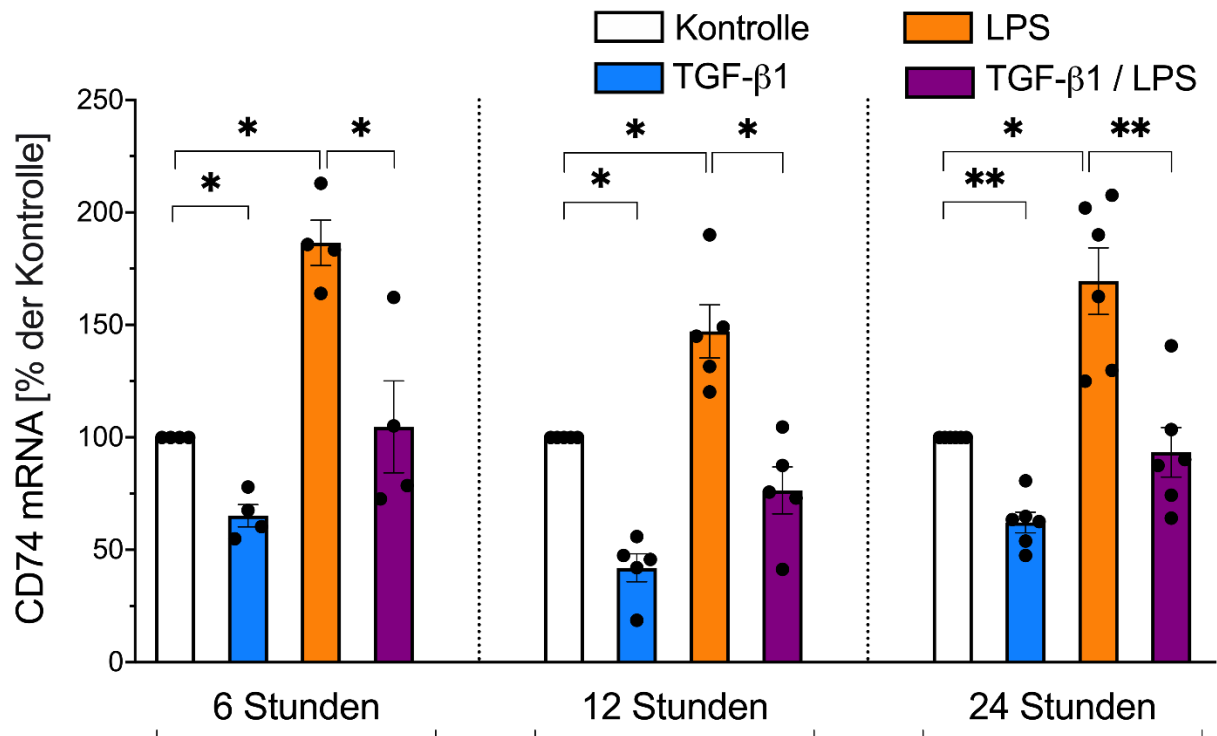


Abbildung 7: Eine durch TGF- β 1 vermittelte Hemmung der durch LPS induzierten Expression von CD74 in BV2

Relative RNA-Menge von CD74 in BV2 Zellen nach der Behandlung. Die Behandlung erfolgte in Monokultur und serumfreiem Medium für 6 ($n = 4$), 12 ($n = 4$) und 24 ($n = 6$) Stunden. Die Quantifizierung gibt den Mittelwert \pm SEM an. Die statistische Analyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test. * $p < .05$, ** $p < .01$.

Es wurden die Expression von Cd74 durch BV2 Zellen im aktivierten Zustand und die Regulation der Expression von Cd74 durch TGF- β 1 untersucht. Dafür wurden die BV2 Zellen kultiviert und in serumfreiem Medium mit TGF- β 1 (5 ng/ml) und LPS (1 ng/ml) behandelt. Danach erfolgte die Analyse der Expression mittels RT-qPCR.

Nach der Behandlung mit TGF- β 1 (5 ng/ml) zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Verminderung der Cd74-RNA in den BV2 Zellen auf 65.20 % \pm 4.98 nach 6 Stunden, 42.00 % \pm 6.25 nach 12 Stunden und 62.20 % \pm 4.60 nach 24 Stunden.

Nach der Behandlung mit LPS konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression von Cd74 festgestellt werden. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle ergaben sich dabei die folgenden Werte: 186.56 % \pm 10.07 nach 6 Stunden, 147.17 % \pm 11.86 nach 12 Stunden und 169.51 % \pm 14.77 nach 24 Stunden Behandlungsdauer.

Bei einer simultanen Behandlung mit TGF- β 1 und LPS konnte im Vergleich mit der nur mit LPS behandelten Gruppe eine signifikante Reduktion der Menge von *Cd74*-RNA festgestellt werden. Nach 6 Stunden Behandlungsdauer sank die *Cd74* Expression im Vergleich mit der mit LPS behandelten Gruppe jeweils signifikant um $81.89 \% \pm 15.72$ auf $104.70 \% \pm 20.44$, nach 12 Stunden um $70.74 \% \pm 16.68$ auf $76.43 \% \pm 10.39$ und nach 24 Stunden um $76.13 \% \pm 9.08$ auf 93.38 ± 10.97 .

Es konnte also nachgewiesen werden, dass TGF- β 1 die *Cd74* Expression von BV2 Zellen hemmt. Außerdem induziert LPS eine verstärkte Expression von *Cd74*, die durch TGF- β 1 inhibiert wird.

Zur Bestätigung der Ergebnisse auf der Ebene des CD74 Proteins wurde im folgenden Teil nach dem gleichen Schema auch die Proteinmenge von CD74 in BV2 Zellen untersucht.

5.2.2 Die durch TGF- β 1 vermittelte Reduktion der durch LPS induzierten CD74-Synthese in BV2 Zellen

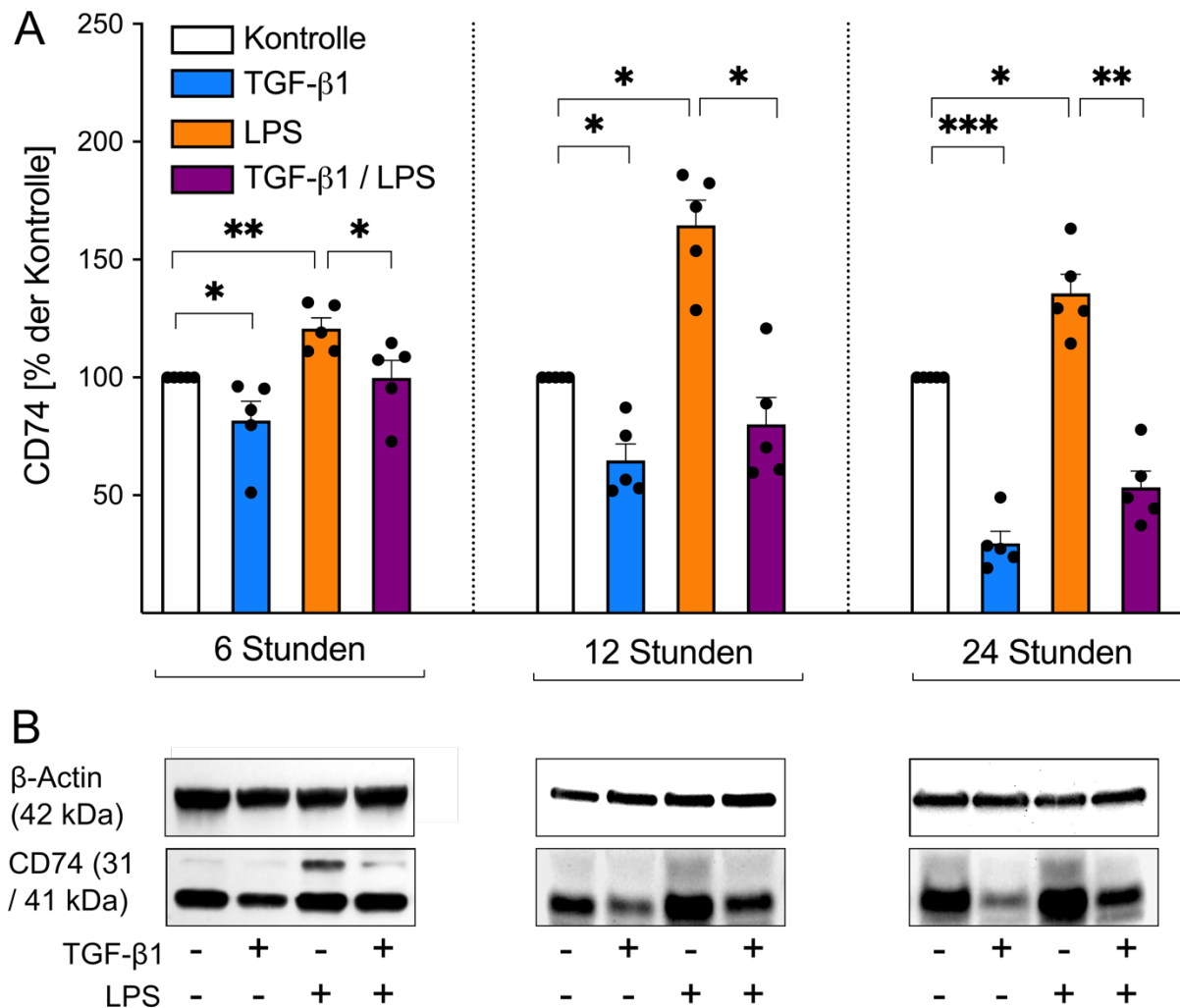


Abbildung 8: Reduktion der durch LPS induzierten CD74 Synthese durch TGF- β 1 in BV2 Zellen
 A: Quantifizierung nach einer densitometrischen Auswertung der Western Blots. Die Normalisierung erfolgte gegenüber β -Actin. In den Graphen werden die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einer One-Way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. 6 Stunden $n = 5$, 12 Stunden $n = 5$, 24 Stunden $n = 5$. B: Repräsentative Resultate des Western Blots.

Die im vorherigen Teil dargestellte Beeinflussung der Expression von *Cd74* durch LPS und TGF- β 1 in BV2 Zellen wurde in dieser Versuchsreihe auf die Untersuchung der Proteinebene erweitert. Dabei wurde mit einem Western Blot die relative CD74 Proteinsynthese von BV2 Zellen nach der Behandlung mit TGF- β 1 (5 ng/ml) und LPS (1 ng/ml) in serumfreiem Medium ermittelt.

Nach der Behandlung der BV2 Zellen mit TGF- β 1 konnte eine verringerte Menge von CD74 in den BV2 Zellen nachgewiesen werden. Sie lag gegenüber der Kontrolle bei 81,68 %

$\pm 18,38$ nach 6 Stunden, $64,78 \% \pm 7,02$ nach 12 Stunden und $29,56 \% \pm 5,14$ nach 24 Stunden. Die Behandlung mit LPS erhöhte die Menge von CD74 in den BV2 Zellen gegenüber der Kontrolle auf $120,70 \% \pm 10,08$ nach 6 Stunden, $164,60 \% \pm 10,61$ nach 12 Stunden und $135,59 \% \pm 8,23$ nach 24 Stunden Behandlung.

In der simultan mit TGF- β 1 und LPS behandelten Gruppe zeigte sich eine signifikante Abnahme der CD74 Menge im Vergleich mit der ausschließlich mit LPS behandelten Gruppe. Die Menge von CD74 lag bei $99,79 \% \pm 16,66$ nach 6 Stunden, $84,47 \% \pm 20,13$ nach 12 Stunden und $82,30 \% \pm 9,49$ nach 24 Stunden.

Die durch die qPCR in den BV2 Zellen ermittelten Ergebnisse konnten auch auf Proteinebene bestätigt werden. Das TGF- β reduzierte die Synthese von CD74 in Mikroglia, während LPS die Synthese von CD74 in Mikroglia verstärkte, was wiederum durch TGF- β inhibiert wird.

Im folgenden Teil wurde diese Untersuchung physiologischen Bedingungen angenähert und nach dem gleichen Vorgehen an primären Mikrogliazellen durchgeführt.

5.3 Primäre Mikroglia

5.3.1 Die durch TGF- β 1 vermittelte Hemmung der durch LPS induzierten CD74 Expression in primären Mikrogliazellen

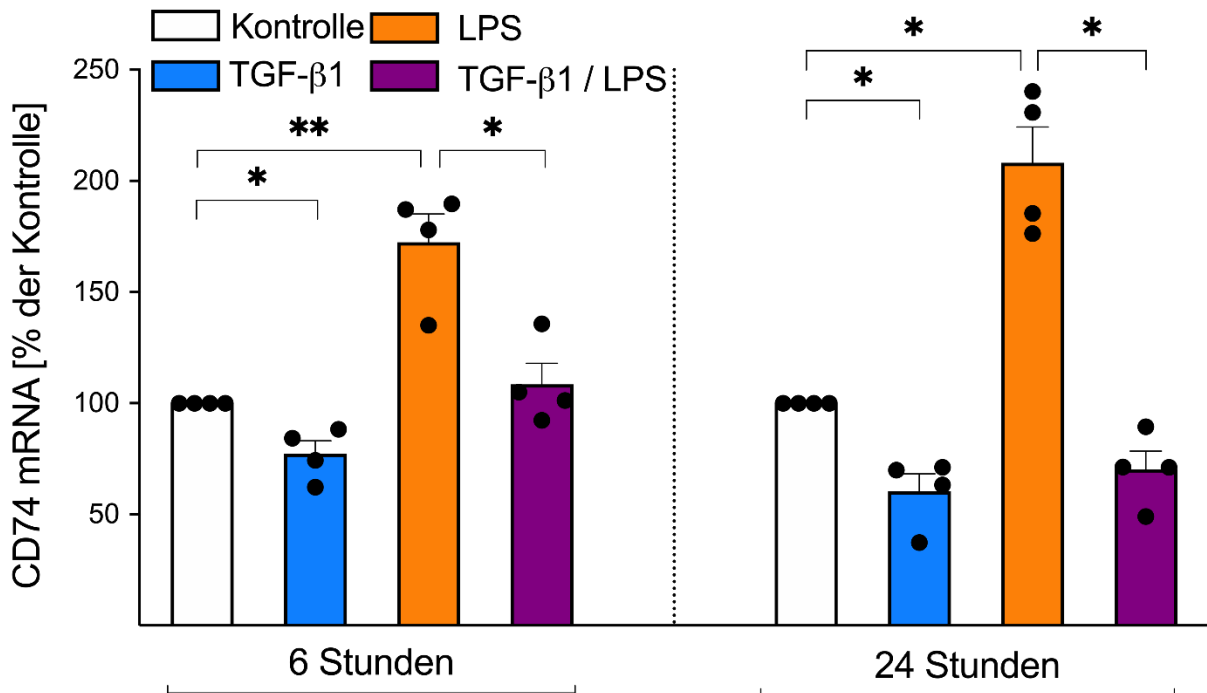


Abbildung 9: Reduktion der durch LPS induzierten CD74 Expression in primären Mikroglia durch TGF- β 1

Die Behandlung erfolgte mit TGF- β 1 (5 ng/ml) und LPS (1 ng/ml) für 6 und 24 Stunden. Die Graphen stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. Die statistische Analyse wurde mit einer One-Way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. $n = 4$. * $p < .05$, ** $p < .01$.

Nach den gewonnenen Erkenntnissen zur Expression von CD74 in BV2 Zellen wurde die Expression in primären Mikroglia untersucht. Die primären Mikroglia in Monokultur wurden vor der Behandlung für 2 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung wie bei den vorherigen Untersuchungen mit TGF- β 1 (5 ng/ml) und LPS (1 ng/ml). Aufgrund der geringeren Menge des Zellmaterials wurde die Untersuchung auf die Zeiträume 6 und 24 Stunden beschränkt.

Nach der Behandlung mit TGF- β 1 sank die relative Menge von Cd74-RNA gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant auf 74.45 % \pm 5.31 nach 6 Stunden und auf 60.39 % \pm 7.89 nach 24 Stunden.

Nach der Behandlung mit LPS zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Expression von Cd74 gegenüber der Kontrolle von 175.04 % \pm 10.20 nach 6 Stunden und 208.21 % \pm 16.02 nach 24 Stunden.

Eine gleichzeitige Behandlung mit TGF- β 1 und LPS führte zu einer statistisch signifikanten Senkung der Expression gegenüber der nur mit LPS behandelten Gruppe um $70.34 \% \pm 11.48\%$ auf $104.7\% \pm 8.24$ nach 6 Stunden und um $138.00 \% \pm 22.62$ auf $70.2\% \pm 8.25$ nach 24 Stunden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass TGF- β 1 auch in primären Mikroglia die Expression von *Cd74* senkt. Außerdem konnte die durch LPS verstärkte Expression von *Cd74* in Mikroglia durch TGF- β 1 inhibiert werden. Die ermittelten Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, die bei den BV2 Zellen gemacht werden konnten.

5.3.2 Regulation der CD74-Synthese in primären Mikrogliazellen durch TGF- β 1

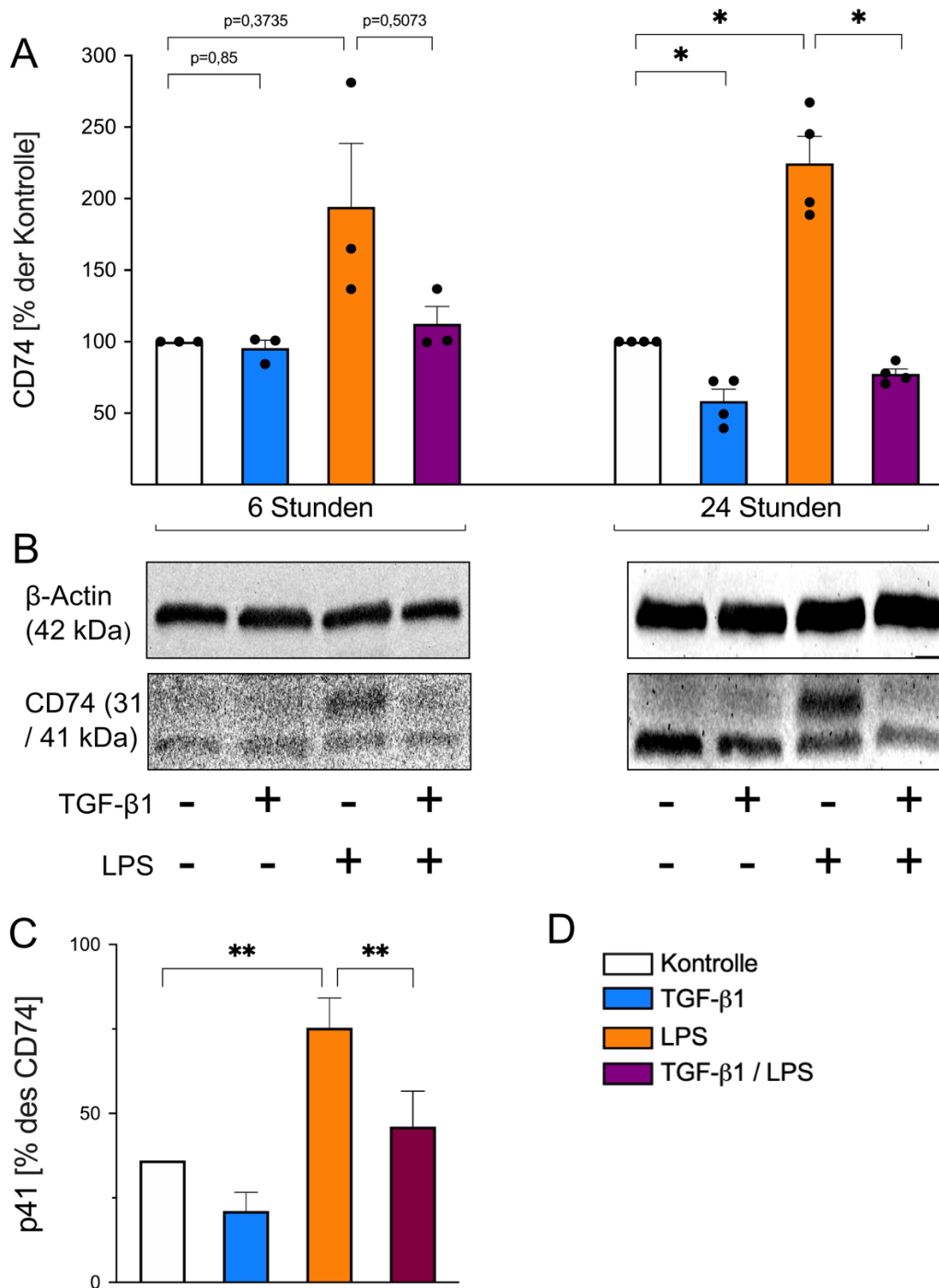


Abbildung 10: Reduktion der durch LPS induzierten CD74-Synthese durch TGF- β 1 in primären Mikrogliazellen

A Quantifizierung der CD74 Menge nach einer densitometrischen Analyse des Western Blots. Die Normalisierung wurde gegenüber β -Actin durchgeführt. Behandlung der Gruppen für 6 ($n = 3$) und 24 ($n = 4$) Stunden. B Repräsentative Resultate des Western Blots. C Quantifizierung nach der densitometrischen Analyse des Western Blots. Verglichen wurde pro Gruppe der Anteil von p41-CD74 gegenüber dem gesamten CD74 (p31 + p41). Die Graphen stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. Die statistische Analyse wurde mit einer One-Way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

In diesem Teil wurde die Expression von CD74 von primären Mikroglia nach einer Aktivierung und zusätzlichen Behandlung mit TGF- β 1 untersucht. Wie bei der Untersuchung der BV2 Zellen wurden die primären Mikroglia mit TGF- β 1 (5 ng/ml) und LPS (1 ng/ml) für 6 und 24 Stunden in serumfreiem Medium behandelt und danach mittels Western Blot untersucht.

Mit dieser Versuchsreihe sollte darüber hinaus überprüft werden, ob die Untereinheiten des CD74 unterschiedlich reguliert werden. Dafür wurde jeweils der Anteil von p41 am gesamten CD74 ermittelt, um dann einen Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen durchzuführen.

Die Behandlung der primären Mikroglia mit TGF- β 1 führte nach 6 Stunden zu einer Abnahme der relativen CD74 Menge auf 95.52 % \pm 5.56 gegenüber der Kontrolle. Diese Abnahme war aber statistisch nicht signifikant. Bei einer Behandlungsdauer von 24 Stunden sank die Menge von CD74 demgegenüber statistisch signifikant auf 58.44 % \pm 8.34.

Bei der Behandlung mit LPS ergab sich bei einer Behandlungsdauer von 6 Stunden ein Anstieg der relativen Proteinsynthese von CD74 gegenüber der Kontrolle auf 194.31 % \pm 44.24. Dieser Anstieg war aber statistisch nicht signifikant. Nach 24 Stunden Behandlung stieg die relative CD74 Menge wiederum statistisch signifikant auf 224.70 % \pm 18.86 an.

Die gleichzeitige Behandlung mit LPS und TGF- β 1 führte nach 6 Stunden Behandlung zu einer nicht signifikanten Reduktion der CD74 Menge im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit LPS auf 112.40 % \pm 12.22 erkennen. Nach 24 Stunden Behandlung ergab sich gegenüber der LPS-Behandlung eine statistisch signifikante Verminderung der CD74-Menge auf 77.50 % \pm 3.43.

Es wurde auch eine Analyse des Anteils der 41 kDa Variante von CD74 am gesamten CD74 bei den 24 Stunden behandelten primären Mikroglia durchgeführt (siehe Abbildung 10C). Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte einen Anteil der p41 Variante am gesamten CD74 von 26,13 % \pm 8,34. Die 24 Stunden mit TGF- β 1 behandelte Gruppe wies einen Anteil von 21,14 % \pm 5.55 auf. Bei der mit nur mit LPS behandelten Gruppe stieg der Anteil der p41 Einheit gegenüber der Kontrolle signifikant auf 75,43 % \pm 8,79 an. Die simultan mit LPS und TGF- β 1 behandelte Gruppe zeigte einen p41 Anteil von 46,08 % \pm 10,56, wodurch sie sich signifikant von der nur mit LPS behandelten Gruppe unterscheidet.

Die Ergebnisse aus der vorherigen Reihe mit BV2 Zellen konnten also bei der Untersuchung von primären Mikroglia bestätigt werden. TGF- β 1 ist daher in der Lage, die CD74 Expression von Mikroglia zu hemmen. LPS induziert eine verstärkte Expression von CD74, die wiederum von TGF- β 1 negativ reguliert werden kann. Bei einem Behandlungszeitraum von 24 Stunden

waren die Ergebnisse signifikant. Außerdem zeigte sich, dass die veränderte Expression von CD74 vor allem über die p41 Untereinheit vermittelt wird. Während LPS für eine signifikante Zunahme des Anteils von p41 am gesamten CD74 sorgt, verringert TGF- β 1 den Anteil der p41 Variante am gesamten CD74.

5.3.3 Die durch den TGF- β R1 Inhibitor und LPS regulierte CD74 Expression und Proteinsynthese in Mikroglia aus einer Glia-Mischkultur

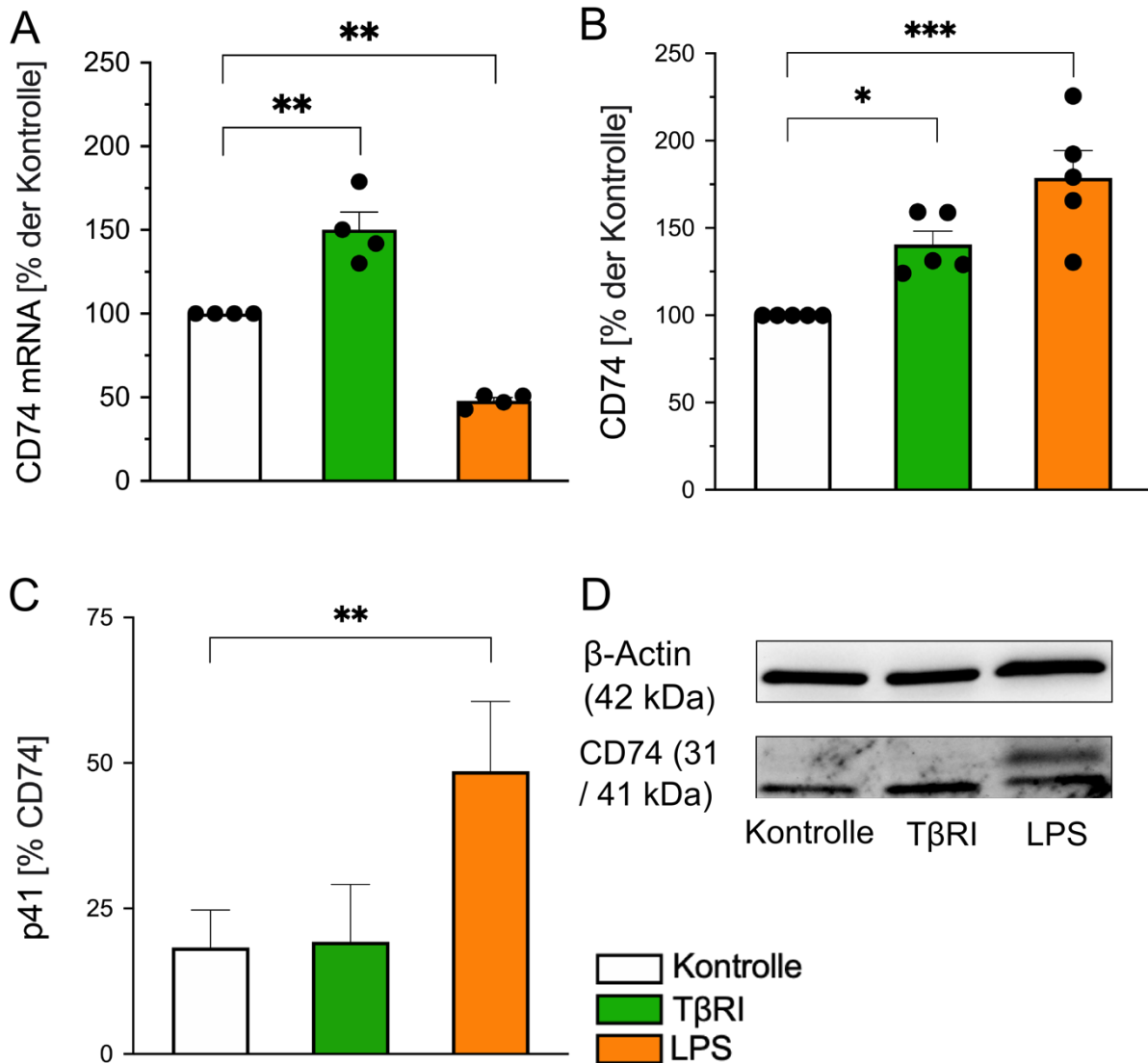


Abbildung 11: Induktion der CD74-Synthese durch den TGF- β R1 Inhibitor und eine Reduktion der Cd74-Expression durch LPS in primären Mikrogliazellen

A, C: Die Behandlung erfolgte mit dem TGF- β R1 Inhibitor (1 mg/ml) oder LPS (1 ng/ml) in einer Mischkultur mit Astrozyten in serumhaltigem Mikroglia-Medium (n = 5). In den Graphen werden die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einer One-Way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. *p < .05, **p < .01, ***p < .001, n = 5. B Repräsentative Resultate des Western Blots.

Für eine Annäherung an die physiologischen Verhältnisse wurden Mikroglia aus einer Glia-Mischkultur untersucht. Entsprechend den vorherigen Versuchen wurden dabei sowohl die Genexpression von Cd74 als auch die Synthese von CD74 betrachtet, um mögliche Regulationsmechanismen zu erschließen. Dafür wurde in serumhaltigem Medium durch die Zugabe von TGF- β R1 Inhibitor (1 mMol) der TGF- β Signalweg blockiert und in einer weiteren Gruppe wurde für 24 Stunden LPS (1 ng/ml) zugegeben.

Nach der Behandlung mit TGF- β 1 zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Genexpression von *Cd74* gegenüber der Kontrolle auf 150.30 % \pm 10.39. Die Behandlung mit LPS führte zu einer signifikant verringerten Menge von *Cd74*-RNA von 47.97 % \pm 1.94.

Die Analyse der Proteinlevel führte nach 24 Stunden Behandlung mit dem Inhibitor zu einer signifikant erhöhten Menge von CD74 von 140.51 % \pm 7.66. Die relative CD74-Menge der mit LPS behandelten Gruppe stieg auf 178.67 % \pm 15.61.

In Abbildung 11C wird der Anteil der p41 Variante von CD74 am gesamten CD74 dargestellt. In der Kontrollgruppe entfielen 18.29 % \pm 6.442 auf die p41 Variante. Bei der mit dem TGF- β R1 Inhibitor behandelten Gruppe entsprachen dagegen nur 19.29 % \pm 9.83 des gesamten CD74 der p41 Variante. Gegenüber der Kontrolle war bei der mit LPS behandelten Gruppe der Anteil der p41 Variante signifikant auf 48.61% \pm 12.00 erhöht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die pharmakologische Blockade des TGF- β Rezeptors 1 die Expression von *Cd74* ansteigt. Die Behandlung der Zellen mit LPS führt zu einer erhöhten Menge von CD74-Protein, wobei aber interessanterweise die Expression von RNA signifikant vermindert wird. Mittels Western Blot wurde der Anteil der p41 Variante am gesamten CD74 bestimmt. Nach der Behandlung mit LPS war der Anteil signifikant erhöht, sodass T β R1 den Anteil der p41 Variante offensichtlich nicht signifikant verändert.

Um an diese Ergebnisse anzuknüpfen, wurde im nächsten Schritt die Oberflächenpräsentation von CD74 durch Mikroglia nach einer Induktion mit LPS und nach einer pharmakologischen Blockade von T β R1 untersucht.

5.3.4 Die durch T β RI induzierte und LPS reduzierte Oberflächenpräsentation von CD74 auf primären Mikrogliazellen

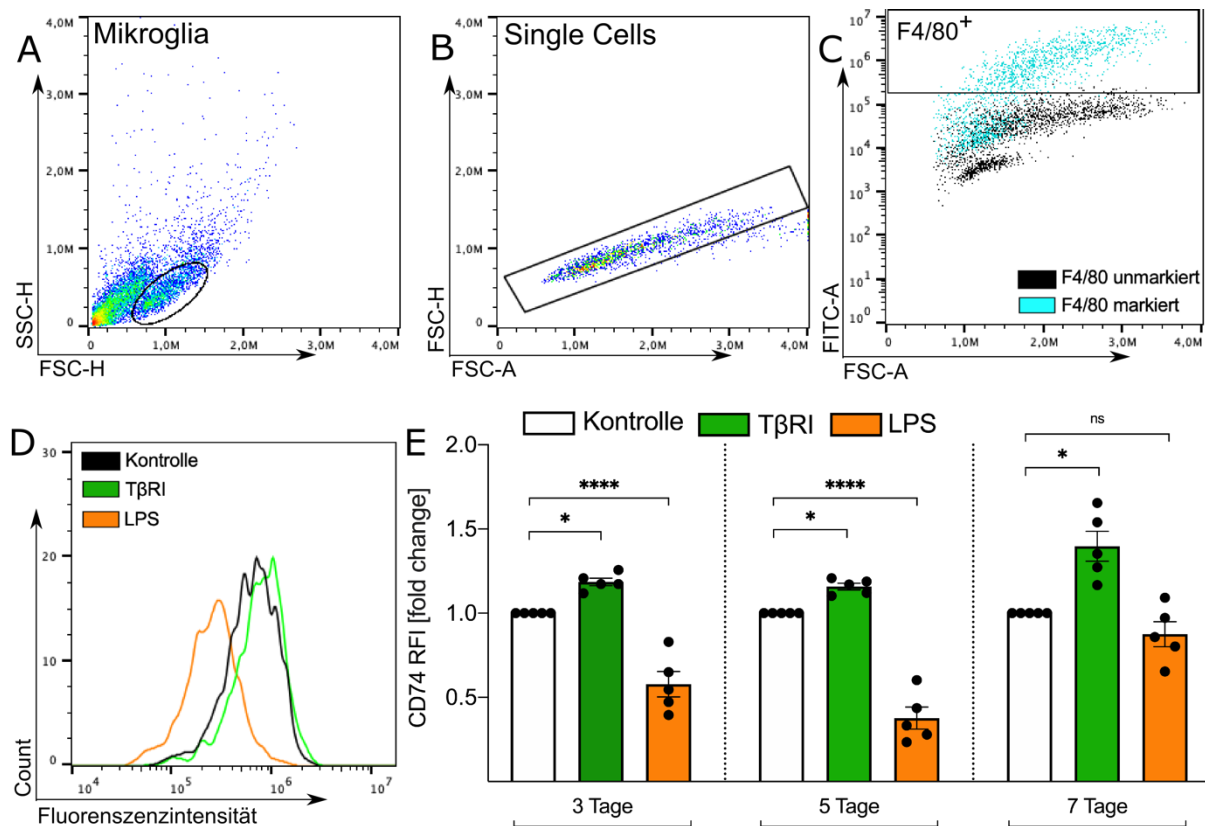


Abbildung 12: Die durch T β RI induzierte und LPS reduzierte Oberflächenpräsentation von CD74
 Auswahl der Mikroglia-Population dargestellt in A, danach Auswahl der Einzelzellen (B) und Auftragen der Ergebnisse in FSC-A gegen FITC-A (C). Dabei konnte durch die ungefärbte Probe als Referenz der Grenzwert für die F4/80-Positivität ermittelt werden. Bei Zellen, die diesen Grenzwert überschritten haben (C, unten), handelte es sich um Mikroglia. D: Durch die Median Fluorescence Intensity (MFI^{APC}) wurde die relative Dichte von CD74 (APC-A gefärbt) auf der Zelloberfläche bestimmt (D). E: Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensität (RFI). Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Einzelexperimente (3 Tage $n = 6$, 5 Tage $n = 4$, 7 Tage $n = 4$) werden dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einer One-Way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. * $p < .05$, **** $p < .001$.

Wie bei den vorherigen Ergebnissen zur Expression von Cd74 und zur Synthese von CD74 in der Glia-Mischkultur nach einer Inkubation mit LPS oder T β RI wurde auch der Einfluss auf die Oberflächenpräsentation von CD74 untersucht. Die Zellen wurden dabei nach der in der Arbeitsgruppe etablierten Technik für 3, 5 und 7 Tage in der Mischkultur behandelt. Danach wurde eine Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

Vor dem Beginn der Versuchsreihen wurde mit einfachen Färbungen von Mikroglia mit APC und FITC eine Kompensationsmatrix erstellt, die im weiteren Verlauf kontinuierlich für eine Bereinigung der spektralen Überlappungen kontinuierlich eingesetzt wurde. Das Gating wurde mit FlowJoTM wie in der Abbildung 12 durchgeführt und von der „Core Facility für

Zellsortierung und Zellanalyse“ der Universität Rostock bestätigt. Die Mikroglia wurden als F4/80⁺ Zellpopulation demarkiert [146]. Die Analyse von CD74 wurde mit einem an APC gekoppelten CD74 Antikörper durchgeführt. Von den Unterschieden der Intensität zwischen den Gruppen kann auf die Stärke der Bindung der Antikörper an CD74 auf der Zelloberfläche und damit indirekt auch auf die Präsentation von CD74 auf der Zelloberfläche geschlossen werden, wodurch die Gruppen miteinander verglichen werden konnten [147]. Aus der ermittelten Median Fluorescence Intensity (MFI^{APC}, im Folgenden als MFI^{CD74} deklariert) der Kontrollgruppe gegenüber der MFI der mit TβRI oder LPS behandelten Gruppen konnte die RFI^{CD74} (Relative Fluorescence Intensity) ermittelt werden, die als fold change angegeben wird.

$$RFI_{\text{Kontrolle}}^{\text{CD74}} = \frac{MFI_{\text{Kontrolle}}^{\text{CD74}}}{MFI_{\text{Kontrolle}}^{\text{CD74}}}$$

$$RFI_{\text{Inhibitor}}^{\text{CD74}} = \frac{MFI_{\text{Inhibitor}}^{\text{CD74}}}{MFI_{\text{Kontrolle}}^{\text{CD74}}}$$

$$RFI_{\text{LPS}}^{\text{CD74}} = \frac{MFI_{\text{LPS}}^{\text{CD74}}}{MFI_{\text{Kontrolle}}^{\text{CD74}}}$$

Nach der Behandlung mit dem TGF-β R1 Inhibitor in 3, 5 oder 7 Tagen zeigten die Mikroglia eine signifikant erhöhte Dichte von CD74 auf der Zelloberfläche. Die höchste Dichte von CD74 auf der Zelloberfläche wurde nach einer Behandlung von 7 Tagen ermittelt. Die CD74 Dichte der Oberfläche war nach 3 Tagen auf das 1.19-Fache ± 0.05, nach 5 Tagen auf das 1.16-Fache ± 0,04 und nach 7 Tagen auf das 1.40-Fache ± 0.2 angestiegen. Die Zunahme der CD74-Dichte nach der Behandlung mit dem Inhibitor war zu jedem Zeitraum statistisch signifikant.

Nach der Behandlung mit LPS zeigten die Mikroglia stets eine verringerte Dichte von CD74 auf der Oberfläche. Das Maximum der Abnahme trat nach 5 Tagen Behandlung auf. Nach 3 Tagen konnte eine Abnahme um das 0.58-Fache ± 0.08, nach 5 Tagen auf das 0.38-Fache ± 0.15 und nach 7 Tagen auf das 0.88-Fache ± 0.07 festgestellt werden. Die Abnahme der CD74-Dichte nach der LPS-Behandlung war im Vergleich mit der Kontrolle bei der Behandlung von 3 und 5 Tagen signifikant.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition des TGF-β Signalweges bei den Mikroglia in der Glia-Mischkultur zu einer signifikant verstärkten Präsentation von CD74 auf der Oberfläche der primären Mikroglia führt. Interessanterweise

fürte die Behandlung mit LPS zu einer verminderten Präsentation von CD74 auf der Oberfläche, wobei diese Veränderungen nach 3 und 5 Tagen Behandlung signifikant waren.

5.3.5 Die altersabhängige Oberflächenpräsentation von Mikrogliazellen nach einer ex-vivo Analyse von p7- und p30-Tieren

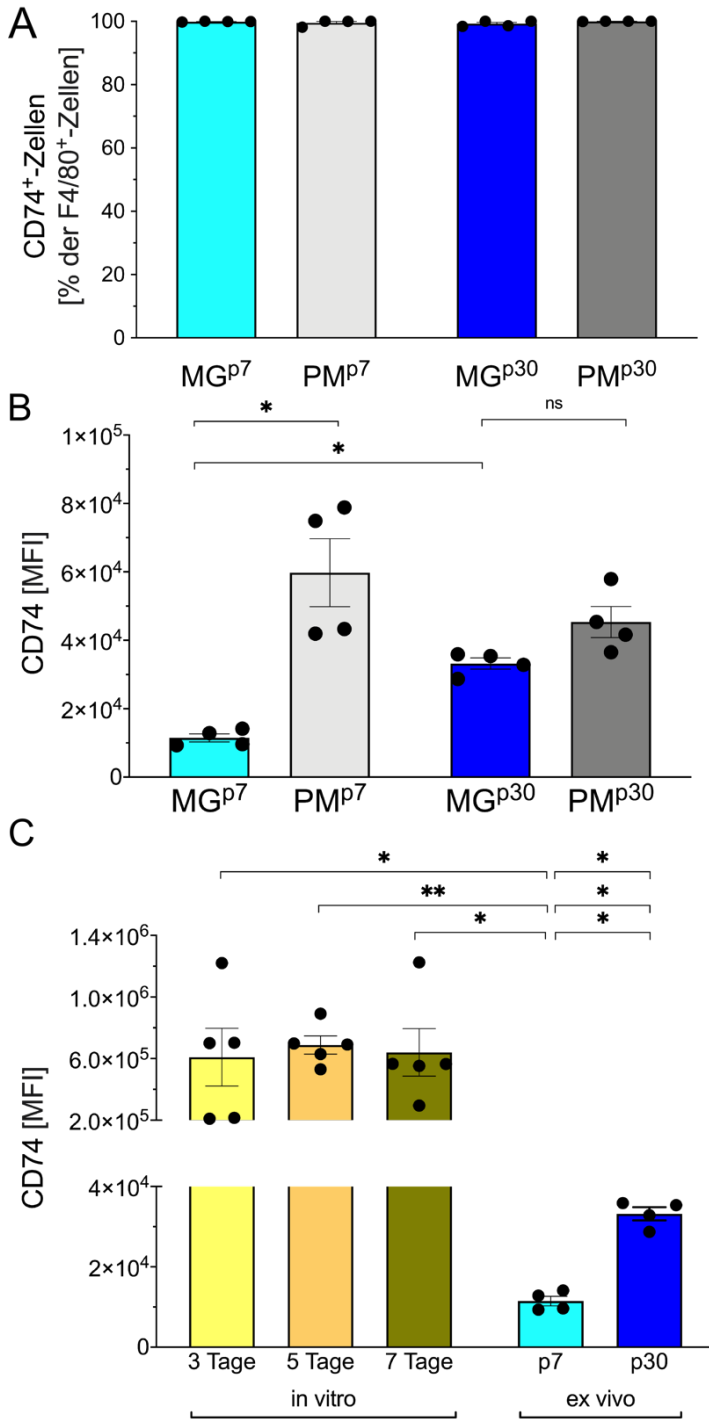


Abbildung 13: Die altersabhängige CD74-Oberflächenpräsentation von Mikroglia im Vergleich mit Peritonealmakrophagen

A: Der Anteil CD74-positiven Zellen an den F4/80-positiven Zellen. B: Quantifizierung der MFI^{CD74} von Mikroglia und Peritonealmakrophagen aus 7 oder 30 Tage alten Mäusen. *n* = 4. C: Vergleich der MFI von ex vivo Mikroglia (siehe B) gegen in vitro kultivierte Mikroglia (siehe Abbildung 12) In den Graphen werden die Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einer One-Way ANOVA und dem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

Mit *ex vivo* gewonnenen Zellen wurde untersucht, ob die Oberflächenpräsentation von CD74 spezifisch für Mikroglia ist. Dabei wurde auch ermittelt, ob CD74 möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung von Mikroglia spielt. Dafür wurde die Präsentation von CD74 bei unreifen (p7) und reifen (p30) Mikroglia miteinander verglichen. Außerdem wurden die Mikroglia aus *ex vivo* Tieren mit den Mikroglia aus einer *in vitro* Kultur verglichen, um den Aktivierungszustand der *in vitro* kultivierten Mikroglia einschätzen zu können. Die untersuchten Zellen wurden aus Kortexen und Peritoneen von NMRI Mäusen durch eine Gradienten-Auftrennung gewonnen und mit einem Fluoreszenzantikörper gefärbt. Das Gatingprotokoll entsprach dabei der Darstellung in der Abbildung 12.

Sowohl die Peritonealmakrophagen als auch die primären Mikroglia waren jeweils zu über 99 % positiv für CD74 (Abbildung 13A). Für eine weitere Differenzierung wurde die MIF wie bei den *in vitro* Versuchen mit Durchflusszytometrie analysiert (siehe 5.3.4). Die Ergebnisse werden in Abbildung 13B dargestellt. Für die Mikrogliazellen aus p7 Mäusen wurde eine MFI^{CD74} von 11490 ± 1187 ermittelt und für die Mikroglia aus p30 Mäusen eine MFI von 33212 ± 1640 . Bei den Peritonealmakrophagen ergab sich bei den p7 Mäusen eine MFI^{CD74} von 59501 ± 13004 und bei den p30 Mäusen eine MFI von 45358 ± 4554 . Bei den p7 Zellen zeigte sich eine signifikant höhere MFI^{CD74} der Peritonealmakrophagen gegenüber den Mikroglia.

Die MFI^{CD74} von p7 Mikroglia war gegenüber der von p30-Mikroglia signifikant gesteigert. Die Peritonealmakrophagen aus den p7 Tieren wiesen eine signifikant höhere MFI^{CD74} auf als die entsprechenden Mikroglia aus p7 Tieren.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Peritonealmakrophagen als auch Mikroglia CD74 auf ihrer Oberfläche präsentieren, sodass CD74 kein spezifischer Marker für Mikroglia ist. Außerdem zeigte sich, dass Peritonealmakrophagen stärker CD74 exprimieren als Mikroglia, wobei dieser Unterschied bei den p7 Zellen signifikant war. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass *in vitro* kultivierte Mikroglia CD74 vielfach stärker auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Beim Vergleich von Mikroglia verschiedener Reifungsstufen wurde deutlich, dass reife Mikroglia (p30) CD74 stärker präsentieren als unreife Mikroglia (p7).

5.4 Induktion der CD74- und MHC2-Synthese in $mgT\beta R2^{-/-}$

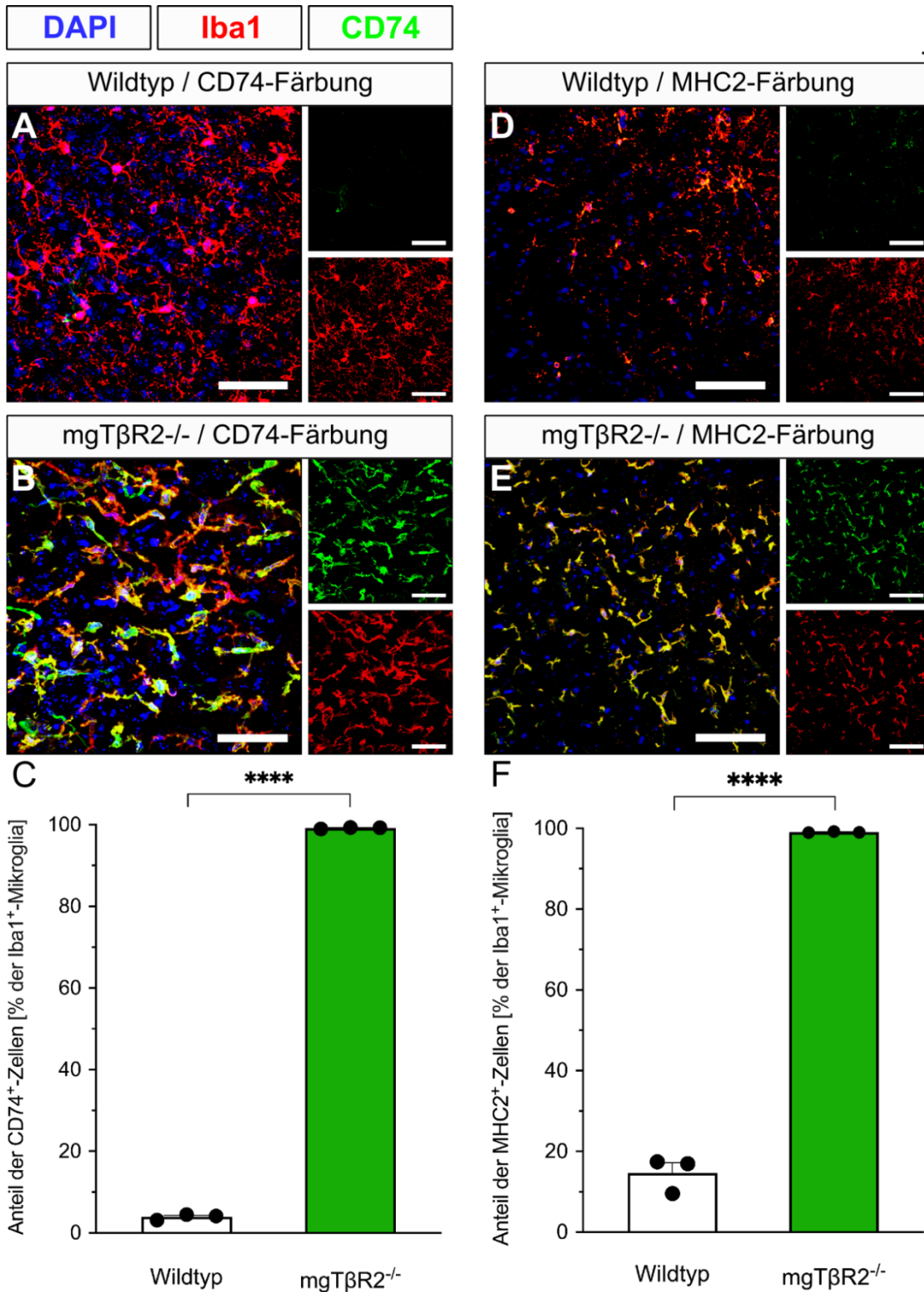


Abbildung 14: Induktion der CD74- und MHC2-Synthese in $mgT\beta R2^{-/-}$

A-E: Beispielhafte Aufnahmen von Kortexschnitten (50 μm Schichtdicke) von Mäusekortex. Verglichen wurden Wildtyp (A, D) und $TGF-\beta R2$ defiziente Tiere (B, E). Die Zellkerne wurden mit DAPI und die Mikroglia mit Iba1 angefärbt. Färbung auf CD74 (A, B) oder MHC 2 (D, E) mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern bei 488 nm. C, F: Quantifizierung der Zellzählung. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung wurde mit dem ungepaarten t-test durchgeführt. **** $p < .0001$.

Um den komplexen Vorgängen im zentralen Nervensystem von Säugetieren möglichst nahe zu kommen, wurde auch der Einfluss des TGF- β Signalweges auf Mikroglia im Mäusehirn *in vivo* untersucht. Dabei wurden die Mikroglia von Mäusen des Wildtyps mit den Mikroglia von Mäusen mit einem konditionellen Knockout des TGF- β Rezeptors 2 verglichen. Außerdem wurde an diesen Mikrogliazellen die Synthese von MHC2 untersucht, um Hinweise auf eine möglicherweise immunologische Aktivierung der Mikroglia zu erhalten.

Dafür wurden jeweils drei Schnitte von drei Tieren des Wildtyps und von drei Tieren mit einer erfolgreichen Deletion des TGF- β Rezeptors 2 durch eine MHC2- und CD74-Färbung analysiert. Pro Schnitt wurden drei Gesichtsfelder im Mikroskop von jeweils 45000 μm^2 als Z-Stack aufgenommen und ausgezählt.

In den Hirnschnitten der Wildtypmäuse waren 3.93 % \pm 0.40 der Mikroglia positiv auf CD74. In den Schnitten der TGF- β R2 defizienten Tiere waren 99.18 % \pm 0.10 der Mikroglia CD74 positiv. Der Unterschied war statistisch stark signifikant.

Bei den Versuchen zur MHC 2 Färbung zeigten sich im Wildtyp 14,67 % \pm 2.55 der Mikroglia positiv auf MHC 2. Bei den Schnitten der TGF- β R2 Knockout-Tiere waren 99.08 % \pm 0.09 der Mikroglia positiv auf MHC 2.

Dadurch konnte also belegt werden, dass der Knockout von T β R2 in den Mikroglia innerhalb der ersten beiden postnatalen Wochen zu einer verstärkten Synthese von CD74 und MHC2 führt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den vorherigen *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen zum Einfluss des TGF- β Signalweges auf die Expression von Cd74 und die Synthese und Präsentation von CD74 in den Mikrogliazellen.

VI. Diskussion

6.1 Aktivierung und Inhibition des TGF- β Signalweges durch einen rekombinanten TGF- β 1 und TGF- β Rezeptor Inhibitor

Anhand von ICC konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl die Wirksamkeit des rekombinanten TGF- β 1 als auch des TGF- β Rezeptor Inhibitors (T β RI) bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass rekombinantes TGF- β 1 zu Translokationen von Smad1/2/3 in den Zellkern führt, wodurch der klassische Weg des TGF- β Signals aktiviert wird. Durch die Zugabe von T β RI konnte diese Translokation verhindert werden, wodurch auch der Inhibitor in seiner Funktion bestätigt werden konnte. Dabei wurde aber keine vollständige Inhibition des Signalweges erreicht. Auch wenn hohe Konzentrationen von TGF- β 1 eingesetzt wurden, kann angesichts der erreichten Hemmung der Smad Translokationen von einer guten Wirksamkeit des T β RI gesprochen werden.

Zusammenfassend konnte mit dieser vorbereitenden Versuchsreihe die Wirksamkeit des rekombinanten TGF- β 1 und des T β RI in Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorheriger Studien bestätigt und für die folgende Verwendung verifiziert werden [87, 148].

6.2 Eine durch LPS induzierte und TGF- β 1 regulierte Genexpression von CD74 in BV2 Zellen und primären Mikroglia

An BV2 Zellen und primären Mikroglia in Monokultur konnte durch qPCR und Western Blot gezeigt werden, dass LPS eine verstärkte Genexpression von *Cd74* induziert. TGF- β 1 senkte demgegenüber die *Cd74* Expression. Darüber hinaus wurde durch TGF- β 1 die durch LPS vermittelte und verstärkte Expression von *Cd74* inhibiert.

In einer ersten Versuchsreihe wurden BV2 Zellen verwendet, um eine Regulation von CD74 bestätigen zu können. BV2 Zellen lassen sich schnell und unkompliziert in großen Mengen kultivieren. Sie ermöglichten in der vorliegenden Studie eine orientierende Untersuchung der CD74 Expression und eine Optimierung der verwendeten Methoden. Außerdem war bereits bekannt, dass BV2 Zellen gegenüber primären Mikrogliazellen *in vitro* in 90 % und *in vivo* in 54 % der Fälle durch LPS induzierte Expressionsmuster zeigen [149]. Auch der NF- κ B Signalweg, der u. a. an der Genexpression von CD74 beteiligt ist, findet sich in den BV2 Zellen [138]. Obwohl in verschiedenen Studien eine gute Vergleichbarkeit von Mikroglia *in vitro* mit BV2 Zellen nachgewiesen werden konnte, gibt es auch kritische Einschätzungen, die eine Verwendung von BV2 Zellen als Substitut für primäre Mikroglia nur bedingt für sinnvoll halten [150]. Um die Ergebnisse der Versuchsreihe verifizieren zu können, wurden die Untersuchungen in einer zweiten Versuchsreihe an primären Mikrogliazellen durchgeführt. Sie

entsprechen wegen der jeweils frischen Präparation aus neugeborenen Mäusen (P0/P1) eher den *in vivo* Verhältnissen als den BV2 Zellen. Primäre Mikroglia verfügen über einen Großteil der physiologischen Aktivität von reaktiven Mikroglia *in vivo* [150].

Bei den BV2 Zellen ergab sich keine signifikante und zeitabhängige Veränderung der Genexpression von *Cd74*. Deshalb und zur Vermeidung einer nicht notwendigen Tötung von Mäuseembryos wurden die primären Mikrogliazellen nur nach 6 und 24 Stunden untersucht.

Bei der Untersuchung der primären Mikroglia fiel auf, dass im Vergleich mit den BV2 Zellen bei der Proteinsynthese von CD74 nach einer 6-stündigen Behandlung keine signifikanten Veränderungen aufgetreten sind. Dies könnte man evtl. mit einem langsameren Verlauf des komplexeren Stoffwechsels der primären Mikrogliazellen erklären. Möglich wäre allerdings auch eine statistische Fehleinschätzung aufgrund der niedrigen Anzahl von nur drei Wiederholungen. Methodisch wäre es hier sinnvoll, wie bei der Versuchsreihe mit den BV2 Zellen eine höhere Anzahl von Wiederholungen einzusetzen, um dadurch die statistische Aussagekraft zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der Wiederholungen wegen eines möglichst verantwortungsvollen Einsatzes von Versuchstieren geringgehalten.

Außerdem zeigte sich in der vorliegenden Studie bei den primären Mikrogliazellen eine stärkere Induktion von CD74 durch LPS als bei den BV2 Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Henn et al., dass die Reaktion von primären Mikrogliazellen auf LPS im Vergleich mit BV2 Zellen verstärkt ist [138].

Nach der Durchführung der beiden Versuchsreihen konnte nachgewiesen werden, dass BV2 Zellen und primäre Mikroglia bei der Genexpression von *Cd74* ähnlich auf LPS und TGF- β 1 reagieren. BV2 Zellen können daher bei der Untersuchung der *Cd74* Expression als nützliche Substituenten für primäre Mikroglia verwendet werden. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse bei BV2 Zellen und primären Mikrogliazellen stützt eine hohe prädiktive Wahrscheinlichkeit für eine Verwendung als vergleichbare Mikroglia gegenüber den Mikroglia *in vivo*.

Ein interessantes Ergebnis besteht hier auch darin, dass die Genexpression von *Cd74* in BV2 Zellen und primären Mikroglia, abgesehen von den 6-stündig behandelten Mikrogliazellen auf der Proteinebene, nach der Behandlung mit TGF- β 1 gegenüber der Kontrolle signifikant gesunken ist. Mikroglia exprimieren unter normalen Umständen nur geringe Mengen von CD74, weshalb keine deutliche Reduktion nach der Behandlung mit TGF- β 1 zu erwarten war. Diese Ergebnisse können möglicherweise auf eine erhöhte basale Genexpression von CD74 in der Kontrollgruppe zurückgeführt werden. Im Rahmen einer Prä-Aktivierung durch die besonderen Umstände *in vitro* könnte es zu einer erhöhten Expression von CD74 als Aktivierungsmarker von Mikroglia gekommen sein. Die Aktivierung von primären Mikroglia und BV2 Zellen *in vitro* wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Als ursächlich für die

Aktivierung werden verschiedene Mechanismen diskutiert: Die Zellen werden aus ihrem Verbund mit Astrozyten und Neuronen gelöst. Bei der Extraktion treten sowohl bei der Gewinnung aus den embryonalen Hirnen als auch bei der Gewinnung der Mikroglia aus der Glia-Mischkultur mechanische Belastungen auf. Darüber hinaus kann auch die Inkubation mit serumhaltigem Medium aktivierend wirken, weil sie einer Verletzung der Blut-Hirn-Schranke gleichkommt. Schließlich können Mikroglia bereits bei der Kultivierung apoptotische Zellreste phagozytieren, was ebenfalls aktivierend wirken kann [2, 138, 151].

Diese Reaktionen und die damit verbundene verstärkte CD74 Expression könnten erklären, dass die Zugabe von TGF- β 1 im Vergleich mit der Kontrolle zu einer deutlichen Abnahme der CD74 Expression und der CD74 Menge führt. Ausgehend von der Annahme einer solchen Voraktivierung konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 auch eine nicht durch LPS induzierte und verstärkte *Cd74* Expression regulieren kann.

Alternativ könnten eine homöostatische Dysregulation durch eine Inkubation in serumfreiem Medium und der damit verbundene Entzug von TGF- β ursächlich für diese Veränderung sein. Zöller et al. konnten eine homöostatische Dysregulation beim Entzug des TGF- β Signals nachweisen [89].

Die erhobenen Ergebnisse sind hinsichtlich einer Übertragbarkeit auf die Verhältnisse *in vivo* methodisch einzuschränken. Denn es ist wahrscheinlich, dass im zentralen Nervensystem Regulationsmechanismen vorliegen, die einer verstärkten *Cd74* Expression entgegenwirken [149]. In der vorliegenden Studie wurde versucht, die Charakterisierung der Expression von *Cd74* durch die Verwendung einer Glia-Mischkultur und durch die Untersuchungen von Mikroglia *ex vivo* und *in vivo* zunehmend den tatsächlichen Vorgängen im ZNS anzunähern.

6.3 Die durch TGF- β regulierte *Cd74* Expression und die CD74 Präsentation in der Glia-Mischkultur

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass sowohl die Genexpression von *Cd74* als auch die Präsentation von CD74 auf der Oberfläche von Mikroglia nach der Behandlung mit T β RI in der Mischkultur signifikant erhöht wurden.

Dabei wurde die Oberflächenpräsentation der behandelten Mikroglia an den Tagen 3, 5 und 7 untersucht. Für die Inkubation über einen entsprechend langen Zeitraum wurde ein serumhaltiges Medium verwendet. Dieses Medium enthält TGF- β 1 und darüber hinaus wurde auch von den Mikroglia über den mehrtägigen Zeitraum eine relevante Menge von TGF- β 1 produziert. Die Versuchsdurchführung wurde deshalb so verändert, dass die Mischkultur mit dem TGF- β R1 Kinase Inhibitor IV (T β RI) behandelt wurde, um die Signalgebung über TGF-

β 1 auszuschalten. Dabei wurden eine Gruppe mit einem aktiven TGF- β Signal, eine Vergleichsgruppe mit einer pharmakologischen Inhibition des TGF- β Signals und eine mit LPS behandelte Gruppe verwendet. Durch dieses Vorgehen konnte eine regulatorische Funktion hinsichtlich der Expression von *Cd74* und der Oberflächenpräsentation von CD74 nachgewiesen werden. Die Inhibition des Signalweges führte zu einer erhöhten Genexpression und einer stärkeren Präsentation von CD74 auf der Zelloberfläche. Der Anstieg von CD74 als Aktivitätsmarker entspricht den Ergebnissen von publizierten Studien, in denen eine Dysregulation und Aktivierung von Mikroglia bei einer Blockade des TGF- β 1 Signals beschrieben werden [87, 89].

Allerdings sind auch die Ergebnisse nach der Behandlung der Mischkultur mit LPS interessant. Nach einer 24-stündigen Behandlung stieg die Proteinsynthese von CD74 gegenüber der Kontrolle signifikant an, während die RNA-Menge im Vergleich mit der Kontrolle signifikant verringert wurde. Auch die Oberflächendichte von CD74 sank nach 3 und 5 Tagen Behandlung mit LPS signifikant ab.

Weil die Menge von CD74 erhöht wurde, liegt es nahe, dass eine erhöhte Genexpression stattgefunden hat. Die unerwartet geringe Menge von *Cd74*-RNA und die verringerte Oberflächenpräsentation sind möglicherweise die Folge von Regulationsmechanismen: So sind etwa Astrozyten in der Lage, aktivierte Mikroglia in einen anti-inflammatorischen Zustand zu konvertieren, den sogenannten M2-Zustand [152, 153]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können nach den Resultaten von Karababa et al. erklärt werden, wobei Astrozyten in der Mischkultur die durch LPS induzierte Expression von Aktivierungsmarkern durch Mikroglia reduzieren können. Dabei wurde eine verstärkte Expression von TGF- β und IL-10 beobachtet, wodurch die Annahme einer solchen Regulation gestützt wird [152, 154, 155]. Außerdem wurde *in vivo* gezeigt, dass Astrozyten sowohl aktivierend als auch hemmend auf Mikroglia wirken können, was u. a. auf eine Beeinflussung des NF- κ B Signalwegs zurückgeführt wird [156–158]. Solche Prozesse können möglicherweise eine Erklärung für die verminderte Transkription und Präsentation von CD74 in der für die hier vorliegende Arbeit untersuchten Kultur herangezogen werden.

Dabei konnte zwar gezeigt werden, dass CD74 in der Mischkultur komplex reguliert wird, aber die genauen Mechanismen dafür blieben unklar.

Für weitere Forschungsvorhaben könnte es daher interessant sein, die Proteinsynthese in den behandelten Mikroglia über einen Zeitraum von 3, 5 und 7 Tagen zu untersuchen. Dabei ist es fraglich, ob die verminderte Präsentation von CD74 auf der Zelloberfläche durch eine insgesamt verringerte Menge von CD74 hervorgerufen wird oder ob

Umverteilungsmechanismen hier eine Rolle spielen. Ein Vergleich der Proteinsynthese mit der Oberflächenpräsentation könnte hier Klarheit ermöglichen.

Nachdem gezeigt wurde, dass die CD74 Expression von Mikroglia in der Mischkultur anders reguliert wird als in der Monokultur, wäre es in weiterführenden Studien interessant, eine Mischkultur aus Neuronen, Astrozyten und Mikroglia zu etablieren. Denn Studien konnten nachweisen, dass diese Modelle den Verhältnissen *in vivo* besser entsprechen als die Glia-Mischkulturen [159]. Üblicherweise werden solche Kulturen in einem zweiseitigen Verfahren aus einer fetalen Neuronenkultur und einer separat etablierten embryonalen Glia-Mischkultur hergestellt. Wegen des hohen Verbrauchs von Versuchstieren und dem damit verbundenen ethischen Konflikt wurde diese Methodik nicht eingesetzt. In neueren Studien wurde allerdings auch die bemerkenswerte Möglichkeit einer einschrittigen und neuralen Tri-Kultur beschrieben, für die kein zusätzlicher Bedarf an Versuchstieren besteht [159]. Eine Etablierung dieser Methode könnte in Zukunft dabei helfen, dass die *in vivo* vorliegenden Regulationsmechanismen gezielter erforscht werden können.

6.4 Eine durch LPS induzierte und TGF- β 1 regulierte Erhöhung des Anteils der p41 Untereinheit am gesamten CD74

Es konnte nachgewiesen werden, dass die primären Mikroglia in der Mono- und Mischkultur nach einer Behandlung mit LPS einen höheren Anteil von p41-CD74 produzieren. Eine solche erhöhte Expression der p41 Variante wurde bereits bei M1-aktivierten Makrophagen beobachtet [160]. In der Monokultur inhibiert TGF- β 1 die durch LPS induzierte und anteilig erhöhte Bildung von p41. In der Mischkultur ergab sich nach der Inhibition des TGF- β Rezeptors mit T β RI eine erhöhte CD74-Menge, wobei allerdings der Anteil von p41-CD74 nicht angestiegen ist. Dies könnte man damit erklären, dass eine Inhibition des TGF- β Signals und eine Behandlung mit LPS unterschiedliche Regulationsmechanismen hinsichtlich von CD74 anstoßen.

Die Rolle der p41-Variante von CD74 in Mikroglia wurde bisher wenig erforscht. Die Studien zu den Mechanismen und Funktionen von p41-CD74 bezogen sich vor allem auf Makrophagen oder andere antigenpräsentierende Zellen außerhalb des ZNS. Die Ergebnisse sind daher nur begrenzt auf Mikroglia übertragbar, sie können aber einen Einblick in die Bedeutung von p41-CD74 für Mikroglia vermitteln [161]. In Makrophagen und APZ verstärkt p41 die Antigenpräsentation und kann dabei auch die Antigen signatur beeinflussen [162–164]. Von besonderer Relevanz ist die Fähigkeit zur Inhibition von Cathepsinen und zwar vor allem von Cathepsin L und S [100, 110, 164, 165]. Die dadurch verminderte endosomale Degradierung von Antigenen wurde mit einer verstärkten Antigenpräsentation in Zusammenhang gebracht

[164]. Außerdem verlangsamt die Inhibition von Cathepsinen sowohl die Prozessierung von Antigenen als auch die Prozessierung der invarianten Kette und den damit verknüpften Austausch des an MHC 2 gebundenen CLIPs gegen Antigene [100, 110]. Darüber hinaus wird auch die Reifung von Endosomen verlangsamt [166]. Durch diese Modulation von proteolytischen Prozessen wirkt sich p41 auf die Selektion und Produktion von Antigenen aus [100]. Die Antigenpräsentation erfolgt unter dem Einfluss von p41-CD74 durch eine über einen Rezeptor vermittelte Aufnahme von Antigenen [110]. Außerdem wurde p41 als Chaperon für Cathepsin L beschrieben [160, 167]. Extrazelluläres Cathepsin L wird dadurch vor Degradierung geschützt und behält seine Aktivität trotz eines sonst inhibierend wirkenden neutralen pH-Werts bei. Funktionell erscheinen hier eine Degradierung der extrazellulären Matrix und eine damit verbundene provozierte Migration von Immunzellen als wahrscheinlich [167, 168].

Andere Studien konnten auch eine anti-inflammatorische Wirkung von p41 nachweisen. Durch LPS stimulierte BV2 Zellen, in denen experimentell Cathepsin L inhibiert wurde, zeigten eine verminderte inflammatorische Reaktion über Caspase 8 und NF- κ B [169, 170].

Zusammenfassend weisen die Studien auf eine regulatorische Funktion von p41 hin, die mit einer verstärkten und verbesserten Antigenpräsentation, einer Provokation von Immunzellmigration und einer gleichzeitigen Hemmung von Inflammation verbunden ist. In den beschriebenen Studien wird die These einer regulatorischen Funktion von p41 auf die Mikroglia-Aktivierung im Rahmen einer Entzündung zurückgeführt. Der Kontakt mit LPS als einem Bestandteil von pathogenen Keimen führte in der vorliegenden Studie zu einer verstärkten Produktion von p41-CD74 in den Mikroglia. Die beschriebenen regulatorischen und durch p41 ausgelösten Mechanismen könnten deshalb eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen spielen.

Die ausbleibende Zunahme des Anteiles von p41 am gesamten CD74 bei der Behandlung mit T β RI zeigte, dass die erhöhte Expression von CD74 bei der Inhibition des TGF- β Signalweges einem anderen Mechanismus folgt als die Expression durch eine Stimulation mit Pathogenen. Interessanterweise hemmt TGF- β 1 effektiv den durch LPS verursachten Shift in die Richtung von p41. Ob und wie TGF- β 1 Einfluss auf die Expression von p41 nimmt und über welche genauen Mechanismen diese Variante in den Mikroglia ihre Wirkung entfaltet, sollte durch weitere Studien geklärt werden.

6.5 Eine altersabhängige Oberflächenpräsentation von CD74 auf *ex vivo* isolierten Mikroglia und Peritonealmakrophagen

Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Mikroglia als auch Peritonealmakrophagen CD74 auf ihrer Oberfläche präsentieren. Aus p7 Tieren isolierte Mikroglia präsentierten signifikant weniger CD74 auf ihrer Oberfläche als die entsprechenden Peritonealmakrophagen. Bei den aus p30 isolierten Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Mikroglia und Peritonealmakrophagen sind myeloische Zellen und präsentieren typischerweise CD74 [97]. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte CD74 nicht als spezifischer Marker für Mikroglia identifiziert werden, was durch die Beutner et al. gestützt wird, die eine in Knochenmarksmakrophagen im Vergleich mit Mikroglia eine deutlich stärkere CD74-Expression nachweisen konnten [13]. In neueren Studien wurde CD74 allerdings in Einzelzellanalysen auch dafür verwendet, um eine bestimmte Subpopulation von Mikroglia bei Patienten mit Alzheimererkrankung abzugrenzen [171]. Dabei sollte kritisch hinterfragt werden, ob CD74 ein Alleinstellungsmerkmal dieser Subpopulation oder ob eine Verwechslung mit anderen myeloischen Zellen möglich war. Die bisherigen Studienergebnisse und auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie verweisen darauf, dass CD74 kein spezifischer Marker für Mikroglia ist. Allerdings bietet CD74 in Krankheitsmodellen die Möglichkeit, eine bestimmte Subpopulation von Mikroglia gegenüber anderen Subpopulationen abzugrenzen.

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante und altersabhängige Veränderung der Oberflächenexpression von CD74 auf *ex vivo* gewonnenen Mikroglia nachgewiesen werden. Mikroglia durchlaufen postnatal einen Wandel ihres Phänotyps. Ab dem 14. postnatalen Tag (p14) beginnen sie, immunologische Funktionen zu übernehmen, und um den 28. postnatalen Tag (p28) sind sie ausgereift [13, 14]. Diese Erkenntnis und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die These, dass CD74 als Oberflächenrezeptor einen Beitrag zur immunologischen Funktion von Mikroglia leistet. Eine Beteiligung von CD74 als Rezeptor an der Entwicklung von Mikroglia erscheint dagegen als unwahrscheinlich, weil eine verstärkte Präsentation erst bei einer Ausreifung der Mikroglia zu beobachten ist. Dabei sollte beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit die Gesamtmenge von CD74 nicht beurteilt wurde, da dafür eine zusätzliche Untersuchung mittels Western Blot erforderlich gewesen wäre. Denn wegen der geringen Menge von *ex vivo* gewonnenen Zellen wurde die Untersuchung vor allem mit der Durchflusszytometrie durchgeführt.

Interessant war auch der Vergleich der Oberflächenpräsentation von *in vitro* kultivierten Mikroglia mit *ex vivo* extrahierten Mikroglia. Dabei wurde CD74 von den kultivierten Mikroglia

in einem deutlich höheren Umfang auf der Oberfläche präsentiert. Im Abschnitt 6.2 wurde die Aktivierung von Mikroglia durch die Bedingungen in der *in vitro* Kultur bereits diskutiert. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass CD74 als Aktivierungsmarker für Mikroglia verwendet werden kann.

6.6 Der *in vivo* Nachweis einer verstärkten CD74 Synthese durch Mikroglia in transgenen und TGF- β Rezeptor 2 defizienten Mäusen

Anhand des TGF- β Rezeptor 2 Knockout Modells konnte gezeigt werden, dass Mikroglia in mgTgf β 2^{-/-}-Tieren am postnatalen Tag 14 (p14) signifikant mehr CD74 und MHC2 exprimieren als Mikroglia des Wildtyps. Zöller et al. konnten nachweisen, dass ein gestörtes TGF- β Signal zu einer Dysregulation der Homöostase und einer Aktivierung von Mikroglia mit einer verstärkten Expression von CD74 führt [89]. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit auf der Ebene einer verstärkten Proteinsynthese bestätigt werden. Außerdem konnte eine erhöhte Menge von MHC2 festgestellt werden. Eine verstärkte Expression dieser beiden Marker verweist auf eine immunologische Aktivierung der Mikroglia, was auch bei einer gleichzeitig verminderten Expression von TGF- β in DAMs im Modell der MS und AD beobachtet werden konnte [18, 133].

TGF- β ist ein wichtiger Faktor für die Homöostase von Mikroglia. Es blieb allerdings unklar, welche anderen Faktoren an diesem Gleichgewicht beteiligt sind und welche Faktoren die Aktivierung von Mikroglia bei einem gestörten TGF- β Signal begünstigen. In der vorliegenden Arbeit konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass der TGF- β Signalweg sowohl an der Regulation von CD74 als auch an der immunologischen Modulation von Mikroglia beteiligt ist.

6.7 Limitationen

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit aufgetretenen Limitation zusammengefasst:

1. Die BV2 Zellen sind nur teilweise mit primären Mikroglia zu vergleichen [149], [138], [150]. Deshalb wurden für eine Bestätigung der Beobachtungen sowohl BV2 Zellen als auch primäre Mikrogliazellen verwendet.
2. Sowohl BV2 Zellen als auch primäre Mikrogliazellen weisen *in vitro* einen prä-aktivierten Zustand auf. Dies sollte berücksichtigt werden, da an der beobachteten Regulation unter Umständen verschiedene aktivierte Reaktionswege beteiligt sein könnten.
3. Wegen einer ethischen Bewertung der notwendigen Tötung von Mäuseembryos für die Gewinnung von primären Mikrogliazellen musste die Wiederholungszahl für die

Experimente teilweise sehr sparsam angesetzt werden. Dabei wurde in der vorliegenden Studie ein Mittelweg zwischen einem ethisch gebotenen sparsamen Einsatz von Versuchstieren und dem Erreichen einer statistischen Relevanz gewählt.

4. Bei den Versuchen *in vitro* wurden die voraktivierten Zellen mit Einzelfaktoren behandelt (TGF- β 1, TGF- β Rezeptor Inhibitor, LPS). Durch diesen Ansatz wurde eine isolierte Betrachtung der Auswirkungen dieser Faktoren ermöglicht, wodurch allerdings die Komplexität der realen Verhältnisse *in vivo* vernachlässigt wurde. Deshalb wurden in der vorliegenden Studie auch Versuche *in vivo* durchgeführt.
5. Obwohl in der vorliegenden Studie komplexe Untersuchungen *in vivo* mit transgenen Tieren durchgeführt wurden, ergeben sich dabei dennoch gewisse Limitationen. Der CX3CR1-Rezeptor, der das Ziel für den Knockout des TGF- β Rezeptors 2 bildet, wird auch von verschiedenen anderen myeloiden Zellen exprimiert, die im Unterschied zu den Mikrogliazellen im Verlauf durch intakte und erneuerte Zellen ersetzt werden. Dennoch könnten eine Beeinflussung von anderen myeloischen Zelltypen und dabei auch peripheren Zelltypen und mögliche systemische Reaktionen zu einer Veränderung des Expressionsmusters von CD74 durch Mikroglia führen. In der vorliegenden Studie wurden aber nur die Mikroglia in den Hirnschnitten der Knockout-Tiere untersucht. Eine reaktive Veränderung des Organismus oder der anderen myeloischen Zelltypen und eine damit verbundene verstärkte Expression von CD74 durch Mikroglia können insofern nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wäre es möglich, dass die verstärkte CD74 Expression nicht durch den fehlenden TGF- β Rezeptor an den Mikroglia verursacht wurde. Seit der Durchführung dieser Versuchsreihe wurden neue transgene Mauslinien entwickelt, wie zum Beispiel die *Tmem119-Cre* oder *Hexb-CreERT2* Linien [172, 173]. Mit diesen Tieren kann ein konditioneller und für die Mikroglia spezifischer TGF- β R2 Knockout erreicht werden, wodurch die Aussagekraft des Modells erhöht werden könnte.

6.8 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde die Expression von CD74 durch Mikroglia *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. TGF- β 1 senkte die Genexpression von CD74 im Vergleich mit der Kontrollgruppe und konnte auch die durch LPS induzierte Expression von CD74 inhibieren. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie wird insofern die Rolle von TGF- β 1 als einen potenten Faktor für die Regulation und Immunmodulation der Mikroglia-Aktivierung bestätigt [40, 87]. Dabei ist es allerdings unklar, ob diese Wirkung auf eine direkte Beeinflussung der CD74-Expression oder eine Hemmung von inflammatorischen Signalwegen zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang wäre etwa eine Interaktion zwischen dem TGF- β - und dem NF- κ B Signalweg möglich [174].

Eine genauere Klärung der verminderten Expression von CD74 durch TGF- β 1 könnte in der Zukunft Möglichkeiten für eine pharmakologische Intervention in pathologisch veränderte Signalwege eröffnen.

Bei weitere Forschungsvorhaben wäre etwa eine Untersuchung der Proteinsynthese in den über einen Zeitraum von 3, 5 und 7 Tagen mit TGF- β 1 Inhibitor und LPS behandelten Mikroglia interessant. In der vorliegenden Studie blieb offen, ob die verminderte Präsentation von CD74 auf der Zelloberfläche nach einer Behandlung mit LPS auf eine insgesamt verringerte Menge von CD74 oder auch auf mögliche Umverteilungsmechanismen zurückzuführen ist. Ein Vergleich der Proteinsynthese mit der Oberflächenpräsentation könnte hier Klarheit schaffen. Die Identifizierung von Umverteilungsmechanismen, die etwa zu einer verstärkten Internalisierung des CD74 Rezeptors führen könnten, könnte zur Entwicklung verschiedener für den Rezeptor spezifischer Interventionstechniken beitragen. Denkbar wären dabei z. B. mit Chemotherapeutika gekoppelte Antikörper, die nach einer Internalisierung von CD74 den Zellzyklus von übermäßig aktivierten Mikroglia stören könnten. Dadurch könnten bei verschiedenen Krankheitsbildern gezielt die stark aktiven und möglicherweise schädlichen Subpopulationen von Mikroglia deaktiviert werden.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die pharmakologische Inhibition des TGF- β Rezeptors *in vitro* zu einer erhöhten Bildung und Präsentation von CD74 führt. *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia von mgTgf β r2^{-/-}-Tieren gegenüber dem Wildtyp verstärkt CD74 bilden. Eine verstärkte CD74-Expression und -Präsentation durch Mikroglia mit einem gestörten TGF- β Signal konnten bestätigt werden. Die von Zöller et al. durch eine RNA Sequenzierung erhobenen Ergebnisse hinsichtlich einer verstärkten CD74 Expression in mgTgf β r2^{-/-}-Tieren konnten dadurch verifiziert und erweitert werden [89].

Neben den Beobachtungen von Zöller et al. konnte eine verstärkte Genexpression von CD74 in Mikroglia auch bei pathologischen Zuständen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden [66, 68, 175]. Für verschiedene Pathologien des ZNS konnte in verschiedenen Studien ein konserviertes Programm zur Steuerung der Genexpression in Mikroglia gezeigt werden. Dieses Programm wird durch den Alterungsprozess, durch eine gestörte Homöostase oder pathologische Vorgänge in murinen Modellen für die Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung (AD / PD), die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und eine schwere Neurodegeneration induziert. Dadurch kommt es generalisiert oder in Subpopulationen von Mikroglia zur Herausbildung der für DAMs typischen Expressionssignatur [56, 57, 68, 130, 133, 171, 176]. Diese DAMs exprimieren verstärkt Gene, die mit der Phagozytose, Zellproliferation und dem Gewebeschutz in Verbindung stehen. Die Mikroglia scheinen dabei einen Zustand anzunehmen, in dem sie auf neuroinflammatorische und neurodegenerative Herausforderungen reagieren können [176].

Ein weiteres interessantes Ergebnis besteht darin, dass sich die Signatur von DAMs mit der Signatur der Mikroglia von $mgTgf\beta r2^{-/-}$ -Tieren überschneidet [89]. Diese Beobachtung verweist darauf, dass TGF- β eine Rolle bei der Regulation aktivierter Mikroglia spielt. CD74 ist ein verstärkt exprimierter Marker der DAMs, der als kritisch für den Empfang von aktivierenden Stimuli und das Auslösen einer verstärkten Aktivität der Mikroglia identifiziert wurde [177]. Im alternden Hirn erfolgt die Stimulation durch den Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), der von Neuronen ausgeschüttet wird. Als eine Folge davon steuern die aktivierten Mikroglia die weitere Rekrutierung und Aktivierung von Mikroglia und peripheren Immunzellen [66]. Über CD74 werden der ERK, MAPK und NF- κ B Signalweg aktiviert, wodurch pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet und immunologische Reaktionen der Mikroglia ausgelöst werden [117]. Die Aktivierung von NF- κ B in den Mikroglia ist typisch für DAMs und ein Kennzeichen der Neuroinflammation [178]. NF- κ B steuert immunologische Reaktionen und metabolische Vorgänge und wirkt dabei anti-apoptotisch. Eine verstärkte oder verlängerte Aktivierung von NF- κ B führt dagegen zu einer Mikroglia-Aktivierung, Neuroinflammation und einem verstärkten Zelltod [178]. Außerdem verstärkt die Aktivierung von NF- κ B die Genexpression von CD74 [179].

CD74 wird im murinen Alzheimermodell und im ZNS von Alzheimerpatienten u. a. von Mikroglia verstärkt exprimiert [135, 180, 181], wobei es etwa die Produktion von β -Amyloid Plaques hemmen kann [182]. Olah et al. beschrieben zuletzt eine CD74 reiche Subpopulation von Mikroglia, die verstärkt Gene exprimiert, die bei Patienten mit AD und einer AD-Demenz vermindert auftreten. Gewebeuntersuchungen konnten nachweisen, dass diese Subpopulation bei PatientInnen mit AD seltener vorkommt [171]. CD74 hemmt zu Beginn der Erkrankung die Produktion von β -Amyloid Plaques [132], während in späten Stadien der AD

die CD74-Expression stark ansteigt [132], wodurch möglicherweise die neurodegenerativen Vorgänge in den späten Stadien der AD gefördert werden. Studien zur Multiplen Sklerose (MS) konnten eine erhöhte CD74-Expression sowohl in präaktiven als auch in remyelinisierenden Läsionen nachweisen [60, 133].

Diese Beobachtungen bei AD und MS deuten darauf hin, dass CD74 bei Krankheitsverläufen sowohl förderlich als auch schädlich wirken kann. Die jeweilige Wirkung hängt dabei vom Krankheitsbild und der Phase der Krankheitsentwicklung ab. Neuartige Cre-Mauslinien mit einem für die Mikroglia spezifischen konditionellen Knockout, wie zum Beispiel die *Tmem119-Cre* oder *Hexb-CreERT2* Linien, können eine Ablation des TGF- β Rezeptors oder von CD74 in den Mikroglia ermöglichen und könnten daher vielversprechende Ansätze für die Erforschung der Rolle von CD74 in den Mikroglia und bei verschiedenen Krankheitsbildern ermöglichen [172, 173]. Hinsichtlich der Mikroglia und der Pathologien des ZNS allgemein kommt diesen Mauslinien das Potential zu, dass sie auch unabhängig von TGF- β und CD74 einen großen Beitrag zum Verständnis verschiedener Erkrankungen des ZNS leisten könnten.

Die genaue Ermittlung der Beteiligung von CD74 an den Stadien verschiedener Krankheitsbilder könnte in der Zukunft hilfreich für die Entwicklung von pharmakologischen Therapieansätzen sein. Entsprechende Therapeutika werden bereits eingesetzt, wie der CD74-Antikörper Milatazumab, der schon in klinischen Studien für die Therapie der CLL genutzt wurde [183]. *In vitro* Versuche konnten nachweisen, dass Milatazumab die Proliferation, Migration und Adhäsion von B-Zellen reduziert. Der Antikörper erwies sich bereits als vielversprechend für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen [184]. Ein gezielter Einsatz wäre denkbar, etwa intradural bei kritischen Phasen von ZNS-Pathologien mit einer verstärkten CD74 Expression.

In der vorliegenden Studie konnte *in vivo* gezeigt werden, dass CD74 durch einen Knockout des TGF- β Rezeptors 2 verstärkt exprimiert wird. Diese verstärkte Expression tritt dann auf, wenn sich die Mäuse in keinem pathologischen Setup befinden. Interessant wäre dabei eine *in vivo* Analyse von transgenen Mäusen mit einem T β R2 Knockout bei verschiedenen Krankheitsmodellen. So könnten der Einfluss von TGF- β oder eines TGF- β Mangels und die damit verbundene verstärkte Expression von CD74 auf verschiedene Krankheitsbilder, wie MS, Parkinson oder Schlaganfälle, untersucht werden.

Weitere Forschung in diesem Gebiet könnte zu einer Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten beitragen. Denkbar wäre etwa die Modulation des CD74-Signalweges zur Verminderung einer übermäßigen Aktivierung von Mikroglia bei neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen wie AD und MS.

Dieses Potential wurde bereits von Wang et al. gezeigt. Die Arbeitsgruppe nutzte das Konstrukt DR α 1-MOG-35-55, um die Aktivierung von CD74 durch MIF zu inhibieren [185]. Das Konstrukt führt beim murinen Schlaganfallmodell zu einem antientzündlichen Shift der Mikroglia, wodurch das Volumen der Infarktzone verringert und die Einwanderung von T-Zellen vermindert wird. Ebenso konnte es die Symptomatik beim murinen Modell der experimentellen Autoimmunenzephalitis verbessern. Die erfolgreiche therapeutische Blockade von CD74 und die damit verbundene Verbesserung des Krankheitsbildes bestätigt das große Potential dieses Ansatzes [185, 186].

VII. Zusammenfassung

Einleitung: Mikroglia sind die angestammten Immunzellen des zentralen Nervensystems, die sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen beteiligt sind. Die krankheits-assoziierten Mikroglia (DAMs) und die Mikroglia im gealterten ZNS (HAMs) sind an verschiedenen Erkrankungen des ZNS beteiligt. In den letzten Jahren konnten bei Untersuchungen von DAMs und HAMs in verschiedenen Erkrankungsmodellen eine verstärkte Expression und Aktivierung von CD74 und damit verbunden auch eine verminderte Expression und Aktivierung des TGF- β Signalweges nachgewiesen werden.

CD74 spielt als Chaperon von MHC2 eine wichtige Rolle bei der zellulären Präsentation von Antigenen und ist darüber hinaus auch ein Rezeptor, der pro-inflammatorische Reaktionen vermittelt. TGF- β 1 ist ein Faktor, der auf den Mikroglia regulatorisch und anti-inflammatorisch wirkt und maßgeblich an der Erhaltung der Homöostase beteiligt ist. Zöller et al. konnten durch eine RNA-Sequenzierung eine verstärkte CD74 Expression in Mikroglia mit einem dysfunktionalen TGF- β Signalweg nachweisen [89]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression und Präsentation von CD74 durch Mikroglia charakterisiert und der Einfluss von TGF- β auf sie untersucht.

Methoden: Für die Untersuchungen wurden BV2 Zellen, primäre Mikrogliazellen in Mono- und Mischkultur, *ex vivo* Mikroglia, Peritonealmakrophagen und *in vivo* Mikroglia von TGF- β R2^{-/-}-Tieren verwendet. Die Expression von CD74 wurde durch RT-qPCR, Western Blot und Immunhistochemie analysiert. Die Präsentation von CD74 auf der Oberfläche von Mikroglia wurde durch durchflusszytometrische Analysen untersucht.

Ergebnisse: Bakteriell Lipopolysaccharid (LPS) verstärkt die Expression von CD74 in Mikroglia auf der RNA- und Proteinebene. TGF- β 1 vermindert die Expression von CD74 und inhibiert die durch LPS verstärkte Expression. Außerdem wurde gezeigt, dass LPS den Anteil der 41 kDa Splicing-Variante des gesamten CD74 erhöht, wobei TGF- β 1 diesen Effekt inhibiert. Die pharmakologische Blockade des TGF- β Rezeptors *in vitro* führt zu einer verstärkten CD74-Präsentation. *In vivo* wurde an mgT β R2^{-/-}-Mäusen eine verstärkte Expression von MHC2 und CD74 durch einen Knockout des TGF- β Rezeptors festgestellt. In der Mischkultur erhöhte sich nach der Behandlung mit LPS auch die Menge von CD74. Die Menge von CD74-RNA und des auf der Zelloberfläche präsentierte CD74 verringert sich dagegen.

Bei der Untersuchung von *ex vivo* Zellen zeigte sich, dass reife Mikroglia (p30) in einem höheren Maße CD74 präsentieren als unreife Mikroglia (p7). Peritonealmakrophagen präsentierten zunächst stärker (p7) und später in der Entwicklung (p30) ähnlich viel CD74 wie

die Mikroglia. Bei den mit Durchflusszytometrie analysierten Zellen zeigte sich die stärkste Präsentation von CD74 durch *in vitro* kultivierte Mikroglia.

Diskussion: Mikroglia präsentieren CD74 weniger stark als Peritonealmakrophagen, weshalb CD74 kein spezifischer Marker für Mikroglia ist. Eine verstärkte CD74-Präsentation durch reife Mikroglia gegenüber unreifen Mikroglia konnte ebenfalls nachgewiesen werden, was für eine Beteiligung von CD74 an den immunologischen Vorgängen der ausgereiften Mikrogliazelle spricht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TGF- β die Expression von CD74 durch Mikroglia hemmt und die durch LPS verstärkte Expression von CD74 durch Mikroglia inhibiert. Außerdem führte die Blockade des TGF- β Signals zu einer verstärkten Expression und Präsentation von CD74. Die immun-modulatorische und anti-inflammatorische Wirkung von TGF- β 1 konnte dadurch bestätigt werden. Diese Feststellung wird durch die zusätzlich beobachtete Regulation der 41 kDa Variante gestützt, für die eine funktionelle Rolle bei der zellulären Immunreaktion beschrieben wurde.

Die Untersuchung in der Mischkultur zeigte, dass die Expression von CD74 durch Mikroglia komplex reguliert und durch die Astrozyten beeinflusst wird.

Die Aktivierung von Mikroglia und die verstärkte Expression von CD74 wurden in verschiedenen Krankheitsmodellen beobachtet. Die Rolle von CD74 konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und ist abhängig vom Krankheitsbild und vom Zeitpunkt der Krankheitsentwicklung mit protektiven und mit schädlichen Vorgängen korreliert.

CD74 vermittelt seine Wirkung über verschiedene Signalwege, wozu auch die Aktivierung von NF- κ B gehört. Diese Aktivierung wurde als ein Meilenstein bei neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben und kann möglicherweise über die Modifizierung der CD74 Expression beeinflusst werden.

Zukünftig ist eine genauere Charakterisierung der Rolle von CD74 bei verschiedenen Krankheiten und Krankheitsverläufen wichtig, um durch Hemmung oder Induktion der CD74 Expression und Aktivität Therapiestrategien entwickeln zu können.

VIII. Thesen

1. Typisch veränderte Mikroglia sind beteiligt an neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems.
2. Der TGF- β Signalweg hat regulatorische und homöostatische Wirkungen in den Mikroglia. Bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems kann dieser Signalweg vermindert ausgeprägt oder aktiviert sein.
3. CD74 dient als Chaperon für MHC2 und kann als Rezeptor inflammatorische und aktivierende Reaktionen auslösen.
4. Mikroglia in Mono- und Mischkultur produzieren nach einer Aktivierung mit LPS verstärkt CD74.
5. TGF- β 1 senkt die Expression von CD74 durch Mikroglia und inhibiert die durch LPS verstärkte Expression von CD74.
6. Die 41 kDa Variante von CD74 unterstützt die immunologische Abwehrreaktion von Mikrogliazellen. LPS erhöht den Anteil dieser Variante am gesamten CD74. TGF- β 1 inhibiert diese Erhöhung.
7. Astrozyten sind an der Regulation der Expression und Präsentation von CD74 durch Mikroglia beteiligt.
8. Die Blockade des TGF- β Signalwegs führt *in vitro* und *in vivo* zu einer verstärkten Expression von CD74. Die *in vivo* simultan verstärkte Expression von MHC2 verweist auf eine Aktivierung im Sinne einer immunologischen Reaktion.
9. Die verstärkte Präsentation von CD74 durch *in vitro* prä-aktivierte Mikroglia und die Induktion der Expression von CD74 durch Mikroglia macht deutlich, dass CD74 ein Aktivierungsmarker für Mikroglia ist.
10. Durch den Vergleich mit Peritonealmakrophagen konnte gezeigt werden, dass CD74 kein spezifischer Mikroglia-Marker ist.
11. CD74 wird in reifen Mikroglia stärker exprimiert als in unreifen. Eine besondere Beteiligung von CD74 an der Entwicklung von Mikroglia ist daher unwahrscheinlich. Der Beitrag zur immunologischen Funktion und Reife von Mikroglia durch CD74 konnte bestätigt werden.
12. BV2 Zellen sind geeignete Substituenten für die Untersuchung von CD74 an primären Mikroglia.
13. Die Charakterisierung der Rolle von CD74 bei Erkrankungen des ZNS könnte zukünftig neue Therapiekonzepte ermöglichen. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass TGF- β 1 dabei die Funktion erfüllen kann, die CD74 Expression von Mikroglia zu hemmen.

14. Zukünftig könnte die Analyse von transgenen Mäuselinien in einer Kombination mit Krankheitsmodellen zu neuen Erkenntnissen zur Rolle von CD74 und zur Rolle der TGF- β regulierten *Cd74* Expression bei verschiedenen Krankheitsbildern führen.

IX. Literaturverzeichnis

- [1] P. Rio-Hortega, „THE MICROGLIA“, *The Lancet*, Bd. 233, Nr. 6036, S. 1023–1026, Mai 1939, doi: 10.1016/S0140-6736(00)60571-8.
- [2] R. M. Ransohoff und J. E. Houry, „Microglia in Health and Disease“, *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, Bd. 8, Nr. 1, S. a020560, Jan. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a020560.
- [3] Y. Xu, M.-Z. Jin, Z.-Y. Yang, und W.-L. Jin, „Microglia in neurodegenerative diseases“, *Neural Regen Res*, Bd. 16, Nr. 2, S. 270–280, Aug. 2020, doi: 10.4103/1673-5374.290881.
- [4] L. J. Lawson, V. H. Perry, P. Dri, und S. Gordon, „Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain“, *Neuroscience*, Bd. 39, Nr. 1, S. 151–170, Jan. 1990, doi: 10.1016/0306-4522(90)90229-W.
- [5] M. Mittelbronn, K. Dietz, H. J. Schluesener, und R. Meyermann, „Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude“, *Acta Neuropathol*, Bd. 101, Nr. 3, S. 249–255, März 2001, doi: 10.1007/s004010000284.
- [6] K. Kierdorf *u. a.*, „Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways“, *Nature Neuroscience*, Bd. 16, Nr. 3, Art. Nr. 3, März 2013, doi: 10.1038/nn.3318.
- [7] R. M. Ransohoff und A. E. Cardona, „The myeloid cells of the central nervous system parenchyma“, *Nature*, Bd. 468, Nr. 7321, S. 253–262, Nov. 2010, doi: 10.1038/nature09615.
- [8] M. Greter *u. a.*, „Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia“, *Immunity*, Bd. 37, Nr. 6, S. 1050–1060, Dez. 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.001.
- [9] F. Ginhoux *u. a.*, „Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages“, *Science*, Bd. 330, Nr. 6005, S. 841–845, Nov. 2010, doi: 10.1126/science.1194637.
- [10] C. Schulz *u. a.*, „A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells“, *Science*, Bd. 336, Nr. 6077, S. 86–90, Apr. 2012, doi: 10.1126/science.1219179.
- [11] T. Goldmann *u. a.*, „Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces“, *Nat Immunol*, Bd. 17, Nr. 7, S. 797–805, Juli 2016, doi: 10.1038/ni.3423.
- [12] F. Alliot, I. Godin, und B. Pessac, „Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain“, *Developmental Brain Research*, Bd. 117, Nr. 2, S. 145–152, Nov. 1999, doi: 10.1016/S0165-3806(99)00113-3.
- [13] M. L. Bennett *u. a.*, „New tools for studying microglia in the mouse and human CNS“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 113, Nr. 12, S. E1738–E1746, März 2016, doi: 10.1073/pnas.1525528113.
- [14] A. Attaai, N. Neidert, A. von Ehr, P. S. Potru, T. Zöllner, und B. Spittau, „Postnatal maturation of microglia is associated with alternative activation and activated TGFβ signaling“, *Glia*, Bd. 66, Nr. 8, S. 1695–1708, 2018, doi: 10.1002/glia.23332.
- [15] D. Hashimoto *u. a.*, „Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes“, *Immunity*, Bd. 38, Nr. 4, Apr. 2013, doi:
-

10.1016/j.immuni.2013.04.004.

- [16] B. Ajami, J. L. Bennett, C. Krieger, W. Tetzlaff, und F. M. V. Rossi, „Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life“, *Nature Neuroscience*, Bd. 10, Nr. 12, Art. Nr. 12, Dez. 2007, doi: 10.1038/nn2014.
- [17] K. Askew *u. a.*, „Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain“, *Cell Reports*, Bd. 18, Nr. 2, S. 391–405, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.041.
- [18] O. Butovsky und H. L. Weiner, „Microglial signatures and their role in health and disease“, *Nat Rev Neurosci*, Bd. 19, Nr. 10, S. 622–635, Okt. 2018, doi: 10.1038/s41583-018-0057-5.
- [19] R. C. Paolicelli *u. a.*, „Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development“, *Science*, Bd. 333, Nr. 6048, S. 1456–1458, Sep. 2011, doi: 10.1126/science.1202529.
- [20] L. Furgeaud *u. a.*, „TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology“, *Nature*, Bd. 532, Nr. 7598, S. 240–244, Apr. 2016, doi: 10.1038/nature17630.
- [21] A. Sierra *u. a.*, „Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis“, *Cell Stem Cell*, Bd. 7, Nr. 4, S. 483–495, Okt. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014.
- [22] C. Wang *u. a.*, „Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination“, *Science*, Bd. 367, Nr. 6478, S. 688–694, Feb. 2020, doi: 10.1126/science.aaz2288.
- [23] C. N. Parkhurst *u. a.*, „Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor“, *Cell*, Bd. 155, Nr. 7, S. 1596–1609, Dez. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030.
- [24] B. Stevens *u. a.*, „The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination“, *Cell*, Bd. 131, Nr. 6, S. 1164–1178, Dez. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036.
- [25] D. P. Schafer *u. a.*, „Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner“, *Neuron*, Bd. 74, Nr. 4, S. 691–705, Mai 2012, doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- [26] Y. Shigemoto-Mogami, K. Hoshikawa, J. E. Goldman, Y. Sekino, und K. Sato, „Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone“, *J Neurosci*, Bd. 34, Nr. 6, S. 2231–2243, Feb. 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1619-13.2014.
- [27] N. Hagemeyer *u. a.*, „Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood“, *Acta Neuropathol*, Bd. 134, Nr. 3, S. 441–458, Sep. 2017, doi: 10.1007/s00401-017-1747-1.
- [28] A. Wlodarczyk *u. a.*, „A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain“, *EMBO J*, Bd. 36, Nr. 22, S. 3292–3308, Nov. 2017, doi: 10.15252/embj.201696056.
- [29] O. Butovsky *u. a.*, „Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells“, *Molecular and Cellular Neuroscience*, Bd. 31, Nr. 1, S. 149–160, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.mcn.2005.10.006.
- [30] M. Ueno *u. a.*, „Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal
-

development“, *Nature Neuroscience*, Bd. 16, Nr. 5, Art. Nr. 5, Mai 2013, doi: 10.1038/nn.3358.

[31] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, und F. Helmchen, „Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo“, *Science*, Bd. 308, Nr. 5726, S. 1314–1318, Mai 2005, doi: 10.1126/science.1110647.

[32] K. A. Kigerl, J. P. de Rivero Vaccari, W. D. Dietrich, P. G. Popovich, und R. W. Keane, „Pattern recognition receptors and central nervous system repair“, *Experimental Neurology*, Bd. 258, S. 5–16, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.expneurol.2014.01.001.

[33] B. Spittau, „Aging Microglia—Phenotypes, Functions and Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases“, *Front Aging Neurosci*, Bd. 9, Juni 2017, doi: 10.3389/fnagi.2017.00194.

[34] R. Ladeby u. a., „Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system“, *Brain Res Brain Res Rev*, Bd. 48, Nr. 2, S. 196–206, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.009.

[35] I. Sandvig, I. L. Augestad, A. K. Håberg, und A. Sandvig, „Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks“, *European Journal of Neuroscience*, Bd. 47, Nr. 12, S. 1414–1428, 2018, doi: 10.1111/ejn.13959.

[36] A. F. Lloyd, C. L. Davies, und V. E. Miron, „Microglia: origins, homeostasis, and roles in myelin repair“, *Current Opinion in Neurobiology*, Bd. 47, S. 113–120, Dez. 2017, doi: 10.1016/j.conb.2017.10.001.

[37] S. Hickman, S. Izzy, P. Sen, L. Morsett, und J. E. Khoury, „Microglia in neurodegeneration“, *Nat Neurosci*, Bd. 21, Nr. 10, S. 1359–1369, Okt. 2018, doi: 10.1038/s41593-018-0242-x.

[38] U.-K. Hanisch und H. Kettenmann, „Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain“, *Nat Neurosci*, Bd. 10, Nr. 11, S. 1387–1394, Nov. 2007, doi: 10.1038/nn1997.

[39] C. A. Baker und L. Manuelidis, „Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt–Jakob disease“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 100, Nr. 2, S. 675–679, Jan. 2003, doi: 10.1073/pnas.0237313100.

[40] X. Zhou, T. Zöller, K. Kriegstein, und B. Spittau, „TGF β 1 inhibits IFN γ -mediated microglia activation and protects mDA neurons from IFN γ -driven neurotoxicity“, *Journal of Neurochemistry*, Bd. 134, Nr. 1, S. 125–134, 2015, doi: 10.1111/jnc.13111.

[41] C. A. Colton, „Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain“, *J Neuroimmune Pharmacol*, Bd. 4, Nr. 4, S. 399–418, 2009, doi: 10.1007/s11481-009-9164-4.

[42] O. Butovsky, A. E. Talpalar, K. Ben-Yaakov, und M. Schwartz, „Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- γ and IL-4 render them protective“, *Molecular and Cellular Neuroscience*, Bd. 29, Nr. 3, S. 381–393, Juli 2005, doi: 10.1016/j.mcn.2005.03.005.

[43] J. D. Cherry, J. A. Olschowka, und M. K. O’Banion, „Neuroinflammation and M2 microglia:

the good, the bad, and the inflamed“, *J Neuroinflammation*, Bd. 11, S. 98, Juni 2014, doi: 10.1186/1742-2094-11-98.

[44] E. D. Ponomarev, K. Maresz, Y. Tan, und B. N. Dittel, „CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells“, *J Neurosci*, Bd. 27, Nr. 40, S. 10714–10721, Okt. 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1922-07.2007.

[45] M. Sawada, A. Suzumura, H. Hosoya, T. Marunouchi, und T. Nagatsu, „Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia“, *J Neurochem*, Bd. 72, Nr. 4, S. 1466–1471, Apr. 1999, doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721466.x.

[46] X. Zhou, B. Spittau, und K. Krieglstein, „TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia“, *J Neuroinflammation*, Bd. 9, S. 210, Sep. 2012, doi: 10.1186/1742-2094-9-210.

[47] Z. Li, F. Liu, X. He, X. Yang, F. Shan, und J. Feng, „Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate inflammation and demyelination of the central nervous system in EAE rats by regulating the polarization of microglia“, *Int Immunopharmacol*, Bd. 67, S. 268–280, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.001.

[48] S. E. Hickman, E. K. Allison, und J. El Khoury, „Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer’s disease mice“, *J Neurosci*, Bd. 28, Nr. 33, S. 8354–8360, Aug. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.

[49] D. R. Beers *u. a.*, „Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis“, *Brain*, Bd. 134, Nr. Pt 5, S. 1293–1314, Mai 2011, doi: 10.1093/brain/awr074.

[50] M. Prinz und J. Priller, „Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease“, *Nature Reviews Neuroscience*, Bd. 15, Nr. 5, Art. Nr. 5, Mai 2014, doi: 10.1038/nrn3722.

[51] D. M. Mosser und J. P. Edwards, „Exploring the full spectrum of macrophage activation“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 8, Nr. 12, S. 958–969, Dez. 2008, doi: 10.1038/nri2448.

[52] I. M. Chiu *u. a.*, „A neurodegeneration-specific gene expression signature and immune profile of acutely isolated microglia from an ALS mouse model“, *Cell Rep*, Bd. 4, Nr. 2, S. 385–401, Juli 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.018.

[53] R. M. Ransohoff, „A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?“, *Nature Neuroscience*, Bd. 19, Nr. 8, Art. Nr. 8, Aug. 2016, doi: 10.1038/nn.4338.

[54] F. O. Martinez und S. Gordon, „The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment“, *F1000Prime Rep*, Bd. 6, S. 13, März 2014, doi: 10.12703/P6-13.

[55] D. J. Selkoe und J. Hardy, „The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease at 25 years“, *EMBO Mol Med*, Bd. 8, Nr. 6, S. 595–608, Juni 2016, doi: 10.15252/emmm.201606210.

- [56] H. Keren-Shaul *u. a.*, „A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer’s Disease“, *Cell*, Bd. 169, Nr. 7, S. 1276-1290.e17, Juni 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018.
- [57] S. Krasemann *u. a.*, „The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases“, *Immunity*, Bd. 47, Nr. 3, S. 566-581.e9, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.
- [58] K. Srinivasan *u. a.*, „Alzheimer’s Patient Microglia Exhibit Enhanced Aging and Unique Transcriptional Activation“, *Cell Rep*, Bd. 31, Nr. 13, S. 107843, Juni 2020, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107843.
- [59] S. Hong *u. a.*, „Complement and Microglia Mediate Early Synapse Loss in Alzheimer Mouse Models“, *Science*, Bd. 352, Nr. 6286, S. 712–716, Mai 2016, doi: 10.1126/science.aad8373.
- [60] T. Masuda *u. a.*, „Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution“, *Nature*, Bd. 566, Nr. 7744, S. 388–392, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-0924-x.
- [61] J. Correale, M. I. Gaitán, M. C. Ysrraelit, und M. P. Fiol, „Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment“, *Brain*, Bd. 140, Nr. 3, S. 527–546, März 2017, doi: 10.1093/brain/aww258.
- [62] T. Goldmann und M. Prinz, „Role of Microglia in CNS Autoimmunity“, *Clin Dev Immunol*, Bd. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/208093.
- [63] A. Niraula, J. F. Sheridan, und J. P. Godbout, „Microglia Priming with Aging and Stress“, *Neuropsychopharmacology*, Bd. 42, Nr. 1, S. 318–333, Jan. 2017, doi: 10.1038/npp.2016.185.
- [64] V. H. Perry und C. Holmes, „Microglial priming in neurodegenerative disease“, *Nat Rev Neurol*, Bd. 10, Nr. 4, S. 217–224, Apr. 2014, doi: 10.1038/nrneurol.2014.38.
- [65] S. E. Hickman *u. a.*, „The Microglial Sensome Revealed by Direct RNA Sequencing“, *Nat Neurosci*, Bd. 16, Nr. 12, S. 1896–1905, Dez. 2013, doi: 10.1038/nn.3554.
- [66] C. Jin *u. a.*, „A Unique Type of Highly-Activated Microglia Evoking Brain Inflammation via Mif/Cd74 Signaling Axis in Aged Mice“, *Aging Dis*, Bd. 12, Nr. 8, S. 2125–2139, Dez. 2021, doi: 10.14336/AD.2021.0520.
- [67] Z. Cao *u. a.*, „Unique Subtype of Microglia in Degenerative Thalamus After Cortical Stroke“, *Stroke*, Bd. 52, Nr. 2, S. 687–698, Feb. 2021, doi: 10.1161/STROKEAHA.120.032402.
- [68] H. Mathys *u. a.*, „Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution“, *Cell Rep*, Bd. 21, Nr. 2, S. 366–380, Okt. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.039.
- [69] D. Mrdjen *u. a.*, „High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease“, *Immunity*, Bd. 48, Nr. 2, S. 380-395.e6, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.011.
- [70] A. A. Nugent *u. a.*, „TREM2 Regulates Microglial Cholesterol Metabolism upon Chronic Phagocytic Challenge“, *Neuron*, Bd. 105, Nr. 5, S. 837-854.e9, März 2020, doi:
-

10.1016/j.neuron.2019.12.007.

- [71] Y. Wang *u. a.*, „TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer’s Disease Model“, *Cell*, Bd. 160, Nr. 6, S. 1061–1071, März 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.
- [72] M. Morikawa, R. Derynck, und K. Miyazono, „TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Bd. 8, Nr. 5, S. a021873, Mai 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
- [73] B. Spittau, N. Dokalis, und M. Prinz, „The Role of TGF β Signaling in Microglia Maturation and Activation“, *Trends in Immunology*, S. S1471490620301526, Juli 2020, doi: 10.1016/j.it.2020.07.003.
- [74] M. M. Shull *u. a.*, „Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease“, *Nature*, Bd. 359, Nr. 6397, S. 693–699, Okt. 1992, doi: 10.1038/359693a0.
- [75] A. B. Kulkarni *u. a.*, „Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 90, Nr. 2, S. 770–774, Jan. 1993.
- [76] K. Heupel *u. a.*, „Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function“, *Neural Dev*, Bd. 3, S. 25, Okt. 2008, doi: 10.1186/1749-8104-3-25.
- [77] G. Proetzel *u. a.*, „Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion“, *Nat Genet*, Bd. 11, Nr. 4, S. 10.1038/ng1295-409, Dez. 1995, doi: 10.1038/ng1295-409.
- [78] V. Kaartinen *u. a.*, „Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction“, *Nat Genet*, Bd. 11, Nr. 4, S. 415–421, Dez. 1995, doi: 10.1038/ng1295-415.
- [79] I. B. Robertson und D. B. Rifkin, „Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Bd. 8, Nr. 6, S. a021907, Juni 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a021907.
- [80] M. O. Li, Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A.-K. L. Robertson, und R. A. Flavell, „TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES“, *Annual Review of Immunology*, Bd. 24, Nr. 1, S. 99–146, 2006, doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737.
- [81] S. Lawler *u. a.*, „The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues“, *J Biol Chem*, Bd. 272, Nr. 23, S. 14850–14859, Juni 1997, doi: 10.1074/jbc.272.23.14850.
- [82] C.-H. Heldin und A. Moustakas, „Signaling Receptors for TGF- β Family Members“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Bd. 8, Nr. 8, S. a022053, Aug. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a022053.
- [83] Y. Mu, S. K. Gudey, und M. Landström, „Non-Smad signaling pathways“, *Cell Tissue Res*, Bd. 347, Nr. 1, S. 11–20, Jan. 2012, doi: 10.1007/s00441-011-1201-y.
- [84] F. Caraci *u. a.*, „Dysfunction of TGF- β 1 signaling in Alzheimer’s disease: perspectives for
-

neuroprotection“, *Cell Tissue Res*, Bd. 347, Nr. 1, S. 291–301, Jan. 2012, doi: 10.1007/s00441-011-1230-6.

[85] O. Butovsky *u. a.*, „Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia“, *Nature Neuroscience*, Bd. 17, Nr. 1, Art. Nr. 1, Jan. 2014, doi: 10.1038/nn.3599.

[86] A. R. Bialas und B. Stevens, „TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement“, *Nat Neurosci*, Bd. 16, Nr. 12, S. 1773–1782, Dez. 2013, doi: 10.1038/nn.3560.

[87] B. Spittau, L. Wullkopf, X. Zhou, J. Rilka, D. Pfeifer, und K. Krieglstein, „Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro“, *Glia*, Bd. 61, Nr. 2, S. 287–300, Feb. 2013, doi: 10.1002/glia.22435.

[88] S. Abutbul *u. a.*, „TGF- β signaling through SMAD2/3 induces the quiescent microglial phenotype within the CNS environment“, *Glia*, Bd. 60, Nr. 7, S. 1160–1171, 2012, doi: 10.1002/glia.22343.

[89] T. Zöllner *u. a.*, „Silencing of TGF β signalling in microglia results in impaired homeostasis“, *Nat Commun*, Bd. 9, Okt. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06224-y.

[90] T. Wyss-Coray *u. a.*, „TGF- β 1 promotes microglial amyloid- β clearance and reduces plaque burden in transgenic mice“, *Nature Medicine*, Bd. 7, Nr. 5, Art. Nr. 5, Mai 2001, doi: 10.1038/87945.

[91] J.-H. Chen, K.-F. Ke, J.-H. Lu, Y.-H. Qiu, und Y.-P. Peng, „Protection of TGF- β 1 against Neuroinflammation and Neurodegeneration in A β 1–42-Induced Alzheimer’s Disease Model Rats“, *PLoS One*, Bd. 10, Nr. 2, S. e0116549, Feb. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116549.

[92] D. E. Lisbell, O.-C. Luciana, und C. Daniel, „Transforming Growth Factor Beta Type I Role in Neurodegeneration: Implications for Alzheimer’s Disease“, *Current Protein & Peptide Science*, Bd. 19, Nr. 12, S. 1180–1188, Nov. 2018.

[93] X. Chen, Z. Liu, B.-B. Cao, Y.-H. Qiu, und Y.-P. Peng, „TGF- β 1 Neuroprotection via Inhibition of Microglial Activation in a Rat Model of Parkinson’s Disease“, *J Neuroimmune Pharmacol*, Bd. 12, Nr. 3, S. 433–446, Sep. 2017, doi: 10.1007/s11481-017-9732-y.

[94] K. P. Doyle, E. Cekanaviciute, L. E. Mamer, und M. S. Buckwalter, „TGF β signaling in the brain increases with aging and signals to astrocytes and innate immune cells in the weeks after stroke“, *J Neuroinflammation*, Bd. 7, S. 62, Okt. 2010, doi: 10.1186/1742-2094-7-62.

[95] A. Ruocco *u. a.*, „A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury“, *J Cereb Blood Flow Metab*, Bd. 19, Nr. 12, S. 1345–1353, Dez. 1999, doi: 10.1097/00004647-199912000-00008.

[96] R. A. Taylor *u. a.*, „TGF- β 1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage“, *Journal of Clinical Investigation*, Bd. 127, Nr. 1, S. 280–292, 2017, doi: 10.1172/JCI88647.

[97] B. Schröder, „The multifaceted roles of the invariant chain CD74 — More than just a

chaperone“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bd. 1863, Nr. 6, Part A, S. 1269–1281, Juni 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.026.

[98] F. Borghese und F. I. Clanchy, „CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease“, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Bd. 15, Nr. 3, S. 237–251, März 2011, doi: 10.1517/14728222.2011.550879.

[99] D. Matza, A. Kerem, und I. Shachar, „Invariant chain, a chain of command“, *Trends in Immunology*, Bd. 24, Nr. 5, S. 264–268, Mai 2003, doi: 10.1016/S1471-4906(03)00073-5.

[100] M. Mihelič, A. Doberšek, G. Gunčar, und D. Turk, „Inhibitory Fragment from the p41 Form of Invariant Chain Can Regulate Activity of Cysteine Cathepsins in Antigen Presentation“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 283, Nr. 21, S. 14453–14460, Mai 2008, doi: 10.1074/jbc.M801283200.

[101] G. Malcherek, V. Gnau, G. Jung, H. G. Rammensee, und A. Melms, „Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules“, *J Exp Med*, Bd. 181, Nr. 2, S. 527–536, Feb. 1995, doi: 10.1084/jem.181.2.527.

[102] C. J. Wraight *u. a.*, „Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface.“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 265, Nr. 10, S. 5787–5792, Apr. 1990, doi: 10.1016/S0021-9258(19)39432-3.

[103] N. Koch, S. Koch, und G. J. Hammerling, „Ia invariant chain detected on lymphocyte surfaces by monoclonal antibody“, *Nature*, Bd. 299, Nr. 5884, S. 644–645, Okt. 1982, doi: 10.1038/299644a0.

[104] M. Pyrz, B. Wang, M. Wabl, und F. S. Pedersen, „A retroviral mutagenesis screen identifies Cd74 as a common insertion site in murine B-lymphomas and reveals the existence of a novel IFN γ -inducible Cd74 isoform“, *Mol Cancer*, Bd. 9, S. 86, Apr. 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-86.

[105] P. A. Roche, M. S. Marks, und P. Cresswell, „Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain“, *Nature*, Bd. 354, Nr. 6352, S. 392–394, Dez. 1991, doi: 10.1038/354392a0.

[106] „The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy“, *J Exp Med*, Bd. 180, Nr. 3, S. 1107–1113, Sep. 1994.

[107] P. Stumptner und P. Benaroch, „Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region.“, *EMBO J*, Bd. 16, Nr. 19, S. 5807–5818, Okt. 1997, doi: 10.1038/sj.emboj.7590555.

[108] L. C. Hsing und A. Y. Rudensky, „The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation“, *Immunological Reviews*, Bd. 207, Nr. 1, S. 229–241, 2005, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x.

[109] M. L. Ericson, M. Sundström, D. M. Sansom, und D. J. Charron, „Mutually exclusive binding of peptide and invariant chain to major histocompatibility complex class II antigens“, *J Biol Chem*, Bd. 269, Nr. 42, S. 26531–26538, Okt. 1994.

- [110] J.-S. Fortin, M. Cloutier, und J. Thibodeau, „Exposing the Specific Roles of the Invariant Chain Isoforms in Shaping the MHC Class II Peptidome“, *Front Immunol*, Bd. 4, S. 443, Dez. 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00443.
- [111] C. G. Odorizzi, I. S. Trowbridge, L. Xue, C. R. Hopkins, C. D. Davis, und J. F. Collawn, „Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment.“, *Journal of Cell Biology*, Bd. 126, Nr. 2, S. 317–330, Juli 1994, doi: 10.1083/jcb.126.2.317.
- [112] O. J. B. Landsverk, O. Bakke, und T. F. Gregers, „MHC II and the Endocytic Pathway: Regulation by Invariant Chain“, *Scandinavian Journal of Immunology*, Bd. 70, Nr. 3, S. 184–193, 2009, doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02301.x.
- [113] C. Beers, A. Burich, M. J. Kleijmeer, J. M. Griffith, P. Wong, und A. Y. Rudensky, „Cathepsin S controls MHC class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in vivo“, *J Immunol*, Bd. 174, Nr. 3, S. 1205–1212, Feb. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1205.
- [114] P. Ghosh, M. Amaya, E. Mellins, und D. C. Wiley, „The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3“, *Nature*, Bd. 378, Nr. 6556, S. 457–462, Nov. 1995, doi: 10.1038/378457a0.
- [115] M. F. Naujokas *u. a.*, „Potent effects of low levels of MHC class II-associated invariant chain on CD4⁺ T cell development“, *Immunity*, Bd. 3, Nr. 3, S. 359–372, Sep. 1995, doi: 10.1016/1074-7613(95)90120-5.
- [116] X. Shi *u. a.*, „CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex“, *Immunity*, Bd. 25, Nr. 4, S. 595–606, Okt. 2006, doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.020.
- [117] H. Su, N. Na, X. Zhang, und Y. Zhao, „The biological function and significance of CD74 in immune diseases“, *Inflamm Res*, Bd. 66, Nr. 3, S. 209–216, März 2017, doi: 10.1007/s00011-016-0995-1.
- [118] T. Calandra und T. Roger, „Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 3, Nr. 10, S. 791–800, 2003, doi: 10.1038/nri1200.
- [119] H. Lue *u. a.*, „Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity“, *Oncogene*, Bd. 26, Nr. 35, S. 5046–5059, Aug. 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210318.
- [120] R. A. Mitchell *u. a.*, „Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 99, Nr. 1, S. 345–350, Jan. 2002, doi: 10.1073/pnas.012511599.
- [121] Y. Gore *u. a.*, „Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces B Cell Survival by Activation of a CD74-CD44 Receptor Complex“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 283, Nr. 5, S. 2784–2792, Jan. 2008, doi: 10.1074/jbc.M703265200.
-

- [122] D. Matza, O. Wolstein, R. Dikstein, und I. Shachar, „Invariant Chain Induces B Cell Maturation by Activating a TAFII105-NF- κ B-dependent Transcription Program*“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 276, Nr. 29, S. 27203–27206, Juli 2001, doi: 10.1074/jbc.M104684200.
- [123] D. Starlets u. a., „Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival“, *Blood*, Bd. 107, Nr. 12, S. 4807–4816, Juni 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-4334.
- [124] V. Schwartz u. a., „A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4“, *FEBS Lett*, Bd. 583, Nr. 17, S. 2749–2757, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.058.
- [125] J. Bernhagen u. a., „MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment“, *Nat Med*, Bd. 13, Nr. 5, S. 587–596, Mai 2007, doi: 10.1038/nm1567.
- [126] Y. Cho u. a., „Allosteric inhibition of macrophage migration inhibitory factor revealed by ibudilast“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 107, Nr. 25, S. 11313–11318, Juni 2010, doi: 10.1073/pnas.1002716107.
- [127] S. Becker-Herman, G. Arie, H. Medvedovsky, A. Kerem, und I. Shachar, „CD74 Is a Member of the Regulated Intramembrane Proteolysis-processed Protein Family“, *Mol Biol Cell*, Bd. 16, Nr. 11, S. 5061–5069, Nov. 2005, doi: 10.1091/mbc.E05-04-0327.
- [128] F. Lantner u. a., „CD74 induces TAp63 expression leading to B-cell survival“, *Blood*, Bd. 110, Nr. 13, S. 4303–4311, Dez. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-04-087486.
- [129] J. Wang u. a., „CD74 indicates microglial activation in experimental diabetic retinopathy and exogenous methylglyoxal mimics the response in normoglycemic retina“, *Acta Diabetol*, Bd. 51, Nr. 5, S. 813–821, Okt. 2014, doi: 10.1007/s00592-014-0616-9.
- [130] I. K. Hwang u. a., „CD74-immunoreactive activated M1 microglia are shown late in the gerbil hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia“, *Mol Med Rep*, Bd. 15, Nr. 6, S. 4148–4154, Juni 2017, doi: 10.3892/mmr.2017.6525.
- [131] S. Zhang u. a., „Down-regulation of MIF by NF κ B under hypoxia accelerated neuronal loss during stroke“, *FASEB J*, Bd. 28, Nr. 10, S. 4394–4407, Okt. 2014, doi: 10.1096/fj.14-253625.
- [132] E. Castillo u. a., „Comparative profiling of cortical gene expression in Alzheimer’s disease patients and mouse models demonstrates a link between amyloidosis and neuroinflammation“, *Sci Rep*, Bd. 7, S. 17762, Dez. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17999-3.
- [133] L. A. N. Peferoen u. a., „Activation Status of Human Microglia Is Dependent on Lesion Formation Stage and Remyelination in Multiple Sclerosis“, *J Neuropathol Exp Neurol*, Bd. 74, Nr. 1, S. 48–63, Jan. 2015, doi: 10.1097/NEN.000000000000149.
- [134] R.-H. Shih, C.-Y. Wang, und C.-M. Yang, „NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review“, *Front Mol Neurosci*, Bd. 8, S. 77, Dez. 2015, doi: 10.3389/fnmol.2015.00077.
- [135] K. J. Bryan u. a., „Expression of CD74 is increased in neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease“, *Mol Neurodegener*, Bd. 3, S. 13, Sep. 2008, doi: 10.1186/1750-1326-3-13.
-

- [136] R. Meza-Romero *u. a.*, „HLA-DR α 1 constructs block CD74 expression and MIF effects in experimental autoimmune encephalomyelitis“, *J Immunol*, Bd. 192, Nr. 9, S. 4164–4173, Mai 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1303118.
- [137] E. Blasi, R. Barluzzi, V. Bocchini, R. Mazzolla, und F. Bistoni, „Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus“, *Journal of Neuroimmunology*, Bd. 27, Nr. 2–3, S. 229–237, Mai 1990, doi: 10.1016/0165-5728(90)90073-V.
- [138] A. Henn, S. Lund, M. Hedtj rn, A. Schratzenholz, P. P rziggen, und M. Leist, „The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation“, *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, Bd. 26, Nr. 2, Art. Nr. 2, Mai 2009, doi: 10.14573/altex.2009.2.83.
- [139] R. Feil, J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, und P. Chambon, „Ligand-activated site-specific recombination in mice.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 93, Nr. 20, S. 10887–10890, Okt. 1996.
- [140] Y. Wolf, S. Yona, K.-W. Kim, und S. Jung, „Microglia, seen from the CX3CR1 angle“, *Front Cell Neurosci*, Bd. 7, S. 26, März 2013, doi: 10.3389/fncel.2013.00026.
- [141] S. Yona *u. a.*, „Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis“, *Immunity*, Bd. 38, Nr. 1, S. 79–91, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001.
- [142] A. Chytil, M. A. Magnuson, C. V. E. Wright, und H. L. Moses, „Conditional inactivation of the TGF- β type II receptor using Cre:Lox“, *genesis*, Bd. 32, Nr. 2, S. 73–75, Feb. 2002, doi: 10.1002/gene.10046.
- [143] S. Srinivas *u. a.*, „Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus“, *BMC Dev Biol*, Bd. 1, S. 4, 2001, doi: 10.1186/1471-213x-1-4.
- [144] K. J. Livak und T. D. Schmittgen, „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method“, *Methods*, Bd. 25, Nr. 4, S. 402–408, Dez. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [145] P. K. Smith *u. a.*, „Measurement of protein using bicinchoninic acid“, *Analytical Biochemistry*, Bd. 150, Nr. 1, S. 76–85, Okt. 1985, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [146] V. H. Perry, D. A. Hume, und S. Gordon, „Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain“, *Neuroscience*, Bd. 15, Nr. 2, S. 313–326, Juni 1985, doi: 10.1016/0306-4522(85)90215-5.
- [147] „What is MFI? | Cytometry and Antibody Technology“. <https://voices.uchicago.edu/ucflow/2009/04/17/what-is-mfi/> (zugegriffen 11. Dezember 2021).
- [148] M. Tojo *u. a.*, „The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor- β “, *Cancer Science*, Bd. 96, Nr. 11, S. 791–800, 2005, doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00103.x.
-

- [149] S. Lund *u. a.*, „The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions“, *Journal of Neuroimmunology*, Bd. 180, Nr. 1, S. 71–87, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.07.007.
- [150] R. J. Horvath, N. Natile-McMenemy, M. S. Alkaitis, und J. A. De Leo, „Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures“, *J Neurochem*, Bd. 107, Nr. 2, S. 557–569, Okt. 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05633.x.
- [151] C. Beutner, K. Roy, B. Linnartz, I. Napoli, und H. Neumann, „Generation of microglial cells from mouse embryonic stem cells“, *Nat Protoc*, Bd. 5, Nr. 9, S. 1481–1494, Sep. 2010, doi: 10.1038/nprot.2010.90.
- [152] D. M. Norden, A. M. Fenn, A. Dugan, und J. P. Godbout, „TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation“, *Glia*, Bd. 62, Nr. 6, S. 881–895, Juni 2014, doi: 10.1002/glia.22647.
- [153] S. Kim und Y. Son, „Astrocytes Stimulate Microglial Proliferation and M2 Polarization In Vitro through Crosstalk between Astrocytes and Microglia“, *Int J Mol Sci*, Bd. 22, Nr. 16, S. 8800, Aug. 2021, doi: 10.3390/ijms22168800.
- [154] A. Karababa *u. a.*, „Ammonia Attenuates LPS-Induced Upregulation of Pro-Inflammatory Cytokine mRNA in Co-Cultured Astrocytes and Microglia“, *Neurochem Res*, Bd. 42, Nr. 3, S. 737–749, März 2017, doi: 10.1007/s11064-016-2060-4.
- [155] A. Ledebuer *u. a.*, „Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells: IL-10 and IL-10 receptor expression in glia“, *European Journal of Neuroscience*, Bd. 16, Nr. 7, S. 1175–1185, Okt. 2002, doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02200.x.
- [156] K.-J. Min, M. Yang, S.-U. Kim, I. Jou, und E. Joe, „Astrocytes Induce Hemeoxygenase-1 Expression in Microglia: A Feasible Mechanism for Preventing Excessive Brain Inflammation“, *J Neurosci*, Bd. 26, Nr. 6, S. 1880–1887, Feb. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3696-05.2006.
- [157] C. Farina, F. Aloisi, und E. Meinl, „Astrocytes are active players in cerebral innate immunity“, *Trends Immunol*, Bd. 28, Nr. 3, S. 138–145, März 2007, doi: 10.1016/j.it.2007.01.005.
- [158] X. Long *u. a.*, „Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury“, *J Neuroinflammation*, Bd. 17, S. 89, März 2020, doi: 10.1186/s12974-020-01761-0.
- [159] N. Goshi, R. K. Morgan, P. J. Lein, und E. Seker, „A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation“, *J Neuroinflammation*, Bd. 17, S. 155, Mai 2020, doi: 10.1186/s12974-020-01819-z.
- [160] C. Beers, K. Honey, S. Fink, K. Forbush, und A. Rudensky, „Differential Regulation of Cathepsin S and Cathepsin L in Interferon γ -treated Macrophages“, *J Exp Med*, Bd. 197, Nr. 2, S. 169–179, Jan. 2003, doi: 10.1084/jem.20020978.
-

- [161] B. A. Durafourth *u. a.*, „Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages“, *Glia*, Bd. 60, Nr. 5, S. 717–727, 2012, doi: 10.1002/glia.22298.
- [162] M. Peterson und J. Miller, „Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain gene product p41“, *Nature*, Bd. 357, Nr. 6379, S. 596–598, Juni 1992, doi: 10.1038/357596a0.
- [163] B. Fineschi, L. S. Arneson, M. F. Naujokas, und J. Miller, „Proteolysis of major histocompatibility complex class II-associated invariant chain is regulated by the alternatively spliced gene product, p41“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 92, Nr. 22, S. 10257–10261, Okt. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.22.10257.
- [164] B. Fineschi, K. Sakaguchi, E. Appella, und J. Miller, „The proteolytic environment involved in MHC class II-restricted antigen presentation can be modulated by the p41 form of invariant chain.“, *The Journal of Immunology*, Bd. 157, Nr. 8, S. 3211–3215, Okt. 1996.
- [165] T. Bevec, V. Stoka, G. Pungercic, I. Dolenc, und V. Turk, „Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L“, *J Exp Med*, Bd. 183, Nr. 4, S. 1331–1338, Apr. 1996, doi: 10.1084/jem.183.4.1331.
- [166] O. J. B. Landsverk, N. Barois, T. F. Gregers, und O. Bakke, „Invariant chain increases the half-life of MHC II by delaying endosomal maturation“, *Immunol Cell Biol*, Bd. 89, Nr. 5, S. 619–629, Juli 2011, doi: 10.1038/icb.2010.143.
- [167] A.-M. Lennon-Duménil *u. a.*, „The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L“, *EMBO J*, Bd. 20, Nr. 15, S. 4055–4064, Aug. 2001, doi: 10.1093/emboj/20.15.4055.
- [168] E. Fiebiger *u. a.*, „Invariant Chain Controls the Activity of Extracellular Cathepsin L“, *J Exp Med*, Bd. 196, Nr. 9, S. 1263–1270, Nov. 2002, doi: 10.1084/jem.20020762.
- [169] S. Xu, H. Zhang, X. Yang, Y. Qian, und Q. Xiao, „Inhibition of cathepsin L alleviates the microglia-mediated neuroinflammatory responses through caspase-8 and NF- κ B pathways“, *Neurobiology of Aging*, Bd. 62, S. 159–167, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.030.
- [170] T. Zavašnik-Bergant und M. Bergant Marušič, „Exogenous Thyropin from p41 Invariant Chain Diminishes Cysteine Protease Activity and Affects IL-12 Secretion during Maturation of Human Dendritic Cells“, *PLoS One*, Bd. 11, Nr. 3, S. e0150815, März 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0150815.
- [171] M. Olah *u. a.*, „Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer’s disease“, *Nat Commun*, Bd. 11, Nr. 1, S. 6129, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-19737-2.
- [172] T. Kaiser und G. Feng, „Tmem119-EGFP and Tmem119-CreERT2 Transgenic Mice for Labeling and Manipulating Microglia“, *eNeuro*, Bd. 6, Nr. 4, Juli 2019, doi: 10.1523/ENEURO.0448-18.2019.
- [173] T. Masuda *u. a.*, „Novel Hexb-based tools for studying microglia in the CNS“, *Nat Immunol*, Bd. 21, Nr. 7, S. 802–815, Juli 2020, doi: 10.1038/s41590-020-0707-4.
-

- [174] K. Luo, „Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Bd. 9, Nr. 1, S. a022137, Jan. 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a022137.
- [175] L. Shi u. a., „Genome-wide transcriptomic analysis of microglia reveals impaired responses in aged mice after cerebral ischemia“, *J Cereb Blood Flow Metab*, Bd. 40, Nr. 1 Suppl, S. S49–S66, Dez. 2020, doi: 10.1177/0271678X20925655.
- [176] I. R. Holtman u. a., „Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis“, *Acta Neuropathologica Communications*, Bd. 3, Nr. 1, S. 31, Mai 2015, doi: 10.1186/s40478-015-0203-5.
- [177] J. Lier, W. J. Streit, und I. Bechmann, „Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes“, *Cells*, Bd. 10, Nr. 9, S. 2236, Aug. 2021, doi: 10.3390/cells10092236.
- [178] E. C. Dresselhaus und M. K. Meffert, „Cellular Specificity of NF- κ B Function in the Nervous System“, *Frontiers in Immunology*, Bd. 10, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01043.
- [179] L. Zhu und P. P. Jones, „Transcriptional control of the invariant chain gene involves promoter and enhancer elements common to and distinct from major histocompatibility complex class II genes“, *Mol Cell Biol*, Bd. 10, Nr. 8, S. 3906–3916, Aug. 1990, doi: 10.1128/mcb.10.8.3906-3916.1990.
- [180] S. Sekar u. a., „Alzheimer’s disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes“, *Neurobiol Aging*, Bd. 36, Nr. 2, S. 583–591, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.027.
- [181] Y. Yoshiyama, K. Arai, T. Oki, und T. Hattori, „Expression of invariant chain and pro-cathepsin L in Alzheimer’s brain“, *Neurosci Lett*, Bd. 290, Nr. 2, S. 125–128, Aug. 2000, doi: 10.1016/s0304-3940(00)01326-4.
- [182] S. Matsuda, Y. Matsuda, und L. D’Adamio, „CD74 interacts with APP and suppresses the production of A β “, *Molecular Neurodegeneration*, Bd. 4, Nr. 1, S. 41, Okt. 2009, doi: 10.1186/1750-1326-4-41.
- [183] E. Hertlein u. a., „Milatuzumab immunoliposomes induce cell death in CLL by promoting accumulation of CD74 on the surface of B cells“, *Blood*, Bd. 116, Nr. 14, S. 2554–2558, Okt. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-11-253203.
- [184] D. Frölich u. a., „The anti-CD74 humanized monoclonal antibody, milatuzumab, which targets the invariant chain of MHC II complexes, alters B-cell proliferation, migration, and adhesion molecule expression“, *Arthritis Res Ther*, Bd. 14, Nr. 2, S. R54, März 2012, doi: 10.1186/ar3767.
- [185] J. Wang u. a., „DR α 1-MOG-35-55 Reduces Permanent Ischemic Brain Injury“, *Transl Stroke Res*, Bd. 8, Nr. 3, S. 284–293, Juni 2017, doi: 10.1007/s12975-016-0514-2.
- [186] G. Benedek u. a., „A novel HLA-DR α 1-MOG-35-55 construct treats experimental stroke“, *Metab Brain Dis*, Bd. 29, Nr. 1, S. 37–45, März 2014, doi: 10.1007/s11011-013-9440-0.
-

Veröffentlichungen

Jahn J, Bollensdorf A, Kalischer C, Piecha R, Weiß-Müller J, Potru PS, Ruß T, Spittau B. Microglial CD74 Expression Is Regulated by TGF β Signaling. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(18):10247. <https://doi.org/10.3390/ijms231810247>

Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, mich von ganzem Herzen bei den Personen zu bedanken, die mich in meiner experimentellen Arbeit und bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Björn Spittau danken. Die Vergabe dieses spannenden Themas und die hervorragende Betreuung ermöglichten mir die Erstellung dieser Arbeit und gaben mir den Raum, mich auch über diese Dissertation hinaus für die experimentelle Wissenschaft zu begeistern.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Phani Potru, Tamara Ruß, Johannes Wurm, Robin Piecha und Jana Weiß-Müller. Ich danke euch für die großartige Unterstützung, die Einarbeitung und die Begleitung meiner experimentellen Arbeit und für die vielen Ratschläge und Hilfeleistungen.

Auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Anatomie der Universität Rostock bedanke ich mich für die mir stets entgegengebrachte Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meine universitäre Ausbildung ermöglichten, mich jederzeit mit voller Hingabe unterstützen und stets hinter mir stehen. Außerdem danke ich meiner Schwester Katharina, die mir stets als Vorbild und als Stütze zur Seite steht. Ich danke euch für alles.

Weiter danke ich meiner Partnerin Antonia, die ich im Rahmen dieser Arbeit kennenlernen durfte. Du hast mich nicht nur durch unzählige Stunden im Labor begleitet, sondern mich auch sonst auf jede Art und zu jeder Zeit unterstützt. Ich danke dir von Herzen!

Außerdem danke ich den vielen Freunden, die mich emotional und wissenschaftlich bei dieser Arbeit unterstützten und sich in dieses komplexe Thema einarbeiteten. Insbesondere gilt mein Dank meinem Nachbarn Dr. Volker Wendt für seine eingebrachte Erfahrung und die wertvollen Anmerkungen und Hinweise.

Lebenslauf

Jahn, Jannik

02.07.1994 in Jever

Akademische Laufbahn

2013 bis 2015		Studium der Humanmedizin an der Universität Marburg
2015 bis 2021		Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
06/2021		Approbation als Arzt
01/2018	und	Promotion zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin
laufend		<i>Charakterisierung der TGF-β regulierten CD74 Expression in Mikroglia</i> , betreut von Prof. Dr. med. B. Spittau (Leiter des Anatomischen Instituts Bielefeld, vorher stellvertretender Leiter des Instituts für Anatomie Rostock)

Berufliche Laufbahn

04/2021	und	Assistenzarzt in Weiterbildung für Orthopädie und Unfallchirurgie,
laufend		Orthopädische Universitätsklinik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Klinische Erfahrungen

12/2020	bis	Victoria Hospital, Südafrika – PJ Tertian Chirurgie
04/2021		
09/2020	bis	Kantonsspital Luzern, Schweiz – PJ Tertian Orthopädie & Unfallchirurgie
12/2020		
05/2020	bis	Klinik für Onkologie/Palliativmedizin, Universitätsklinikum Rostock –
09/2020		PJ Tertian Innere Medizin
08/2019		Innere Medizin, Mnazi Mmoja Hospital, Tanzania – Famulatur
08/2018		Kardiologie, Praxis Holzhausen & Eckard, Rostock – Famulatur
08/2016		Allgemeinchirurgie, Yves Demandt, Rostock – Famulatur
07/2016		Allgemeinmedizin, Praxis Auerbach & Mantel, Oldenburg – Famulatur
03/2016		Gastroenterologie, Praxis Dr. Nowak, Rostock – Famulatur
02/2016		Allgemeinchirurgie, Asklepios Klinik Altona, Hamburg – Famulatur

Publikationen

12/2021 Kretzschmar F, Piecha R, **Jahn J**, Potru PS, Spittau B. Characterization of the Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor B4 (*Lilrb4*) Expression in Microglia. *Biology (Basel)*. 2021 Dec 9;10(12):1300. doi: 10.3390/biology10121300. PMID: 34943215; PMCID: PMC8698765.

09/2022 **Jahn J**, Bollensdorf A, Kalischer C, Piecha R, Weiß-Müller J, Potru PS, Ruß T, Spittau B. Microglial CD74 Expression Is Regulated by TGF β Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(18):10247. <https://doi.org/10.3390/ijms231810247>

Schulbildung

06/2009 Allgemeine Hochschulreife, Herbartgymnasium Oldenburg und Cäcilienchule Oldenburg

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und wurde in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden gilt.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)