Aus der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

Der Einfluss des Hüllproteins des pathogenen humanen endogenen Retrovirus Typ W auf den Phänotyp primärer neonataler Mikrogliazellen der Wistar-Ratte im Kontext der Multiplen Sklerose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lisa Marleen Sogorski

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. phil. Patrick Küry Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kremer, D., Gruchot, J., Weyers, V., Oldemeier, L., Göttle, P., Healy, L., Ho Jang, J., Kang T Xu, Y., Volsko, C., Dutta, R., Trapp, B.D., Perron, H., Hartung, H.-P. and Küry, P. (2019), "pHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 116 No. 30, pp. 15216–15225

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Pathogenese bislang nicht abschließend geklärt ist. Als möglicher pathogener Ko-Faktor bei ihrer Entstehung wird das Hüllprotein (ENV) des sogenannten pathogenen humanen endogenen Retrovirus Typ W diskutiert, da epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen einer Aktivierung dieses Virus und der Prognose und dem Verlauf der MS nachweisen konnten. In zahlreichen experimentellen Studien konnte ein proinflammatorischer Effekt des ENV auf Zellen des Immunsystems und des Gehirns gezeigt werden. Darüber hinaus scheint ENV das endogene Regenerationspotenzial des ZNS zu beeinträchtigen, da eine verminderte Differenzierungsfähigkeit Oligodendrozyten-Vorläuferzellen von unter ENV-Stimulation beobachtet werden konnte. In Vorarbeiten zu dieser Dissertation zeigten *post mortem* Analysen des Hirnparenchyms von MS Patienten, dass ENV positive Mikrogliazellen in MS-typischen Läsionen zu finden sind, den ENV-Rezeptor TLR4 exprimieren und in direktem Kontakt zu Axonen stehen. Mikrogliazellen sind gehirnspezifische Gewebsmakrophagen, die orientierend in zwei Phänotypen mit unterschiedlicher Funktion eingeteilt werden können: in einen eher proinflammatorischen Phänotyp, der aktiv an Entzündungsprozessen beteiligt ist. sowie in einen eher antiinflammatorischen Phänotyp. der bei Reparaturprozessen eine wichtige Rolle spielt. Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens wurde untersucht, inwieweit eine Stimulation von Mikrogliazellen durch rekombinantes ENV zu einer Aktivierung beziehungsweise einer Änderung des mikroglialen Phänotyps führt, und diskutiert dies im Kontext der pathologischen Prozesse bei MS. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten kultivierten primären Mikrogliazellen aus der Wistar-Ratte den ENV-Rezeptor TLR4 exprimieren und dass eine Stimulation dieser Zellen mit ENV zu einer verstärkten Genexpression proinflammatorischer Faktoren, wie IL-6, IL-1β, TNF-α und iNOS, führt. Konsekutiv bewirkte die gesteigerte Genexpression auch eine erhöhte Konzentration der entsprechenden Moleküle TNF-α und Stickstoffmonoxid. Darüber hinaus entwickelten mit ENV stimulierte Mikrogliazellen eine amöboide Morphologie und zeigten eine verminderte Migration. Diese Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass ENV bei Mikrogliazellen einen proinflammatorischen Phänotyp induziert, der für degenerative Prozesse an Axonen, wie sie insbesondere bei progressiven Verlaufsformen der MS beobachtet werden, mitverantwortlich sein könnte.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system (CNS), whose pathogenesis has not yet been finally clarified. As a possible pathogenic co-factor in MS development, the envelope protein (ENV) of the so-called pathogenic human endogenous retrovirus type W is considered, since epidemiological studies have already demonstrated a connection between the activation of this virus and the prognosis and the course of MS. In addition, the proinflammatory effect of the ENV on cells of the immune system and the brain itself was shown in numerous experimental studies. Furthermore, ENV also appeared to impair the endogenous regeneration potential of the CNS, as a reduced ability to differentiate of oligodendrocyte progenitor cells was observed with ENV-stimulation. In direct preliminary work for this dissertation, post mortem analyzes of the brain parenchyma of MS patients showed that ENV positive microglial cells can be found in MS lesions, which expressed the ENV receptor TLR4 and were in direct contact with axons. Microglial cells are brainspecific tissue macrophages that can be divided into two phenotypes with different functions: a rather pro-inflammatory phenotype, which is actively involved in inflammatory processes, and a rather anti-inflammatory phenotype, which have an important role in repair processes. As part of this doctoral project, the author investigated whether ENV-stimulation leads to activation or change in the microglial phenotype and discusses this in the context of the pathological processes in MS. The author was able to show that the examined primary microglial cells from the Wistar rat express the ENV receptor TLR4 and that stimulation of these cells with recombinant ENV leads to an increased gene expression of pro-inflammatory factors, such as IL-6, IL-1 β , TNF- α and iNOS. The increased gene expression also caused an increased concentration of the TNF-α and corresponding molecules nitrogen monoxide. In addition. ENV-stimulated microglial cells develop an ameboid morphology and show reduced migration. These findings indicate that ENV induces a pro-inflammatory phenotype in microglial cells, which could be responsible for degenerative processes on axons, what is particularly observed in progressive MS stages.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
anti-EBNA1	Antikörper gegen das nukleäre Antigen 1 (EBNA-1) des EBV
CD14	Cluster of Differentiation 14
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre
	Desoxyribonukleinsäure)
CIS	clinically isolated syndrome (Klinisch isoliertes Syndrom)
CSF-1	colony stimulating factor 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENV	envelope protein (pHERV-W-Hüllprotein)
ENV-SU	ENV surface moiety (Oberflächeneinheit des ENV)
ENV-TM	ENV transmembrane moiety (Transmembraneinheit des ENV)
FBS	fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HERV	Humanes Endogenes Retrovirus
pHERV-W	pathogenes Humanes Endogenes Retrovirus Typ W
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IGF-1	insulin-like growth factor 1
lgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LTR	Long Terminal Repeats (lange DNA-Wiederholungseinheit)
LPS	Lipopolysaccharide
MEM	Minimum essential medium
MG	Mikrogliazellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG 35-55	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein 35-55
MS	Multiple Sklerose
MSRV	Multiple Sklerose-assoziiertes Retrovirus
NAWM	<i>normal appearing white matter (</i> Normal erscheinende weiße Substanz)
NGS	Normal goat serum (Normales Ziegenserum)
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
ODC	Ornithindecarboxylase
OVZ	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PBMC	<i>peripheral blood monocytic cells</i> (periphere mononukleäre Zellen des Blutes)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PPMS	primary progressive MS (Primär progrediente MS)
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
rF	relative Luftfeuchtigkeit
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNS	reactive nitrogen species (reaktiven Stickstoffspezies)
RRMS	relapsing-remitting MS (schubförmig remittierende MS)
RT	Raumtemperatur
SPMS	secondary progressive MS (Sekundär chronisch progrediente MS)

TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
UpM	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
h	Stunde
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
pg	Picogramm
S	Sekunde

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Verlaufsformen und klinische Manifestation	2
1.1.3 Pathologie	3
1.2 Mikrogliazellen	6
1.3 Pathogenes humanes endogenes Retrovirus Typ W	9
1.3.1 Humane endogene Retroviren	9
1.3.2 Pathogenes humanes endogenes Retrovirus Typ W	11
1.4 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2 Material und Methoden 2.1 Material	14 14
 2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 	14 14 18
 2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen 	14 14 18 18
 2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen 2.2.2 Immunzytochemie 	14 14 18 18 21
 2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen 2.2.2 Immunzytochemie 2.2.3 RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und qPCR 	14 14 18 18 21 21
 2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen 2.2.2 Immunzytochemie 2.2.3 RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und qPCR 2.2.4 TNF-α-ELISA 	14 14 18 18 21 21 24
 2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen 2.2.2 Immunzytochemie 2.2.3 RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und qPCR 2.2.4 TNF-α-ELISA 2.2.5 NO-Kolorimetrie 	14 14 18 21 21 24 25
 2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen 2.2.2 Immunzytochemie 2.2.3 RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und qPCR 2.2.4 TNF-α-ELISA 2.2.5 NO-Kolorimetrie 2.2.6 Morphologie 	14 14 18 18 21 21 24 25 26
2 Material und Methoden 2.1 Material 2.2 Methoden 2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen 2.2.2 Immunzytochemie 2.2.3 RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und qPCR 2.2.4 TNF-α-ELISA 2.2.5 NO-Kolorimetrie 2.2.6 Morphologie 2.2.7 Migrationsverhalten	14 14 18 21 21 24 25 26 28

3	Ergebnisse	30
	3.1 Etablierung der Zellkultur aus primären Mikrogliazellen	30
	3.2 Verminderte TLR4-Genexpression durch ENV in TLR4 positiven	
	Mikrogliazellen	31
	3.3 ENV induziert eine proinflammatorische Genexpression in Mikrogliazellen	32
	3.4 ENV beeinflusst die TNF-α- und NO-Konzentration	39
	3.5 ENV beeinflusst die Morphologie von Mikrogliazellen	40
	3.6 ENV vermindert die mikrogliale Migration	42
4	Diskussion	43
	4.1 ENV induziert in Mikrogliazellen einen proinflammatorischen Phänotyp	43
	4.1.1 ENV supprimiert die TLR4-Genexpression	43
	4.1.2 ENV induzierte Genexpression	44
	4.1.3 ENV verändert die mikrogliale Morphologie und Migration	47
	4.2 Zukünftige Studien, ENV im Kontext zur Multiplen Sklerose, ein	
	therapeutischer Ansatz?	49
	4.3 Schlussfolgerung	52
5	Literaturverzeichnis	53
6	Danksagung	71

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Als Erstbeschreiber der Multiplen Sklerose (MS) gilt der Franzose Jean-Martin Charcot, der in seiner 1868 verfassten Schrift "Histologie de la sclérose en einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen plaques" klinischen Symptomen und postmortalen histologischen Veränderungen beschrieb (Charcot 1868; Gomes und Engelhardt 2013). Die Multiple Sklerose ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) im jungen Erwachsenenalter (World Health Organization 2008; Browne et al. 2014), deren Prävalenz in Zentraleuropa auf 62-128 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner geschätzt wird (Kingwell et al. 2013). Anhand von Abrechnungsdaten der deutschen Gesetzlichen Krankenversicherungen aus dem Jahr 2010 wird jedoch eine deutlich höhere Prävalenz angenommen, mit 289 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern in Deutschland (Petersen et al. 2014). Insgesamt sind mehr Frauen als Männer betroffen, laut WHO etwa in einem Verhältnis von 2:1 (World Health Organization 2008). Tendenziell scheint sich das Verhältnis weiter zulasten eines steigenden Frauenanteils zu entwickeln (Alonso und Hernan 2008; Koch-Henriksen und Sørensen 2010). Eine einzelne kausale Ursache der Multiplen Sklerose konnte bisher nicht identifiziert werden, weswegen aktuell eine multifaktorielle Genese angenommen wird (Belbasis et al. 2015). Einerseits zeigt sich eine genetische Prädisposition, im Sinne einer familiären Häufung mit einem erhöhten Krankheitsrisiko für nahe Familienmitglieder (O'Gorman et al. 2013). Unter anderem wiesen verschiedene Polymorphismen im Major Histocompatibility Complex (MHC)-Loci, insbesondere das HLA-DRB1*15:01, eine Assoziation zur Multiplen Sklerose auf (Sawcer et al. 2011). Andererseits scheinen Umweltfaktoren im Zusammenhang mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko zu stehen. So steht die Krankheitsprävalenz in Abhängigkeit zur geographischen Lage, mit höheren Prävalenzen in äquatorfernen Ländern, wie beispielsweise Westeuropa,

Nordamerika Südaustralien. verglichen niedrigeren und mit einem Erkrankungsrisiko in äguatornahen Regionen, wie Südamerika, Südeuropa und Asien (Kurtzke et al. 1979; Alonso und Hernan 2008; Koch-Henriksen und Sørensen 2010; Simpson, JR et al. 2011). Die Erklärungen für dieses Phänomen sind vielfältig, so wird ein erniedrigtes Erkrankungsrisiko in der dunkelhäutigen Bevölkerung diskutiert (Kurtzke et al. 1979; Langer-Gould et al. 2013), die bessere Diagnostik in äquatorfernen Ländern oder die protektive Wirkung erhöhter Sonnenexposition in äguatornahen Gebieten, bzw. das davon abhängig gebildete Vitamin D3 (Munger et al. 2004; Islam et al. 2007). Einen weiteren umweltassoziierten Risikofaktor der Multiplen Sklerose scheinen Virusinfektionen darzustellen (Hernán et al. 2001). Ein besonderes Augenmerk gilt hierbei dem Epstein-Barr-Virus (EBV, Synonym: Humanes Herpesvirus 4, HHV4), das sowohl zu einer asymptomatischen Infektion, als auch zu dem Krankheitsbild einer infektiösen Mononukleose führen kann. Circa 90 % der gesunden erwachsenen Bevölkerung weisen anti-EBV-Antikörper (anti-EBV-AK) auf, wohingegen fast 100 % der erwachsenen an Multiple Sklerose Erkrankten seropositiv für anti-EBV-AK sind (Ascherio et al. 2001; Levin et al. 2010; Ascherio und Munger 2010). Metaanalysen zeigten sowohl eine Assoziation zwischen dem Vorliegen von anti-EBNA1-Antikörpern (IgG-AK gegen das nukleäre Antigen 1 (EBNA-1) des EBV), als auch eine Assoziation der infektiösen Mononukleose zur Multiplen Sklerose (Belbasis et al. 2015). Des Weiteren sind Lebensstilfaktoren, wie Nikotinabusus und Übergewicht mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert (Belbasis et al. 2015; Gianfrancesco et al. 2017).

1.1.2 Verlaufsformen und klinische Manifestation

Die Multiple Sklerose manifestiert sich im Durchschnitt um das 30. Lebensjahr und wird, abhängig vom Krankheitsverlauf, in vier Subtypen gegliedert (Goodin 2014; Lublin et al. 2014). Das Klinisch isolierte Syndrom (*clinically isolated syndrome*, CIS) ist dabei die erste klinische Manifestation einer möglichen Multiplen Sklerose, die jedoch die formalen Diagnosekriterien einer Multiplen Sklerose, die zeitliche

und räumliche Dissemination, noch nicht erfüllt (Lublin et al. 2014; Thompson et al. 2018). Circa 85 - 90 % der Patienten leiden bei Erkrankungsbeginn an einer schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose (relapsing-remitting MS, RRMS). Sie ist definiert als ein schubförmiges Auftreten neurologischer Defizite, die sich vollständig oder unvollständig zurückbilden. Ein Krankheitsprogress zwischen den Schüben tritt nicht auf. Im Mittel 16 Jahre nach Erkrankungsbeginn geht in ca. 40 % - 65 % der Fälle diese Verlaufsform in eine sekundär progrediente Multiple Sklerose (secondary progressive MS, SPMS) über, die durch einen Krankheitsprogress mit oder ohne aufgelagerte Schübe charakterisiert ist (Compston und Coles 2008; Leray et al. 2016). In 10 – 20 % der Fälle kommt es bereits bei Erkrankungsbeginn zu einer kontinuierlichen Behinderungszunahme ohne Schubereignisse, definiert als primär progrediente Multiple Sklerose (primary progressive MS, PPMS; (Lublin und Reingold 1996; Compston und Coles 2008; Lublin 2014; Goodin 2014). Die klinischen Symptome der Multiplen Sklerose können, bedingt durch die unterschiedlichen Lokalisationen von Läsionen, sehr heterogen sein. So tritt beispielsweise im Rahmen einer Läsion des Sehnervs eine Sehstörung auf, andere häufige Symptome sind Sensibilitätsstörungen, Fatigue, Ataxie und Blasen- und Darmbeschwerden (Richards et al. 2002; Compston und Coles 2008). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Zunahme körperlicher Einschränkungen und letztendlich zu einer Reduktion der Lebenserwartung um circa 6 - 14 Jahre (Scalfari et al. 2013).

1.1.3 Pathologie

Der genaue Auslöser der Multiplen Sklerose ist bisher unbekannt (Belbasis et al. 2015). In Hinsicht auf die Pathogenese wurde zunächst angenommen, dass die Multiple Sklerose als Autoimmunerkrankung nach einer peripheren Aktivierung zu einer Infiltration von autoreaktiven T-Lymphozyten, aktivierten B-Zellen und Monozyten in das ZNS führt. Inzwischen wird auch ZNS-residenten Zellen, wie den Mikrogliazellen, eine wesentliche Rolle im weiteren Krankheitsprozess zugeschrieben (Weiner 2004; Dendrou et al. 2015; O'Loughlin et al. 2018). Das

charakteristische neuropathologische Korrelat der Multiplen Sklerose sind fokale entzündliche Läsionen, gekennzeichnet durch den Verlust von Myelinscheiden (Demyelinisierung), Narbenbildung (Gliose) und insbesondere im späteren Verlauf der Erkrankung durch axonale und neuronale Schädigung (Neurodegeneration) (Compston und Coles 2008; Dendrou et al. 2015). Die von Oligodendrozyten gebildeten Myelinscheiden des ZNS ermöglichen durch das Umwickeln der Axone von Nervenzellen unter anderem eine schnelle und effiziente Weiterleitung elektrischer Signale. Bei einer Schädigung der Myelinscheiden resultiert daher eine gestörte Erregungsleitung (Simons und Nave 2016). Die für die Multiple Sklerose typischen Veränderungen betreffen sowohl die weiße als auch die graue Substanz des ZNS. also des Gehirns und/oder des Rückenmarks. Prädilektionsorte sind der Sehnerv, das Rückenmark, der Hirnstamm, das Kleinhirn und die periventrikuläre weiße Substanz (Popescu und Lucchinetti 2012). Es wird angenommen, dass am Anfang der Läsionsbildung durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke und die Infiltration von peripheren Immunzellen in das ZNS eine perivenöse Demyelinisierung steht, die in das umliegende Gewebe expandiert und schließlich zu einer Läsion konfluiert. Durch die Demyelinisierung kommt es auch zu einer Aktivierung von Astrozyten, die im Verlauf eine gliöse Narbe bilden. Andererseits kann durch Rekrutierung und Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen eine Remyelinisierung der betroffenen Axone stattfinden (Prineas et al. 1993; Lassmann 2018). In aktiven Läsionen lassen sich eine gestörte Blut-Hirn-Schranke, sowie eine Vielzahl eingewanderter peripherer Immunzellen, wie Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen nachweisen (Dendrou et al. 2015). Jedoch lassen sich auch in remyelinisierten oder inaktiven Läsionen, sowie in der so genannten normal erscheinenden weißen Substanz (normal appearing white matter; NAWM) Entzündungszellen nachweisen (Frischer et al. 2009). Demyelinisierung und Neurodegeneration sind dabei mit aktivierten Makrophagen im Zentrum der demyelinisierten aktiven Läsionen assoziiert. Am Rand der Läsionen findet sich hingegen eine ausgeprägte Aktivierung von Mikrogliazellen, die sich auch in geringerem Umfang im umliegenden Gewebe und in der normal erscheinenden weißen Substanz nachweisen lässt (Lassmann 2018). Mit Fortschreiten der Erkrankung findet sich statt aktiver Läsionen eine zunehmende diffuse Infiltration des Hirngewebes mit inflammatorischen T- Zellen und B-Zellen,

aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten, sowie eine fortschreitende Neurodegeneration und Atrophie der grauen und weißen Substanz (Dendrou et al. 2015).

1.2 Mikrogliazellen

Mikrogliazellen (MG) sind die Gewebsmakrophagen des ZNS und machen circa 10 - 15 % der ortsständigen Zellen des ZNS aus (Tamashiro et al. 2012; Nayak et al. 2014; Chu et al. 2018). Im Gegensatz zu anderen Makrophagen entstehen Mikrogliazellen jedoch nicht aus dem hämatopoetischen System des Knochenmarks, sondern aus myeloiden Vorläuferzellen des Dottersacks, von wo sie in das ZNS einwandern (Alliot et al. 1999). Mikrogliazellen sind Zellen des angeborenen Immunsystem und erkennen und reagieren auf schädigende Einflüsse wie Gewebeschäden oder Infektionen durch Produktion von Zytokinen, Phagozytose und direkte Zytotoxizität (Chu et al. 2018). Des Weiteren sind Mikrogliazellen an regulatorischen Prozessen im ZNS beteiligt, im Rahmen derer sie die Gehirnentwicklung und die neuronale Plastizität beeinflussen und die Homöostase aufrechterhalten (Orihuela et al. 2016; Chu et al. 2018). Mikrogliazellen können ihren funktionellen Phänotyp anpassen, um auf Umgebungsreize zu reagieren (Orihuela et al. 2016). Ähnlich wie Makrophagen wurden sie entsprechend ihrer in vitro Reaktion auf bekannte Mediatoren für lange Zeit in einen proinflammatorischen, sogenannten "M1"und einen antiinflammatorischen, sogenannten "M2"-Phänotyp eingeteilt. Typische Reize für eine M1-Differenzierung, auch "klassische Aktivierung" genannt, sind eine Stimulation mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon-y. Sie führen sowohl im Tiermodell, als auch in humanen Mikrogliazellen in vitro zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-1a, IL-1ß, IL-6, IL-12, IL-23, TNF-α), Chemokine (CCL2 und CCL20) und über eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO; (Colton 2009; Orihuela et al. 2016) (Abb. 1 (M1)). Zusätzlich verändern klassisch aktivierte Mikrogliazellen ihre Morphologie, hin zu einem amöbenähnlichen, runden und abgeflachten Zellkörper (Kloss et al., 2001; Lively and Schlichter, 2013). Die alternative Aktivierung, beispielsweise durch IL-4/IL-13, führt dahingegen zur Induktion eines antiinflammatorischen Phänotyps mit einer verstärkten Expression von beispielsweise Arginase 1, CD206 und Mannose-Rezeptor, sowie zur Freisetzung entzündungshemmender Faktoren wie IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-1RA,

FIZZ1 und PPARγ (Colton 2009; Orihuela et al. 2016; Chu et al. 2018) (Abb. 1 (M2)).



Abb. 1: Darstellung der klassischen und alternativen Aktivierung von MG zu einem M1 bzw. M2 Phänotyp (Lizenznummer: 4340911218177 (Orihuela et al. 2016)).

Zunehmend wird jedoch die oben beschriebene Einteilung der Mikrogliazellen in Frage gestellt, da sie die Komplexität in vivo, z.B. im Sinne intermediärer Phänotypen, die zwischen "M1" und "M2" liegen, nicht ausreichend wiederspiegelt (Jha et al. 2016; Ransohoff 2016; Dubbelaar et al. 2018). Eine Balance zwischen eher proinflammatorischen und eher antiinflammatorischen Mikrogliazellen scheint den Krankheitsprogress der Multiplen Sklerose zu beeinflussen. So wurde postuliert, dass die proinflammatorische Aktivierung von beispielsweise Mikrogliazellen mit der Schwere der Multiplen Sklerose korreliert (Jha et al. 2016; Politis et al. 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen im Rahmen der Multiplen Sklerose an Demyelinisierung und Neurodegeneration über die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Moleküle beteiligt sind (Kutzelnigg et al. 2005; Chu et al. 2018; Lassmann 2018). Andererseits spielen Mikrogliazellen bei Reparaturprozessen eine Rolle, beispielsweise indem sie über die Beseitigung von Myelinresten die Remyelinisierung unterstützen (Lampron et al. 2015; Orihuela et al. 2016). In Läsionen der Multiplen Sklerose sind sowohl ZNS-residente Mikrogliazellen, als auch über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke infiltrierte Monozyten, im Gewebe dann zu Makrophagen differenziert, nachweisbar. Die

Differenzierbarkeit dieser beiden Zelltypen erscheint aufgrund ähnlicher morphologischer und funktioneller Eigenschaften jedoch schwierig und ist Inhalt aktueller Forschung (Chu et al. 2018; Li und Barres 2018). Wie bereits im Abschnitt 1.1.3 dargestellt sind die typischerweise in der RRMS zu findenden aktiven Läsionen charakterisiert durch eine diffuse Infiltration verschiedenster Entzündungszellen, unter anderem Mikrogliazellen und Makrophagen. Zu Beginn der aktiven Läsionen exprimieren Mikrogliazellen und Makrophagen überwiegend proinflammatorische Charakteristika, die mit einer Gewebeschädigung assoziiert sind. Im zeitlichen Verlauf einer aktiven Läsion findet eine Verschiebung zu antiinflammatorischen Markern statt. die wiederum mit einer entzündungshemmenden Wirkung und Remyelinisierung assoziiert sind. In der progressiven Verlaufsform der Multiplen Sklerose dominieren langsam expandierende bzw. chronische Läsionen, charakterisiert durch ein hypozelluläres, demyelinisiertes Zentrum umgeben von einem Randsaum proinflammatorischer Makrophagen und Mikrogliazellen, assoziiert mit axonaler Degeneration (Chu et al. 2018; O'Loughlin et al. 2018; Guerrero und Sicotte 2020).

1.3 Pathogenes humanes endogenes Retrovirus Typ W

1.3.1 Humane endogene Retroviren

Im Jahre 2001 wurde mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms deutlich, dass etwa 8 % unserer DNA aus ursprünglich retroviraler Erbinformation besteht (Lander et al. 2001). Diese retrovirale Erbinformation umfasst Elemente wie gag, das für Strukturproteine kodiert, pol, das für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase kodiert, env, das für Hüllproteine kodiert, sowie Long Terminal Repeats (LTRs), die die Expression viraler Gene steuern (Lander et al. 2001). Bei einer Infektion durch exogene Retroviren erfolgt zunächst die Transkription der retroviralen RNA in Doppelstrang DNA, die anschließend in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Betrifft dieser Vorgang Keimbahnzellen werden die retroviralen Elemente, integriert in das Wirtsgenom, an die folgende Generation weitervererbt. Die ursprünglich exogenen Retroviren werden auf diese Weise "endogenisiert", sodass man im Fall des menschlichen Genoms schließlich von humanen endogenen Retroviren (HERV) spricht (Bannert und Kurth 2006). Die Sequenzen der HERV finden sich mehrfach kopiert an verschiedenen Lokalisationen im Genom, was durch Reinfektionen und Retrotransposition innerhalb der DNA zu erklären ist (Parseval und Heidmann 2005). Seit der Integration der ältesten HERV vor circa 60 - 70 Millionen Jahren unterlagen die meisten endogenen Retroviren jedoch inaktivierenden Mutationen, wie Deletionen und Rekombinationsprozessen (Griffiths 2001; Bannert und Kurth 2006). Bedingt durch diese Prozesse besitzen nur wenige dieser retroviralen Elemente eine Sequenzlänge, die potenziell ausreichend für ein vollständiges Genprodukt ist. Von diesen Genen weisen noch weniger ein offenes Leseraster (open reading frame, ORF) auf, mit dem sie einer kodierenden Funktion nachkommen können. So zeigten Parseval et al. im Jahr 2003, dass von 467 potenziell kodierenden ENV-Genen nur 16 Sequenzen tatsächlich ein offenes Leseraster besitzen, deren RNA in unterschiedlicher Aktivität im Gewebe 19 gesunder Probanden nachgewiesen werden konnte (Parseval et al. 2003). Diese ENV-Sequenzen scheinen dem evolutionären Selektionsdruck standgehalten zu haben.

möglicherweise als Träger physiologischer Prozesse (Parseval und Heidmann 2005). Unter anderem zeigte ein Tiermodell, dass die Oberflächen einer mit einem endogenen Retrovirus infizierten Zelle, diese vor einer Infektion durch andere exogene Retroviren schützt, vermutlich da die Rezeptoren bereits blockiert sind (Varela et al. 2009; Grandi und Tramontano 2018). Darüber hinaus zeigen einige ENV fusogene Eigenschaften. So kodiert das ERVWE1, Mitglied der HERV-W Familie, für ein vollständiges ENV-W, auch Syncytin-1 genannt. Syncytin-1 ist an der physiologisch notwendigen Fusion humaner Trophoblasten zu Syncythiotrophoblasten und an deren Homöostase beteiligt (Blond et al. 2000; Mi et al. 2000; Frendo et al. 2003). Neben den potenziell physiologischen Funktionen der HERV gibt es jedoch auch Assoziationen verschiedener HERV zu beim Menschen auftretenden Erkrankungen. Hinsichtlich Autoimmunerkrankungen zeigt sich eine Assoziation von HERV-W, HERV-H, HERV-K, HRES-1 und HER-15 zu Multipler Sklerose (Morandi et al. 2017), von HERV-K zu Amyotropher Lateralsklerose (Douville et al. 2011; Li et al. 2015), von HERV-E und HRES-1 zu Systemischem Lupus erythematodes (Ogasawara et al. 2001; Pullmann et al. 2008; Caza et al. 2014; Wu et al. 2015), von HERV-K und HERV-K10 zu Rheumatoider Arthritis (Ejtehadi et al. 2006; Reynier et al. 2009; Freimanis et al. 2010; Mameli et al. 2017), von HERV-K113 zum Sjögren Syndrom (Moyes et al. 2005) und von HERV-K18 zu Juveniler idiopathischer Arthritis (Sicat et al. 2005). Zudem bestehen Assoziationen von HERV zu verschiedenen Malignomen, wie dem Mammakarzinom, Lymphom, dem Adenokarzinom der Lunge, Thymom, Melanom, Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom und Tumoren der Testes (Dolei 2006; Voisset et al. 2008), sowie zu psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie und bipolaren Störungen (Frank et al. 2005; Dolei 2006; Perron et al. 2012b).

1.3.2 Pathogenes humanes endogenes Retrovirus Typ W

Das pathogene humane endogene Retrovirus Typ W (pHERV-W), früher Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus genannt (multiple sclerosis-associated retrovirus, MSRV), gehört zur sogenannten HERV-W Familie (Humanes endogenes Retrovirus Typ W) und ist damit Mitglied der Klasse I HERV. Das für das pHERV-W Hüllprotein (ENV) kodierende Gen ist 1629 Nukleotide lang, das abgeleitete Protein besteht aus 542 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 58 Kilodalton und wird in eine Oberflächeneinheit (ENV-SU) und eine Transmembraneinheit (ENV-TM) unterteilt (Dolei und Perron 2009; Perron et al. 2013). pHERV-W war das erste HERV, das in einen Zusammenhang mit Multipler Sklerose gebracht werden konnte. So beschrieben Perron et al. erstmalig 1989 Viruspartikel und Reverse Transkriptase Aktivität in einer leptomeningealen Zellkultur eines an Multiplen Sklerose erkrankten Patienten. Die gleichen Viruspartikel konnten auch im Serum von an Multipler Sklerose erkrankter Patienten nachgewiesen werden (Perron et al. 1989; Perron et al. 1991; Perron et al. 1997). In den darauf folgenden Jahren wiesen verschiedene Arbeitsgruppen eine erhöhte Expression von pHERV-W RNA oder pHERV-W Protein in Liquor, Blut und Hirngewebe nach (Garson et al. 1998; Dolei et al. 2002; Mameli et al. 2007; Perron et al. 2012a). Das pHERV-W ist zudem nicht nur mit der Diagnose einer Multiplen Sklerose assoziiert, sondern eine gesteigerte Proteinexpression des pHERV-W korreliert mit einem beschleunigten Krankheitsprogress und einer vermehrten Konversionsrate zur SPMS (Sotgiu et al. 2010; Morandi et al. 2017). Weitere Studien zeigten, dass die Expression der pHERV-W Proteine im ZNS überwiegend auf Makrophagen und Mikrogliazellen zurückzuführen ist (van Horssen et al. 2016). Als Auslöser der pHERV-W ENV Expression im Rahmen der Multiplen Sklerose wird unter anderem eine Transaktivierung der endogenen retroviralen regulatorischen LTR durch verschiedene Herpesviren diskutiert, die wiederrum selber mit der Multiplen Sklerose assoziiert sind. So führt beispielsweise das Hüllprotein des Epstein Barr Virus (EBV) in humanen Blut- und Gehirnzellen zu einer ENV Expression (Perron und Lang 2010; Mameli et al. 2012; Nellåker et al. 2006). ENV aktiviert Zellen des angeborenen Immunsystems über seinen Hauptrezeptor Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und seinen Ko-Rezeptor Cluster of Differentiation 14 (CD14; (Rolland et al.

2005; Rolland et al. 2006). TLR4 gehört zur Familie der Toll-like Rezeptoren und somit zur Gruppe der Pattern-Recognition Receptors. Hierbei handelt es sich um Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, der ersten Verteidigungslinie gegen beispielsweise bakterielle Infektionen. Zusammen mit CD14 führt die Aktivierung von TLR4 durch ENV über intrazelluläre Signalkaskaden zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (Peri et al. 2010). Neben den zunächst entdeckten exogenen Liganden (pathogen-associated molecular patterns), wie beispielsweise den Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien, existieren auch endogene Liganden (damage-associated molecular pattern molecules). Endogene Liganden des TLR4, wie HMGB1 (High-Mobility-Group-Protein B1), welches nach Zellschädigung bzw. Nekrose freigesetzt wird, initiieren eine TLR4 vermittelte Entzündungsreaktion. Somit ist TLR4 an infektiösen, wie auch an nichtinfektiösen Entzündungsprozessen beteiligt (Peri et al. 2010; Molteni et al. 2016). Studien untersuchten den Effekt des ENV auf verschiedene Zelltypen und zeigten in vitro eine Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN-γ, IL-6, IL-12p40, IL-10, IL-1 β und TNF- α in humanen peripheren mononukleäre Zellen des Blutes (peripheral blood monocytic cells; PBMCs; (Rolland et al. 2005)). Zusätzlich zeigte sich eine ENV-SU induzierte Reifung antigenpräsentierender dendritischer Zellen, die zu einer Differenzierung naiver CD4+-T-Helferzellen zu Th1-ähnlichen T-Lymphozyten führt (Rolland et al. 2005; Rolland et al. 2006). In Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der Ratte vermindert ENV TLR4-abhängig die Differenzierungsfähigkeit, erhöht die Expression proinflammatorischer Zytokine induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase und und supprimiert die Myelinproduktion (Kremer et al., 2013; Kremer et al., 2015). Anhand der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, untersuchten Perron et al., inwieweit ENV in der Lage ist einen autoimmunen neuroinflammatorischen Prozess zu induzieren. In der EAE wird normalerweise durch das Freunds-Adjuvans, einem Lysat aus Mykobakterien zusammen mit Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) 35-55; eine Autoimmunität gegen Myelinproteine induziert. Durch das Ersetzen des Freunds-Adjuvans durch ENV entsteht zusammen mit MOG 35-55 ebenfalls eine dosisabhängige Inflammation (Perron et al. 2013).

1.4 Ziele der Arbeit

Vorausgehende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wiesen immunhistochemisch in aktiven und chronischen Läsionen von Multiple Sklerose Patienten ENV-positive Mikrogliazellen nach. Diese Mikrogliazellen exprimierten den ENV-Rezeptor TLR4 und standen in direktem Kontakt mit myelinisierten Axonen und umhüllten diese (Kremer et al. 2019). Wie zuvor ausführlich dargestellt sind aktivierte Mikrogliazellen in allen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose präsent und insbesondere an Demyelinisierung und Neurodegeneration beteiligt, indem sie proinflammatorische Zytokine und Moleküle produzieren. Andererseits sind sie auch an regenerativen Prozessen, wie der Remyelinisierung beteiligt (Lampron et al. 2015; Lassmann 2018; Chu et al. 2018). Diese Dissertation widmet sich daher der Fragestellung, welchen Einfluss das Hüllprotein des pathogenen humanen endogenen Retrovirus Typ W auf den Phänotyp von Mikrogliazellen in vitro hat. Zunächst erfolgte die Etablierung einer Zellkultur mit primären Mikrogliazellen aus neonatalen Wistar-Ratten. Die Charakterisierung des Phänotyps der Mikrogliazellen erfolgte nach der Stimulation mit rekombinantem ENV, verglichen mit einer Kontrollpopulation, welche als Zusatz die Pufferlösung des ENV erhielt. Der Phänotyp der untersuchten Mikrogliazellen wurde im Rahmen dieses Promotionsvorhabens anhand folgender Charakteristika analysiert:

- die Veränderung molekularer Aspekte, gemessen anhand von Genexpression und Proteinproduktion
- eine Veränderung funktionaler Aspekte, analysiert durch die Veränderung der Zellmorphologie und des Migrationsverhaltens

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tiere

Für die Herstellung der Zellkultur von primären Mikrogliazellen wurden die Cortices neonataler Wistar-Ratten genutzt (P0). Die Ratten wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter pathogenfreien und definierten Bedingungen (21 °C, 50 % rF, 12 h Tag/Nacht Zyklus, Futter und Wasser nach Belieben) gezüchtet. Die Entnahme und Aufarbeitung des Gewebes erfolgten durch die biologisch-technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe (Organentnahme-Nr.: 069/11).

Zellkultur

Accutase	eBioscience, Frankfurt am Main
Albumin (BSA-V)	Gibco, Karlsruhe
CD11b/c (Microglia) MicroBeads rat	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DNAse I type IV	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ENV (Rekombinantes pHERV- W Hüllprotein)	GeNeuro, Geneva, Schweiz

ENV-Puffer (20 mM Histidin, 5 % Saccharose, 0,01 % Polysorbat 20, pH 6,0)	GeNeuro, Geneva, Schweiz
Fetal Bovine Serum (FBS)	Lonza, Basel, Schweiz
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Leibovitz's L-15 Medium	Gibco, Karlsruhe
Minimum essential medium (MEM)	Gibco, Karlsruhe
MS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Papain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Basel, Schweiz
T-75 Zellkulturflaschen, -schalen und - wells	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Trypanblau	Lonza, Basel, Schweiz
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Immunzytochemie, Morphologie und Migration

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldirch, Taufkirchen
Alexa Fluor 594 Antikörper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Citifluor	Citifluor, Leicester, England
mouse anti-TLR4 Antikörper	Abcam, Cambridge, England
Normal goat serum (NGS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt

Phalloidin-Fluorescein Isothiocyanate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Labeled (FITC)	
x-well Objektträger (2-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturkammer auf PCA-	
Objektträger)	

RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und quantitative PCR

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR amplification primers	MWG Biotech, Ebersberg
Power SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

TNF-α, NO

Nitric Oxide Assay Kit, Colorimetric	Calbiochem, Darmstadt
TNF alpha Rat ELISA Kit	Abcam, Cambridge, England

Technisches Equipment und Software

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
EBA 12	Hettich, Tuttlingen

Excella E24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen			
GraphPad Prism 8 (Version 8.1.4)	GraphPad Software, San Diego, USA			
Heraeus Hera Safe incubator	Heraeus, Hanau			
Infinite 200Pro	Tecan, Männedorf			
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach			
Microsoft Excel 2016 MSO (Version 1.5)	Microsoft, Redmond, USA			
Nikon eclipse TE200 Microscope	Nikon, Düsseldorf			
NIS Elements Advanced Research (Version 4.20)	Nikon, Düsseldorf			
Sequence Detection Systems (Version 2.3)	Applied Biosystems, Darmstadt			
Tecan i-control (Version 1.7.1.12)	Tecan, Männedorf			
Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt			

2.2 Methoden

2.2.1 Gemischte ZNS-Kultur und Isolation von Mikrogliazellen

Die für die Versuche genutzten primären Mikrogliazellen wurden aus ZNS-Mischkulturen isoliert, die von den biologisch-technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe nach dem Protokoll von McCarthy und de Vellis (McCarthy und Vellis 1980) hergestellt wurden. Die Cortices von neonatalen Wistar-Ratten (P0) wurden in MEM-HEPES Medium gesammelt und anschließend für 25 s bei 2000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und zu dem Zellpellet wurde MEM-HEPES Medium, das zusätzlich 40 µg/mL DNAse I Type IV, 0,24 mg/mL L-Cystein und 30 U/mL Papain enthielt, hinzugegeben. Nach 45 min Inkubation bei 37 °C, 98 % relativer Luftfeuchtigkeit (rF) und 5 % CO₂ wurde 1 mL Trypsin-Inhibitor-Lösung hinzugegeben (1 mg/mL Trypsin-Inhibitor, 50 mg/mL Albumin BSA-V, 40 µg/mL DNAse I Type IV in 1 mL Leibovitz's L-15 Medium) und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und durch 1 mL der oben beschriebenen Trypsin-Inhibitor-Lösung ersetzt. Zu der durch Mischen mit einer Glaspasteurpipette entstandenen Zellsuspension wurden 10 mL DMEM-Medium mit 10 % FBS gegeben und für 5 min bei 1200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit einer Glaspasteurpipette in 15 mL Kulturmedium (DMEM, 10 % FBS, 4 mM L-Glutamin, 5000 U/mL Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. In T-75 Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) wurden jeweils 5 mL der Zellsuspension und 15 mL des Kulturmediums vermischt und bei 37 °C, 98 % rF und 5 % CO₂ inkubiert. Die hergestellte ZNS-Mischkultur enthält Mikrogliazellen, Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.

Isolation primärer Mikrogliazellen

Nach zehn Tagen Wachstum der ZNS-Mischkultur wurden die Mikrogliazellen isoliert. Zu diesem Zweck wurden die Flaschen für 1,5 h bei 180 UpM (Excella E24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen) geschüttelt, wodurch sich die Mikrogliazellen vom Flaschenboden lösten. Astrozyten und Oligodendrozyten verblieben auf der Zellkulturschale. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und jeweils 10 mL davon auf Zellkulturschalen verteilt. Nach einer ersten Inkubation bei 37 °C, 98 % rF und 10 % CO2 von 10 min adhärierten die Mikrogliazellen auf der Oberfläche der Zellkulturschalen. Der Überstand wurde abgesaugt und PBS hinzugefügt. Dieser Waschschritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt, um andere Zelltypen zu entfernen. Nachdem der Überstand zum letzten Mal abgesaugt wurde, wurden 2 mL Accutase zu den Mikrogliazellen gegeben und für 5 min bei 37 °C, 98 % rF und 10 % CO₂ inkubiert, wodurch sich die Mikrogliazellen vom Boden der Zellkulturschalen lösten. Die Accutase wurde mit 3 mL Mikrogliazellen-Medium (DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S; (Tamashiro et al. 2012)) inaktiviert und die Zellsuspension für 10 min bei 1500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 mL Mikrogliazellen-Medium resuspendiert. Nachdem die Zellen mithilfe einer Thoma Zählkammer (jeweils 10 µL Zellsuspension und 10 µL Trypanblau) gezählt wurden, wurden die Mikrogliazellen je nach Versuch in Mikrogliazellen-Medium wie folgt ausgesät: 50.000 Zellen/Coverslip in 2 mL für Immunzytochemie, 150.000 Zellen/6-Well in 100.000 Zellen/x-well-Kammer 3 mL für q-PCR, in 1,5 mL für Morphologieexperimente, 30.000 Zellen/6-Well in 50 µL für Migrationsexperimente und 50.000 Zellen/96-Well 100 μL für TNF-α-ELISA bzw. NO-Kolorimetrie. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C, 98 % rF und 10 % CO₂ wurde das Medium durch ENV-haltiges Mikrogliazellen-Medium $(1 \mu g/mL)$ ENV) oder Mikrogliazellen-Kontrollmedium (ENV-Puffer) ersetzt.

Isolation primärer Mikrogliazellen durch MACS® Separation

Als zweite Methode zur Herstellung einer Zellkultur aus primären Mikrogliazellen wurde die MACS® Separation genutzt. Um die Reinheit der Zellkultur zu erhöhen, wurde eine MACS® mittels CD11b/c MicroBeads von Miltenyi Biotec gemäß dem Protokoll des Herstellers genutzt. Ebenfalls nach 1,5-stündigem Schütteln der ZNS-Mischkultur wurde der Überstand aus den T-75-Flaschen für 10 min bei 1500 UpM zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 80 µL MACS-Puffer gelöst (PBS + 0,5 % BSA, 2-8 °C). Die Zellsuspension wurde mit 20 µL der CD11b/c MicroBeads (2-8 °C) vermischt und für 15 min bei 2-8 °C inkubiert, wodurch eine magnetische Markierung der CD11b/c-positiven Mikrogliazellen erfolgt. Durch Hinzufügen von 2 mL des MACS-Puffers und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 1500 UpM wurden die Zellen gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 500 µL MACS-Puffer gelöst. Die entsprechende Aufreinigungssäule (MS Column) wurde im magnetischen Feld des MACS Separators (MACS MultiStand) platziert und mit 500 µL MACS-Puffer vorgespült. Beim anschließenden Durchlaufen der Zellsuspension durch die Aufreinigungssäule halten die Mikrogliazellen magnetisch durch die Markierung mit den CD11b/c MicroBeads in der Säule. Die nicht markierten, CD11b/c negativen Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit 500 µL des MACS-Puffers entfernt. Durch das Herausnehmen der Säule aus dem magnetischen Feld und anschließendem Spülen der Säule mit 1 mL MACS-Puffer wurden die Mikrogliazellen danach von der Säule eluiert. Um die Reinheit der Mikrogliazellen noch weiter zu erhöhen, wurde der oben geschilderte Vorgang mit einer neuen Säule wiederholt. Die Zellsuspension wurde anschließend 10 min bei 1500 UpM zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in 1 mL Mikrogliazellen-Medium (DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S) gelöst und die Zellen mit einer Thoma Zählkammer (10 µL Zellsuspension und 10 µL Trypanblau) gezählt. Die Aussaat der Zellen erfolgte wie im ersten Protokoll beschrieben.

2.2.2 Immunzytochemie

Anhand indirekter Immunzytochemie erfolgte der Nachweis von TLR4 in den untersuchten kultivierten primären Mikrogliazellen. Die 50.000 Mikrogliazellen/Coverslip in 2 mL wurden 10 min mit PFA (4 %) fixiert und daraufhin drei Mal mit PBS gewaschen. Nachdem die Zellen 30 min mit NGS (10 %) blockiert wurden, folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (Maus anti-TLR4 Antikörper, Abcam, 1:1000) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur 2 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Alexa Fluor 594 Antikörper, Molecular Probes, 1:1000). Danach wurden die Mikrogliazellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen und die Zellkerne 20 s mit DAPI angefärbt. Die Coverslips wurden anschließend Citifluor bedeckten auf einen mit Objektträger angebracht. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte unmittelbar, die Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

2.2.3 RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und qPCR

Die RNA Aufbereitung, cDNA Synthese und anschließende quantitative PCR von Zelllysaten kultivierter Mikrogliazellen diente der quantitativen Auswertung der mikroglialen Genexpression. Für die Aufreinigung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) in Kombination mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) und das dazugehörige Herstellerprotokoll genutzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Mikrogliazellen mit 350 μL Lysepuffer (0,1 M β-Mercaptoethanol und RLT-Puffer, Qiagen, 1:100) lysiert. Durch eine zweiminütige Zentrifugation durch eine QIAshredder spin column bei 14.000 UpM wurde das Zelllysat zunächst homogenisiert. Die Flüssigkeit in dem Sammelröhrchen wurde anschließend mit 350 μL Ethanol (70 %) vermischt und das Gemisch in eine RNeasy spin column transferiert. Durch erneutes Zentrifugieren bei 10.000 UpM für 2 min wurde die RNA an die Membran der Säule gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Nachfolgend wurde die Membran durch die Zugabe von 350 μL RW1-Puffer und

Zentrifugation bei 10.000 UpM für 2 min gewaschen und der Durchfluss verworfen. Um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden wurden 80 µL DNase-Gemisch (10 µL DNase und 70 µL RDD Puffer) auf die Membran pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Mit 350 µL RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation für 2 min bei 10.000 UpM wurden die DNA-Reste aus der Membran gelöst, der Durchfluss verworfen. Danach folgten zwei weitere Waschschritte jeweils mit 500 µL RPE-Puffer und einer Zentrifugation für 2 min bei 10.000 UpM. Nachdem die Reste des RPE-Puffers durch eine Zentrifugation für 2 min bei 14.000 UpM entfernt wurden, inkubierte die RNA in der Membran für 3 min bei RT mit 30 µL RNasefreiem Wasser. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 10.000 UpM für 2 min wurde die aufbereitete RNA von der Membran eluiert, in einem neuen Sammelröhrchen aufgefangen und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert. Mithilfe des High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) und dem dazugehörigen Herstellerprotokoll wurden die RNA-Proben anschließend in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurden zu 10 µL der aufbereiteten RNA 10 µL des Reaktionsgemisches hinzugefügt, das folgende Komponenten enthielt: 2 µL 10x RT Buffer, 0,8 µL 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µL 10x RT Random Primers, 1 µL MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µL RNase Inhibitor, 3,2 µL Nucleasefree H₂O. Die reverse Transkription wurde anschließend in einem Veriti Thermo Cycler (Applied Biosystems) mit folgenden Schritten durchgeführt: Schritt 1: 10 min bei 25 °C, Schritt 2: 120 min bei 37 °C, Schritt 3: 5 s bei 85 °C. Für die gPCR wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) gemäß dem Protokoll des Herstellers und ein 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) genutzt. Zunächst wurden 5 µL der cDNA mit 25 µL des Reaktionsgemisches (1,8 µL Primer forward, 1,8 µL Primer reverse, 6,4 µL LiChrosolv H₂O (Merck), 15 µL Power SYBR Green; bzw. für das housekeeping Gen GAPDH: 1,8 µL GAPDH forward, 0,3 µL GAPDH reverse, 7,9 µL LiChrosolv H₂O (Merck), 15 µL Power SYBR Green). Die Sequenzen der genutzten Primer sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Primer		
rGAPDH	forward	GAACGGGAAGCTCACTGGC
	reverse	GCATGTCAGATCCACAACGG
rHPRT	forward	GAAAGACTTGCTCGAGATGTCATG
	reverse	CACACAGAGGGCCACAATGT
*ODC	forward	GGTTCCAGAGGCCAAACATC
TODO	reverse	GTTGCCACATTGACCGTGAC
riNOS	forward	CTCAGCACAGAGGGCTCAAAG
	reverse	TGCACCCAAACACCAAGGT
rTNF-α	forward	AGCCCTGGTATGAGCCCATGTA
	reverse	CCGGACTCCGTGATGTCTAAG
rIL-6	forward	GTTGTGCAATGGCAATTCTGA
	reverse	TCTGACAGTGCATCATCGCTG
rll -1ß	forward	GAAACAGCAATGGTCGGGAC
niii-ip	reverse	AAGACACGGGTTCCATGGTG
rTLR4	forward	TCATGCTTTCTCACGGCCTC
	reverse	AGGCATCATCCTGGCATTTTC
rArg	forward	GGTGACCCCCTGCATATCTG
	reverse	TCTCGCAAGCCGATGTACAC

Tabelle 1: Sequenzen der PCR-Primerpaare, Ratte. GAPDH wurde als Referenzgen genutzt.

Die qPCRs wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: 10 min bei 95 °C, 2 min bei 50 °C, gefolgt von 40 Zyklen von 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Die Daten wurden mit dem vom Hersteller bereitgestelltem Programm (Sequence Detection Systems, Version 2.3, Applied Biosystems) und der Δ CT Methode mit GAPDH als Referenzgen ausgewertet. Jede Probe wurde als Duplikat gemessen.

2.2.4 TNF-α-ELISA

Für den quantitativen Nachweis des Protein TNF-α im Zellüberstand von ENV-stimulierten Mikrogliazellen wurde das TNF alpha Rat ELISA Kit (Abcam) und das dazugehörige Protokoll wie folgend beschrieben genutzt. Nachdem die Mikrogliazellen eine Stunde bei 37 °C, 98 % rF und 10 % CO₂ inkubierten, wurde der Überstand durch ENV-haltiges Mikrogliazellen-Medium (1 µg/mL ENV) oder Kontroll-Mikrogliazellen-Medium (ENV-Puffer) ersetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C, 98 % rF und 10 % CO₂ wurde der Überstand aus drei identischen Wells vereinigt und vermischt. Jeweils 100 µL der Probe wurden in ein Well der im Kit enthaltenen 96-Well-Platte, die mit einem Antikörper gegen TNF-α beschichtet ist, aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils 100 µL einer Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen auf die Platte aufgetragen. Für die Standardreihe wurde der TNF Standard (rekombinantes TNF-α, alpha Abcam) mit Mikrogliazellen-Medium auf die in der folgenden Tabelle genannten Konzentrationen verdünnt.

Standard	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
Konzentration	20.000	6.667	2.222	740,7	246,9	82,3	0

Tabelle 2: Konzentrationen in pg/mL der TNF- α Standardreihe.

Die Platte wurde daraufhin lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C und leichtem Schwenken inkubiert. In dieser Zeit bindet das im Überstand enthaltene TNF- α an die Antikörper auf der Platte. Am darauffolgenden Tag wurde die Flüssigkeit aus den Wells abgesaugt und die Wells vier Mal mit 300 µL der Wash Solution (Abcam) gewaschen. Danach wurde die Flüssigkeit komplett abgenommen. Anschließend wurden die Wells für 1 h bei RT und leichtem Schwenken mit 100 µL Biotinylated TNF alpha Detection Antibody (Abcam) inkubiert. Nachdem die Platte nochmals gewaschen wurde, wurden 100 µL HRP-Streptavidin Solution (Abcam) in jedes Well gegeben und 45 min bei RT und leichtem Schwenken inkubiert. Die Platte wurde danach erneut gewaschen und anschließend wurden 100 µL TMB One-Step Substrate Reagent (Abcam) in jedes Well hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation lichtgeschützt bei 4 °C und leichtem Schwenken wurden jeweils 50 µL der Stop Solution (Abcam) zu jedem Well hinzugefügt. Mithilfe eines Photometers (Infinite 200Pro, Tecan) und der zugehörigen Software Tecan i-control (Version 1.7.1.12) wurde anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate gemessen. Die weiteren Berechnungen erfolgten mittels Microsoft Excel 2016 MSO (Version 1.5). Von den gemessenen Werten des Standards und der Proben wurde der Nullstandard (#7) subtrahiert, gemittelt und diese Werte in einen log-log-Graphen übertragen. Mit einer Funktion, die das Konzentrations-Absorptions-Verhältnis der Standardreihe widerspiegelt, wurde schließlich die ursprüngliche TNF- α -Konzentration der Proben errechnet.

2.2.5 NO-Kolorimetrie

Stickstoffmonoxid (NO) hat eine sehr kurze Halbwertszeit und ist deshalb nicht verlässlich in Lösungen nachzuweisen bzw. quantifizierbar. Mithilfe des Nitric Oxide Assay Kit, Colorimetric (Calbiochem) können jedoch die Abbauprodukte Nitrat und Nitrit nachgewiesen werden, wodurch ein Rückschluss auf die ursprüngliche NO-Konzentration ermöglicht wird. Die folgende Methode dient deshalb dem indirekten Nachweis von NO im Zellüberstand von ENV-stimulierten Mikrogliazellen. Die Versuche wurden nach dem Protokoll des Herstellers wie folgt durchgeführt: Nach einer Stunde im Brutschrank (37 °C, 98 % rF und 10 % CO₂) wurde der Überstand durch ENV-haltiges Medium (DMEM ohne Phenolrot, 10 % FBS, 1 % P/S, 1 μ g/mL ENV) oder Kontroll-Medium (DMEM ohne Phenolrot, 10 % FBS, 1 % P/S, ENV-Puffer) ersetzt. Nach 24 h Inkubation (37 °C, 98 % rF und 10 % CO₂) wurden jeweils 85 μ L der Proben und der Standards auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Konzentrationen der Standards sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Standard	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Konzentration	0	0,5	1	5	10	25	50	100

Tabelle 3: Konzentrationen der NO-Standardreihe in μM .

Im nächsten Schritt wurden 10 µL Nitrate Reductase (Calbiochem) hinzugefügt, gefolgt von 10 µL 2 mM NADH (Calbiochem) und 20 min bei RT und leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden, durch kurzes Schwenken getrennt, 50 µL des Color Reagent #1 und #2 (Calbiochem) hinzugefügt. Nach Inkubation der 96-Well-Platte für 5 min bei RT und leichtem Schwenken, wurde die Absorption bei 540 nm gemessen. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate mithilfe eines Photometers (Infinite 200Pro, Tecan) und der zugehörigen Software Tecan i-control (Version 1.7.1.12) gemessen. Die weiteren Berechnungen erfolgten mittels Microsoft Excel 2016 MSO (Version 1.5). Zunächst wurde von den Werten der Nullstandard (S0) subtrahiert, die Duplikate gemittelt und eine Konzentration-Absorptions-Kurve der Standards erstellt, mit der die NO-Konzentration der Proben errechnet werden konnte.

2.2.6 Morphologie

Um die Veränderung der Morphologie der Mikrogliazellen genauer zu untersuchen war es nötig, das Zytoskelett besser sichtbar zu machen. Zu diesem Zweck wurde filamentäres Aktin mit FITC-markiertem Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI wie folgt gefärbt. Nach der Isolation der Mikrogliazellen wurden zunächst 100.000 Zellen mit 1,5 mL Mikrogliazellen-Medium in eine Kammer der x-well Objektträger (2-well Zellkulturkammer auf PCA-Objektträger, Sarstedt) ausgesät. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C, 98 % rF und 10 % CO₂ wurde der Überstand durch **ENV-haltiges** Mikrogliazellen-Medium $(1 \mu g/mL ENV)$ oder Kontroll-Mikrogliazellen-Medium (ENV-Puffer) ersetzt. Nach 24 h, 36 h und 48 h wurden die x-wells mit PBS gewaschen, mit 4 %-igem PFA fixiert und erneut drei Mal gewaschen. Die Kammern wurden mit PBS bedeckt und bei 4 °C für maximal 24h gelagert. Die Proben wurden nachfolgend für 45 min mit Phalloidin-FITC Phalloidin-Fluorescein Isothiocyanate Labeled, (250 µg/µL, Sigma-Aldrich) inkubiert, einem Gift des Knollenblätterpilzes mit hoher Affinität für filamentäres Aktin des Zytoskelettes. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne 20 s mit DAPI angefärbt und die Kammern erneut mit PBS gewaschen.
Anschließend wurden die Stege der Kammern entfernt und die Objektträger mit Citifluor und einem Deckgläschen bedeckt. Die Bilder wurden in 20-facher Vergrößerung mit 6 Bildern pro Kammer und als Duplikate ausgewertet. In der Auswertung wurde quantifiziert, wie viele Mikrogliazellen eine vergrößerte, amöboide Morphologie angenommen hatten. Dazu wurden Mikrogliazellen als vergrößert gewertet, wenn ihr Zytoplasmasaum in mindestens zwei Quadranten breiter als der Kerndurchmesser war (Abb. 2).





Abb. 2: Schema der morphologischen Klassifikation: Zu sehen sind Mikrogliazellen einer Kontrollpopulation (A, A') und eine mit ENV stimulierte MG-Population (B, B'), jeweils nach 48 Stunden. Färbung mit FITC-markiertem Phalloidin (grün) und DAPI (blau). Maßstabsbalken 40 μ m. (A'') zeigt eine Kontrollzelle, (B'') eine als vergrößert gewertete Zelle. Das Zytoplasma ist grün, der Zellkern blau dargestellt. Der Pfeil zeigt den Kerndurchmesser bzw. die gleiche Größe im perinukleären Raum ab Kerngrenze. Die dunkelgrün-schraffierte Fläche zeigt die Quadranten, in denen der Zytoplasmasaum breiter als der Kerndurchmesser ist. Als vergrößert gewertet wurden Mikrogliazellen, deren Zytoplasmasaum in \geq 2 Quadranten breiter als der Kerndurchmesser war.

2.2.7 Migrationsverhalten

Das Migrationsverhalten wurde mittels *scratch wound migration assay* in Anlehnung an eine Methode von Lively und Schlichtert (Lively und Schlichter 2013) analysiert. Verlängert wurde das Intervall, in dem die Mikrogliazellen in den zellfreien Raum migrieren konnten, um eine Aussage über einen längeren Zeitraum treffen zu können. Nach der Isolation der Mikrogliazellen wurden zunächst 30.000 Zellen in 50 µL Mikrogliazellen-Medium in die Mitte eines 6-Wells ausgesät. Nachdem die Mikrogliazellen sich nach einer Stunde gesetzt hatten, wurde das Medium durch 3 mL ENV-haltiges Mikrogliazellen-Medium (1 µg/mL ENV) oder Kontroll-Mikrogliazellen-Medium (ENV-Puffer) ersetzt. Nach 18 h wurden die Mikrogliazellen mechanisch mit einer 200 µL Pipettenspitze auf einer

geraden Linie entfernt und das Medium danach ersetzt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen, die in den durch die Pipettenspitze entstandenen zellfreien Raum einwanderten, gezählt.

2.2.8 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Analyse wurde mittels Microsoft Excel 2016 MSO (Version 1.5) durchgeführt, die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8 (Version 8.4.1). Zur Berechnung der Signifikanzen der gemessenen Veränderungen durch die Stimulation mit ENV gegenüber der Pufferkontrolle wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt. Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet. In den Balkendiagrammen sind die Werte der X-Achse als Zeit in Minuten (min) oder Stunden (h) angegeben, auf der Y-Achse sind die Werte als dekadischer Logarithmus (qPCR), Konzentration (TNF- α , NO), Prozent (Morphologie) oder Anzahl (Migration) dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Signifikanzen wurden auf vier Dezimalstellen gerundet und in den Diagrammen wie folgt dargestellt: p ≥ 0,05 nicht signifikant (n.s.), p < 0,05 1 Stern (*), p ≤ 0,01 2 Sterne (**), p ≤ 0,001 3 Sterne (***).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Zellkultur aus primären Mikrogliazellen

Die Gewinnung der ZNS-Mischkulturen erfolgte in Kooperation mit Arbeitsgruppenmitgliedern, genutzt wurde dazu ein bereits etabliertes Verfahren. Entsprechend des ursprünglichen Protokolls wurde aus der ZNS-Mischkultur der Zellüberstand mit den enthaltenen Mikrogliazellen nach 2 h auf dem Inkubationsschüttler entnommen (Kremer et al. 2009). Aufgrund vermehrter mit anderen Zelltypen des ZNS, wie Astrozyten Kontamination und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, wurde in Anlehnung an die Literatur (Krady et al. 2008; Ni und Aschner 2010) die Zeit und die Rotation der ZNS-Mischkultur im Inkubationsschüttler modifiziert. Nach 1,5 h bei 180 UpM lösten sich nahezu alle Mikrogliazellen vom Boden, ohne dass sich lichtmikroskopisch eine Kontamination feststellen ließ. Für die weitere Aufreinigung der Mikrogliazellen wurden die adhärenten Eigenschaften der Mikrogliazellen genutzt (Krady et al. 2008). Um eine höhere Reinheit der Mikrogliazellen zu erhalten, wurden zusätzliche und frühere Waschschritte ergänzt, um weniger adhärente Zellen zu entfernen. Mit dieser Methode konnte eine ca. 99 % reine Mikrogliazellkultur generiert werden. Die Reinheit der Mikrogliazellkultur wurde im Verlauf jedes Experimentes lichtmikroskopisch überprüft, verunreinigte Zellkulturen wurden verworfen. Da im Verlauf der Versuche mit der oben beschriebenen Methode intermittierend Kontaminationen der Mikrogliazellkultur mit anderen Zelltypen auftraten, wurden alternative Methoden getestet. Mit der im Abschnitt Methoden beschriebenen MACS® Separation von Miltenyi Biotec und dem dazugehörigen Protokoll konnte schließlich eine stabile ca. 99 % Reinheit der Mikrogliazellkulturen erreicht werden.

3.2 Verminderte TLR4-Genexpression durch ENV in TLR4 positiven Mikrogliazellen

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der indirekten immunzytochemischen Färbung der primären Mikrogliazellkultur zeigte eine Bindung des anti-TLR4 an die kultivierten primären Mikrogliazellen aus neugeborenen Wistar-Ratten (Abb. 3Abb. 3 A). Die Analyse der Genexpression von TLR4 in Mikrogliazellen mittels qPCR zeigte, dass die Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle nach drei Stunden (p = 4,7x10⁻⁶) und ebenso nach 120 Stunden (p = 0,0020) zu einer signifikant niedrigeren TLR4-Genexpression führte. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei Experimente unter gleichen Bedingungen (Abb. 3 B).



Abb. 3: ENV-Stimulation von TLR4-positiven Mikrogliazellen führt zu einer signifikanten Suppression der TLR4-Genexpression. (A) Immunzytochemische Färbung mit anti-TLR4-Antikörper (rot) und DAPI (blau); die kultivierten primären Mikrogliazellen exprimieren den ENV-Rezeptor TLR4. Maßstabsbalken 30 μ m. (B) Die qPCR zeigt eine signifikante Abnahme der TLR4-Genexpression in Mikrogliazellen unter ENV-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle nach drei Stunden (p = 4,7x10⁻⁶) und nach 120 Stunden (p = 0,0020). GAPDH wurde als Referenzgen genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. (für die Zeitpunkte 3 h, 24 h n = 3).

3.3 ENV induziert eine proinflammatorische Genexpression in Mikrogliazellen

Eine Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV führte zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von iNOS im Falle beider verwendeten housekeeping Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Ornithindecarboxylase (ODC) im Vergleich zur Kontrolle (n = 1). Die gPCR mit GAPDH als Referenzgen zeigte nach eineinhalb Stunden (p = 0,0094), drei Stunden (p = 0.0225), sechs Stunden (p = 0.0004) und 24 Stunden (p = 0.0071) eine signifikante Steigerung der Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4 A). Auch mit ODC als Referenzgen zeigte sich nach eineinhalb Stunden (p = 0,0129), drei Stunden (p = 0,0011), sechs Stunden (p = 0,010) und 24 Stunden (p = 0,0030) eine signifikante Steigerung der Genexpression von iNOS durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4 B). Auch im Vergleich der housekeeping Gene GAPDH und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) zeigte sich durch Stimulation mit ENV eine signifikante Steigerung der Genexpression von iNOS im Vergleich zur Kontrolle (n = 1). Die qPCR mit GAPDH als Referenzgen zeigte nach drei Stunden (p = 0,0010) und 24 Stunden (p = 0,0001) eine signifikante Steigerung der Genexpression durch die Stimulation mit ENV (Abb. 5 A). Auch mit HPRT1 als Referenzgen zeigte sich nach drei Stunden (p = 0,0002) und 24 Stunden (p = 0,0009) eine signifikante Steigerung der Genexpression von iNOS durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5 B). Für alle folgenden gPCR wurde GAPDH als Referenzgen verwendet.



Abb. 4: Die qPCR (A) mit GAPDH als Referenzgen, (B) wie auch mit ODC als Referenzgen zeigte durch eine Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV zu allen Zeitpunkten eine signifikante Steigerung der iNOS-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. (n = 1).



Abb. 5: Die qPCR (A) mit GAPDH als Referenzgen, (B) wie auch mit HPRT1 als Referenzgen zeigte durch eine Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV eine signifikante Steigerung der iNOS-Genexpression nach drei Stunden und 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. (n = 1).

Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)

Eine Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV führte zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von TNF- α verglichen zur Kontrolle (Kremer et al., 2019). Die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse sind für die Zeitpunkte drei Stunden, 48 Stunden und 120 Stunden repräsentativ für drei qPCR unter gleichen Bedingungen. In dem graphisch dargestellten Versuch zeigte sich nach 15 Minuten (p = 0,8386) und 30 Minuten (p = 0,5076) kein signifikanter Anstieg der TNF- α -Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle. Nach 60 Minuten (p = 0,0002), 120 Minuten (p = 0,08,9x10⁻⁶) und 180 Minuten (p = 0,0013) zeigte sich dann eine signifikante Steigerung der TNF- α -Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6 A). Auch in einem zweiten qPCR-Versuch mit längeren Inkubationszeiten war die TNF- α -Genexpression durch Stimulation mit ENV mach jeweils drei Stunden (p = 0,0017), 48 Stunden (p = 0,0089) und 120 Stunden (p = 0,0054) signifikante erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6 B).



Abb. 6: Die Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV führt zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von TNF- α . (A) Bereits nach 60 Minuten bis (B) insgesamt 120 Stunden zeigte sich eine signifikant gesteigerte Genexpression von TNF- α in Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle. GAPDH wurde als Referenzgen genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. (für die Zeitpunkte 3h, 48 h und 120 h n = 3).

Interleukin-6 (IL-6)

Im Vergleich zur Kontrolle führte die Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von Interleukin-6 (Kremer et al., 2019). Die in Abbildung 7 dargestellten Ergebnisse sind für den Zeitpunkt von drei Stunden repräsentativ für vier qPCR unter gleichen Bedingungen. In dem graphisch dargestellten Versuch zeigte sich nach 15 Minuten (p = 0,5159) und 30 Minuten (p = 0,0874) kein signifikanter Anstieg der IL-6-Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle. Nach 60 Minuten (p = 0,0022), 120 Minuten (p = 0,0063) und 180 Minuten (p = 0,0027) zeigte sich eine signifikante Steigerung der IL-6-Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7 A). Auch in einem zweiten qPCR-Versuch mit längeren Inkubationszeiten war die IL-6-Genexpression durch Stimulation mit ENV nach drei Stunden (p = 0,0109), nach 48 Stunden (p = 0,0008) und 120 Stunden (p = 0,0029) signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7 B).



Abb. 7: Die Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV führt zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von IL-6. (A) Bereits nach 60 Minuten bis (B) insgesamt 120 Stunden zeigte sich eine signifikant gesteigerte Genexpression von IL-6 in Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle. GAPDH wurde als Referenzgen genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (für den Zeitpunkt 3 h n = 4).

Interleukin-1 β (IL-1 β)

Eine Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV führte zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von Interleukin-1ß verglichen zur Kontrolle (Kremer et al., 2019). Die in Abb. 8 dargestellten Ergebnisse sind für den Zeitpunkt drei Stunden repräsentativ für drei gPCR unter gleichen Bedingungen. In dem graphisch dargestellten Versuch zeigte sich nach 15 Minuten (p = 0,0788) und nach 30 Minuten (p = 0,0815) kein signifikanter Anstieg der IL-1 β -Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle. Nach 60 Minuten (p = 0,0004), 120 Minuten (p = 0,0015) und 180 Minuten (p = 0,0005) zeigte sich dann eine signifikante Steigerung der IL-1β-Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8 A). Auch in einem zweiten qPCR-Versuch mit längeren Inkubationszeiten war die IL-1ß-Genexpression durch Stimulation mit ENV nach drei Stunden ($p = 7,3x10^{-7}$) und nach 120 Stunden (p = 0,0007) signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48 Stunden zeigte sich keine signifikante Steigerung der IL-1 β -Genexpression (p = 0,1051), am ehesten durch einen Messfehler in den ENV Duplikaten, mit einem Standardfehler von ± 1,6333 bei einem Wert von 6,6653 (Abb. 8 B).



Abb. 8: Die Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV führt zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von IL-1β. (A) Bereits nach 60 Minuten bis insgesamt (B) 120 Stunden zeigte sich eine signifikante Steigerung der Genexpression von IL-1β in Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV im

Vergleich zur Kontrolle. Nach 48 Stunden ergab sich keine signifikante Steigerung der Genexpression. GAPDH wurde als Referenzgen genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. (für den Zeitunkt 3 h n = 3).

Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Auch für iNOS konnte per qPCR gezeigt werden, dass eine Stimulation von Mikrogliazellen mit ENV zu einer konsistent erhöhten Genexpression in Mikrogliazellen führt (Kremer et al. 2019). Abbildung 9 zeigt für die Zeitpunkte drei Stunden, 48 Stunden und 120 Stunden repräsentative Ergebnisse für drei qPCR unter gleichen Bedingungen. Nach 15 Minuten (p = 0,7729) und 30 Minuten (p = 0,1501) zeigte sich in dem graphisch dargestellten Versuch kein signifikanter Anstieg der iNOS-Genexpression durch die Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle. Nach 60 Minuten (p = 0,0061), 120 Minuten (p = 0,0004) und 180 Minuten (p = 0,0013) zeigte sich eine signifikante Steigerung der iNOS-Genexpression durch Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9 A). Auch in einer zweiten qPCR-Versuchsreihe mit längeren Inkubationszeiten war die iNOS-Genexpression durch Stimulation mit ENV nach drei Stunden ($p = 9,7x10^{-5}$), 48 Stunden (p = 0,0001) und 120 Stunden (p = 0,0028) signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9 B).



Abb. 9: Die Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV führt zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von iNOS. (A) Bereits nach 60 Minuten bis insgesamt (B) nach 120 Stunden zeigte sich eine signifikante Steigerung der Genexpression von iNOS in Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV verglichen zur Kontrolle. GAPDH wurde als Referenzgen genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (für die Zeitpunkte 3 h, 48 h und 120 h n = 3).

Zusammenfassend lässt sich eine signifikante Steigerung der Transkription verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IL-1 β und TNF- α , sowie iNOS in Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV nachweisen. Es zeigte sich bereits nach 60 Minuten eine signifikante Induktion der Genexpression, die über einen längeren Zeitraum von mindestens fünf Tagen anzudauern scheint. Typische antiinflammatorische Gene, wie Arginase-1, zeigten dahingegen keine signifikante Änderung in ihrer Transkriptionsrate in diesem Zeitraum (Daten nicht dargestellt).

3.4 ENV beeinflusst die TNF-α- und NO-Konzentration

Parallel zu der erhöhten Transkription der oben beschriebenen Gene stiegen auch entsprechend die Konzentrationen von TNF- α und NO im Zellüberstand von Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV (Kremer et al. 2019). Abbildung 10 A zeigt, dass 24 Stunden nach Stimulation mit ENV im Zellüberstand als Mittelwert aus drei Experimenten unter gleichen Bedingungen eine TNF- α -Konzentration von 1411,3 pg/mL mit einem Standardfehler von ± 231,5 pg/mL nachzuweisen war, im Gegensatz zu 9,5 pg/mL mit einem Standardfehler ± 6,8 pg/mL in der Kontrolle. Dieser Unterschied war signifikant (p = 0,0078). Abbildung 10 B zeigt nach Stimulation mit ENV im Zellüberstand als Mittelwert aus zwei Experimenten unter gleichen Bedingungen eine NO-Konzentration von 48,7 µM mit einem Standardfehler von ± 13,8 µM, im Gegensatz zur Kontrolle mit 9,5 µM mit einem Standardfehler von ± 1,0 µM. Dieser Unterschied war nicht signifikant (p = 0,2588).



Abb. 10: Im Zellüberstand ENV-stimulierter Mikrogliazellen lassen sich erhöhte Konzentrationen von TNF- α und NO nachweisen. (A) Die TNF- α -Konzentration war im Zellüberstand der ENV-stimulierten Mikrogliazellen nach 24 Stunden signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,0078). Die dargestellte Graphik zeigt den Mittelwert ± SEM aus 3 Experimenten unter gleichen Bedingungen. (B) Auch die NO-Konzentration im Zellüberstand von ENV-stimulierten Mikrogliazellen lässt einen Anstieg vermuten, die Analyse ist bei 2 Experimenten unter gleichen Bedingungen jedoch nicht signifikant (p = 0,2588).

3.5 ENV beeinflusst die Morphologie von Mikrogliazellen

Im Rahmen der oben beschriebenen Experimente konnte bereits lichtmikroskopisch eine Veränderung der Morphologie der Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV beobachtet werden. Die Analyse der Morphologie ergab, dass bereits nach 24 Stunden ein signifikant höherer Anteil von vergrößerten, amöboiden Mikrogliazellen im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen war (p = 0.0030). Auch nach 36 Stunden (p = 0.0047) und 48 Stunden (p = 0.0007) war der erhöhte Anteil an vergrößerten, amöboiden Mikrogliazellen durch Stimulation mit ENV weiterhin signifikant (für die Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden n = 3) (Abb. 11 A). Dabei zeigte sich, dass die Mikrogliazellen unter ENV-Stimulation zunächst vermehrt einen länglichen Phänotyp und später vermehrt einen amöboiden Phänotyp entwickelten (Abb. 11 E-G).





Abb. 11: Der Anteil an Mikrogliazellen mit einer vergrößerten, amöboiden Morphologie ist durch Stimulation mit ENV bereits nach 24 Stunden signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. (A) zeigt den Anteil der als vergrößert, "M1"-typisch gewerteten Mikrogliazellen nach Stimulation mit ENV und der Kontrolle. Es zeigt sich ein signifikant höherer Anteil an amöboiden Morphologien nach Stimulation mit ENV nach 24 Stunden, 36 Stunden und 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Das dargestellte Ergebnis repräsentiert für die Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden die Mittelwerte ± SEM aus 3 Experimenten unter gleichen Bedingungen, für den Zeitpunkt 36 Stunden Mittelwerte ± SEM aus 2 Experimenten unter gleichen Bedingungen. (B-G) zeigen exemplarische fluoreszenzmikroskopische Bilder von Mikrogliazellen der Kontrolle (B-C) und nach ENV-Stimulation (E-G) nach jeweils 24 Stunden (B, E), 36 Stunden (C, F) und 48 Stunden (D, G). Durch die Stimulation mit ENV scheinen die Mikrogliazellen zunächst eine längliche und später eine typisch amöboide Morphologie anzunehmen. Die Zellen wurden mit FITC-markiertem Phalloidin (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken: 40 μm.

3.6 ENV vermindert die mikrogliale Migration

Die Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV zeigt, wie in Abbildung 12 A dargestellt, einen signifikant hemmenden Effekt auf die Migration nach 120 Stunden im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,0128). Dabei migrierten im Mittel 119 Kontroll-Mikrogliazellen pro Well in den zellfreien Bereich, wohingegen im Mittel nur 29 ENV stimulierte Mikrogliazellen pro Well in den zellfreien Bereich migrierten. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus vier Experimenten unter gleichen Bedingungen (Abb. 12 C). Abbildung 12 A und B zeigen repräsentative lichtmikroskopische Beispielbilder 120 Stunden nach Stimulation mit Puffer (Abb. 12 B) und ENV (Abb. 12 C).







Abb. 12: Stimulation mit ENV hemmt die Migration von Mikrogliazellen. (A-B) zeigen repräsentative Beispielbilder der Migration der Mikrogliazellen nach 120 Stunden (A) der Kontrolle und (B) nach Stimulation mit ENV. Die dargestellten Balken kennzeichnen den ursprünglich zellfreien Raum. Phasenkontrastaufnahme; 10-fache Vergrößerung. (C) zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Anzahl migrierter Zellen in den zellfreien Raum pro Well für Mikrogliazellen 120 Stunden nach Stimulation mit ENV und der Kontrolle. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Migration durch die Stimulation mit ENV im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,0128). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Experimenten unter gleichen Bedingungen.

4 Diskussion

4.1 ENV induziert in Mikrogliazellen einen proinflammatorischen Phänotyp

Bereits Perron et al. konnten in ihren Arbeiten eine ENV Expression in Mikrogliazellen und Makrophagen in Läsionen der Multiplen Sklerose nachweisen (Perron et al. 2005). Wie eingangs diskutiert, können Mikrogliazellen sowohl antiinflammatorisch an regenerativen Prozessen, aber auch proinflammatorisch an der Demyelinisierung und Neurodegeneration im Rahmen der Multiplen Sklerose beteiligt sein (Lampron et al. 2015; Chu et al. 2018; Lassmann 2018). Unsere Arbeitsgruppe wies zudem im Hirnparenchym von Patienten mit Multipler Sklerose ENV-positive Mikrogliazellen nach, die myelinisierte Axone umhüllen (Kremer et al. 2019). Ziel dieses Promotionsvorhabens war es daher *in vitro* den Effekt von ENV auf den Phänotyp primärer Mikrogliazellen aus neonatalen Wistar-Ratten zu untersuchen. Dabei wurde in dieser Arbeit ein Augenmerk sowohl auf molekulare Veränderungen, als auch auf funktionale und morphologische Aspekte gelegt und dabei zwischen bekannten typischerweise pro- und antiinflammatorischen Charakteristika differenziert.

4.1.1 ENV supprimiert die TLR4-Genexpression

Die notwendige Voraussetzung für eine Interaktion einer Zelle mit ENV ist ihre Expression des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) (Rolland et al. 2006; Kremer et al. 2013; Kremer et al. 2015). Wie bereits bekannt exprimieren Mikrogliazellen als Zellen des angeborenen Immunsystems diesen Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche (Olson und Miller 2004; Yao et al. 2013). Auch in den primären Mikrogliazellen aus Wistar-Ratten konnte TLR4 nachgewiesen werden. Nach Stimulation der Mikrogliazellen mit ENV nahm die TLR4-Genexpression in den Mikrogliazellen signifikant ab, ein Effekt der bereits mit anderen Liganden des TLR4,

beispielsweise LPS, gezeigt wurde (Jack et al. 2005; McCarthy et al. 2017). Die Bindung eines Pathogen an den TLR4 führt über intrazelluläre Signalkaskaden zu einer starken Entzündungsreaktion. Um eine unkontrollierte, krankhafte Entzündungsreaktion zu vermeiden gibt es regulatorische Feedbackmechanismen, die unter anderem die Erkennung der Liganden oder direkt die Signalkaskade beeinflussen oder zu einer reduzierten Expression des TLR4 führen.

4.1.2 ENV induzierte Genexpression

Um den Effekt einer ENV-Stimulation auf Mikrogliazellen näher zu untersuchen, wurden quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) genutzt, um mögliche Unterschiede der Genexpression zu Kontroll-Mikrogliazellen zu Zunächst konnte gezeigt werden, dass die sogenannten detektieren. housekeeping Gene ODC, GAPDH und HPRT1 als Referenzgene allesamt geeignet waren, um eine konsistente signifikante ENV-induzierte Steigerung der Genexpression von iNOS in ENV-stimulierten Mikrogliazellen nachzuweisen. Da andere Arbeitsgruppen ebenfalls GAPDH als housekeeping Gen für die Analyse der Genexpression in Mikrogliazellen nutzten (Jack et al. 2005; Marinelli et al. 2015), wurde für die Folgeexperimente ebenfalls GAPDH als Referenzgen genutzt. Die Stimulation mit ENV führte in den Mikrogliazellen des Weiteren zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α, IL-6 und IL-1ß, und zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression der iNOS. All diese Faktoren sind bekannte Mediatoren von Entzündungsprozessen und entsprechen dem Genexpressionsmuster eines proinflammatorischen mikroglialen Phänotyps (Orihuela et al. 2016; Jha et al. 2016). Hierbei ist insbesondere die schnelle Kinetik der gesteigerten proinflammatorischen Genexpression hervorzuheben, die zeigt, dass sich bereits nach 60 Minuten signifikante Veränderungen ergeben, die bis zu fünf Tage andauerten. TNF-α wird im ZNS hauptsächlich von Mikrogliazellen, Astrozyten und Neuronen produziert und ist als regulatorisches Zytokin sowohl an der Entwicklung des ZNS, der

Homöostase, aber auch an pathologischen Prozessen beteiligt (Lieberman et al. 1989; Liu et al. 1994; Hanisch 2002; Montgomery und Bowers 2012). Hinsichtlich der für die Multiplen Sklerose relevanten Aspekte hat TNF-a im ZNS einen vornehmlich schädigenden Effekt auf Oligodendrozyten, Myelin und Axone, fördert die Inflammation und Demyelinisierung und induziert Gliose über die Aktivierung und Stimulation von Astrozyten (Lim und Constantinescu 2010). Entsprechend lässt sich TNF-α im Liquor, sowie post mortem in MS-typischen Läsionen nachweisen und korreliert zudem mit der Schwere und dem Progress der Erkrankung (Hofman et al. 1989; Sharief und Hentges 1991). Als Folge einer gesteigerten Genexpression des TNF-α ließ sich auch eine entsprechend erhöhte TNF-α Proteinkonzentrationen im Zellüberstand von **ENV-stimulierten** Mikrogliazellen messen. IL-6 ist ein Zytokin, dass bereits im Jahre 1985 als Faktor der Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen identifiziert wurde (Hirano et al., 1985). Inzwischen ist bekannt, dass IL-6 in weitaus mehr Prozesse involviert ist, wie der Regeneration von Gewebe, Entzündungsprozesse, der Abwehr von Krankheitserregern und der Neurodegeneration. IL-6 kommt physiologisch in geringen Mengen im ZNS vor und aktiviert einen membrangebundenen Rezeptor, der im ZNS nur auf Mikrogliazellen vorkommt und spielt über die sogenannte klassische Aktivierung eine Rolle in der neuronalen Regeneration. Neurodegeneration induziert IL-6 über das sogenannte "transsignaling". Dabei aktiviert ein zusätzlich vorkommender löslicher IL-6 Rezeptor nach einer Bindung an IL-6 das Glykoprotein gp130, das unter anderem auf Oligodendrozyten, Astrozyten und Endothelzellen vorkommt (Rothaug et al. 2016). Im Rahmen verschiedener neurologischer Erkrankungen wie Alzheimer, Morbus Parkinson und ebenfalls der Multiplen Sklerose ist eine deutlich erhöhte Sekretion von IL-6 bekannt (Krei et al. 1991; Maimone et al. 1997; Rothaug et al. 2016). Die erhöhten IL-6-Konzentrationen aktivieren über das trans signaling Mikrogliazellen und Astrozyten, die unter anderem durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zur Demyelinisierung führen (Rothaug et al., 2016; West et al., 2019). IL-1ß lässt sich sowohl im Liquor, im Blut, als auch in Läsionen von Patienten mit Multipler Sklerose nachweisen (Cannella und Raine 1995; Dujmovic et al. 2009; Burm et al. 2016), wobei aktuell über die Bedeutung dieses Zytokin bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose wenig bekannt ist (Lin und Edelson 2017).

Dass es eine prinzipielle Rolle spielt, demonstrieren Studien, die zeigen, dass der IL-1ß Spiegel im Liquor und Blut von Patienten mit Multipler Sklerose mit dem Schweregrad und dem Krankheitsprogress korreliert (Jong et al. 2002; Rossi et al. 2014). Während bereits eine ENV-induzierte gesteigerte Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen in peripheren mononukleären Zellen des Blutes (Rolland et al. 2005) und in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Kremer et al. 2013) nachgewiesen wurde, konnte nun erstmals auch eine ENV-induzierte gesteigerte Genexpression proinflammatorischen Zytokin IL-1ß in des primären Mikrogliazellen gezeigt werden. Zusätzlich zu der gesteigerten Genexpression der oben genannten Zytokine, steigerte die Stimulation mit ENV in Mikrogliazellen auch die Genexpression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die die Umwandlung von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin und NO katalysiert (Kwon et al. 1990). Die NO-Synthasen werden in drei Subtypen unterteilt: die neuronale NO-Synthase (nNOS), die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die induzierbare NO-Synthase (Ghasemi und Fatemi 2014; Xue et al. 2018). Im ZNS wird iNOS vor allem von Astrozyten und Mikrogliazellen insbesondere im Rahmen von Entzündungen, viralen Infektionen oder Traumata exprimiert (Galea et al., 1992; Calabrese et al., 2007). Auch proinflammatorische Zytokine können eine iNOS-Expression induzieren (Saha und Pahan 2006). Mittels Kolorimetrie zeigte sich der Trend zu erhöhten NO-Konzentration im Zellüberstand ENV-stimulierter Mikrogliazellen, die gezeigten Ergebnisse waren bei einer Gesamtheit von zwei Experimenten jedoch nicht signifikant. In nachfolgenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte letztendlich eine signifikante Konzentrationssteigerung von NO im Zellüberstand von Mikrogliazellen durch eine Stimulation mit ENV gezeigt werden (Kremer et al. 2019). NO wirkt im ZNS in niedrigen Konzentrationen als Neurotransmitter und -modulator. Wird es jedoch exzessiv gebildet und liegt in höheren Konzentrationen vor, kann es toxische Verbindungen bilden, die zur Familie der reaktiven Stickstoffspezies (reactive nitrogen species) gehören. So entsteht beispielsweise diffusionskontrolliert bei Vorhandensein größerer Mengen NO und Superoxid, einer reaktiven Sauerstoffspezies, das wesentlich reaktivere Peroxynitrit, welches wiederum mit der Aminosäure Tyrosin Nitrotyrosin bildet. Im erkrankten ZNS schädigen die reaktiven Stickstoffspezies Enzyme, die DNA, Membranen und Mitochondrien und führen zu einer Schädigung der Blut-HirnSchranke (Calabrese et al., 2007; Pacher et al., 2007; Ghasemi and Fatemi, 2014). In der Multiplen Sklerose finden sich in MS-typischen Läsionen, im Liquor und im Serum erhöhte Level der reaktiven Stickstoffspezies oder deren Abbauprodukte.

4.1.3 ENV verändert die mikrogliale Morphologie und Migration

Im gesunden Gehirn tasten Mikrogliazellen mit ihren langen, dünnen, radiären und beweglichen Zellfortsätzen die Umgebung ab. Die Mikrogliazellen sind dabei in verschiedenste physiologische Prozesse involviert, unter anderem in die Gehirnentwicklung und die neuronale Plastizität. Zusätzlich tasten Mikrogliazellen mit ihren Zellfortsätzen die Umgebung nach exogenen und endogenen Noxen ab und reagieren als Zellen des angeborenen Immunsystems auf pathologische Reize und ändern dabei ihren Aktivierungszustand (Orihuela et al. 2016; Ransohoff 2016; Dubbelaar et al. 2018; Li und Barres 2018). Im erkrankten Gehirn und in vitro im proinflammatorischen Aktivierungszustand ändern Mikrogliazellen ihre Morphologie hin zu einem vergrößerten, amöboiden Zellkörper und verringern, verkürzen und verbreitern ihre Zellfortsätze (Beynon und Walker 2012; Orihuela et al. 2016; Ransohoff 2016; Dubbelaar et al. 2018). Beschrieben wurde diese Anpassung der mikroglialen Morphologie beispielsweise unter dem Einfluss von LPS (Kloss et al. 2001; Lively und Schlichter 2013). Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass primäre Mikrogliazellen auch durch die Stimulation mit ENV eine amöboide, "M1"-typische Morphologie, entwickeln. Zeitlich entwickelten die Mikrogliazellen nach der Stimulation mit ENV zunächst einen eher länglich vergrößerten und später einen rundlich vergrößerten Zellkörper. Die Kontrollen zeigten einen deutlich kleineren Zellkörper und kleine, dünne Zellfortsätze, ähnlich der in der Literatur vorbeschriebenen Morphologie unter physiologischen Bedingungen. Die funktionelle Bedeutung dieser Veränderung der mikroglialen Morphologie im Rahmen einer proinflammatorischen Aktivierung ist jedoch weitestgehend ungeklärt (Dubbelaar et al., 2018). Ein weiterer Effekt von ENV zeigte sich bei der Analyse des mikroglialen Migrationsverhaltens, die ergab, dass ENV die Migration von

Mikrogliazellen hemmt. In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben, wie die Migrationsfähigkeit von Mikrogliazellen durch einen schädlichen Reiz beeinflusst wird. Dies scheint abhängig vom Zelltyp, dem auslösenden Stimulus und dem Alter der Mikrogliazellen zu sein (Lively und Schlichter 2013). Es wäre prinzipiell anzunehmen, dass Mikrogliazellen als Zellen des angeborenen Immunsystems in Folge eines schädlichen Reizes zum Ort der Schädigung migrieren, um dort agieren zu können. Dies wurde auch exemplarisch in einer in vivo Studie an Mäusen gezeigt, bei der Mikrogliazellen nach einem Gewebeschaden NO-abhängig eine amöboide Morphologie entwickelten und zum Ort des Schadensreizes wanderten (Dibaj et al. 2010; Lively und Schlichter 2013). Dementsprechend zeigten auch Xiao et al. in vitro an immortalisierten humanen Mikrogliazellen, dass eine ENV-Transfektion zu einer verstärkten Migration führte (Xiao et al. 2017). Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch in vitro eine verminderte mikrogliale Migration nach Stimulation mit LPS in primären neonatalen Mikrogliazellen der Ratte (Simone et al. 2010; Lively und Schlichter 2013) und bei adulten humanen Mikrogliazellen (Broderick et al. 2000).

4.2 Zukünftige Studien, ENV im Kontext zur Multiplen Sklerose, ein therapeutischer Ansatz?

Hinsichtlich der in dieser Arbeit beschriebenen proinflammatorischen Effekte von ENV auf Mikrogliazellen muss grundsätzlich angemerkt werden, dass die Ergebnisse in vitro in einer primären neonatalen Mikrogliazellkultur der Wistar-Ratte generiert wurden. Mikrogliazellen passen ihren Phänotyp an ihre Umgebung an und so scheint bereits die Isolierung einer Mikrogliazellkultur ein potentieller Stimulus für eine Änderung ihres Phänotyps (Dubbelaar et al. 2018). Dies beeinträchtigt möglicherweise die Übertragbarkeit von in vitro Daten auf das "in vivo Paradigma" der Multiplen Sklerose. Insgesamt müssen letztlich also die gezeigten Ergebnisse sowohl in vitro in humanen Mikrogliazellen, als auch in vivo reproduziert werden, um die ENV-induzierten Effekte auf Mikrogliazellen besser beurteilen zu können. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten primären Mikrogliazellen der Ratte den ENV-Rezeptor TLR4 exprimieren und die TLR4-Genexpression durch die Stimulation mit ENV, mutmaßlich im Rahmen eines regulatorischen Feedbackmechanismus, supprimiert wird. Ob die proinflammatorischen Effekte von ENV auf Mikrogliazellen allein durch eine agonistische Wirkung dieses Liganden am TLR4 induziert werden, wie beispielsweise in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Kremer et al. 2013; Kremer et al. 2015) und peripheren mononukleäre Zellen des Blutes (Rolland et al. 2006) wurde in dieser Studie nicht untersucht. Um dies näher zu untersuchen, wären beispielsweise Experimente denkbar, die die Effekte des ENV an Mikrogliazellen untersuchen, die aus TLR4 knock-out Tieren stammen oder deren TLR4 pharmakologisch blockiert wird. ENV induziert in primären neonatalen Mikrogliazellen der Wistar-Ratte die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Moleküle und führt zu einem amöboiden Phänotyp, der ebenfalls typisch für eine proinflammatorische Aktivierung dieser Zellen ist. In Anbetracht der Tatsache, möglicher pathogener, proinflammatorischer Faktor auf dass ENV als Mikrogliazellen im Rahmen der Multiplen Sklerose wirkt, ist als nächster Schritt erforderlich diese Erkenntnisse auf humane Mikrogliazellen zu übertragen. Hier bietet sich eine Gewinnung von Mikrogliazellen aus adultem oder fötalem post mortem Gewebe, chirurgischen Resektaten, beispielsweise im Rahmen von Epilepsiechirurgie, oder die Nutzung immortalisierter Zelllinien an (Durafourt et al. 2013; Mizee et al. 2017; Lue et al. 2019). Limitiert durch Verfügbarkeit, Heterogenität, oder Beeinflussung des Phänotyps durch äußere Gegebenheiten, wie die Verzögerung und Lokalisation der Gewebeentnahme, Alter und Vorerkrankungen, hat jedoch jedes der genannten Modelle spezifische Einschränkungen (Mizee et al. 2017; Lue et al. 2019). Zusätzlich stellt sich die Frage nach einer Beeinflussung der nachgewiesenen Effekte des ENV auf den Phänotyp der Mikrogliazellen durch die Interaktion mit anderen residenten Zelltypen des ZNS, aber auch durch Zellen, die bei der Multiplen Sklerose über die gestörte Blut-Hirn-Schranke in das ZNS migrieren. Zurückkommend auf die initiale Beobachtung, dass in *post mortem* Analysen ENV-positive Mikrogliazellen umhüllen, erscheinen insbesondere myelinisierte Axone Studien mit Kokultursystemen mit der Frage nach Demyelinisierung und Neurodegeneration Interesse. Studien unserer Arbeitsgruppe die von In auf dieses Promotionsvorhaben folgten, wurden sowohl die Ergebnisse einer Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps in vitro auf humane Mikrogliazellen übertragen, als auch in einem Kokultursystem eine ENV induzierte Assoziation von Mikrogliazellen zu myelinisierten Axonen gezeigt, die mit einer axonalen Schädigung korreliert (Kremer et al., 2019). Die proinflammatorischen Effekte des ENV auf verschiedene Zelltypen, wie Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Mikrogliazellen (Kremer et al. 2013; Kremer et al. 2015) legen nahe, dass dieses virale Hüllprotein des pathogenen humanen endogenen Retrovirus Typ W möglicherweise in der Pathogenese und insbesondere der Neurodegeneration in progressiven Verlaufsformen der Multiplen Sklerose eine entscheidende Rolle spielen könnte. Damit stellt es einen potenziellen Angriffspunkt in der Therapie der Multiplen Sklerose dar. Temelimab/GNbAC1 ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper des Immunglobulin-G₄ Subtyps, der selektiv und mit hoher Affinität an ENV bindet und es neutralisiert. Präklinische Studien zu Temlimab zeigten eine hemmende Wirkung auf durch ENV vermittelte Prozesse, beispielsweise bei ENV induzierter EAE und in *in vitro* Zellmodellen (Rolland et al. 2006; Curtin et al. 2012; Kremer et al. 2015). In einer randomisierten kontrollierten klinischen Phase I Studie an 33 gesunden Probanden, die einmalig

Temelimab/Placebo intravenös erhielten, konnte eine gute Verträglichkeit des GNbAC1, sowie eine dosislineare Pharmakokinetik nachgewiesen werden (Curtin et al. 2012). Anschließend erfolgte eine randomisierte kontrollierte Phase IIa Studie mit 10 Multiple Sklerose Patienten. Nach wiederholten Gaben von Temelimab im Abstand von 4 Wochen zeigte sich ebenfalls eine gute Verträglichkeit, keine Anzeichen einer Induktion von Immunogenität, sowie eine dosislineare Pharmakokinetik mit einer Halbwertszeit von 27 - 37 Tagen (Derfuss et al. 2015a, 2015b). In einer doppelblinden, placebokontrollierten Phase IIb Studie (CHANGE-MS und ANGEL-MS), die 270 Patienten mit einer schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose einschloss, wurde weiterhin eine gute Verträglichkeit von Temelimab in den Dosierungen 6 mg/kg, 12 mg/kg und 18 mg/kg gezeigt. Eine Therapie mit 18 mg/kg Temelimab wies verglichen zum Kontrollarm nach 48 Wochen einen neuroprotektiven Effekt nach mit signifikant weniger neuen T1-hypointensen Läsionen und einer signifikanten Reduktion der Atrophie des Thalamus und Kortex. Ein signifikanter Effekt auf das gesamte Hirnvolumen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Ebenso zeigte sich eine nicht-signifikante verminderte Abnahme des Magnetisierungstransfer Ratio, einem Marker für Neurodegeneration (Hartung et al. 2021). Da die bisherige Studienlage darauf hinweist, dass das pHERV ENV überwiegend an neurodegenertiven Prozessen im späteren Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose beteiligt ist, erscheinen weitere Studien mit Patienten sinnvoll, die an progredienten Verlaufsformen der Multiplen Sklerose erkrankt sind.

4.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieses Promotionsvorhabens zeigen in vitro eine ENV-induzierte proinflammatorische Veränderung des Phänotyps primärer neonataler Mikrogliazellen von Wistar-Ratten anhand molekularer und funktionaler Charakteristika. In vitro steigert ENV in den untersuchten Mikrogliazellen die Genexpression proinflammatorischer Zytokine, führt zu einer veränderten Zellmorphologie und insbesondere zu einer erhöhten Konzentrationen von TNF-a und NO im Zellüberstand, welche bekannte Mediatoren axonaler Schädigung und Demyelinisierung bei Multipler Sklerose sind (Smith und Lassmann 2002; Montgomery und Bowers 2012). Der durch ENV induzierte proinflammatorische mikrogliale Phänotyp könnte somit unter anderem an Neurodegenration, wie sie insbesondere bei progressiven Verlaufsformen der Multiplen Sklerose beobachtet werden, mitverantwortlich sein. Die Übertragbarkeit der gezeigten Ergebnisse auf adulte Mikrogliazellen und insbesondere auf das humane komplexe Zusammenspiel verschiedenster Zellen und Mediatoren im Rahmen pathologischer Prozesse der Multiplen Sklerose erscheint jedoch durch die Komplexität und Variabilität der mikroglialen Aktivierungszustände, beeinflusst durch verschiedenste Einflüsse, schwierig und bedarf weiterführender Studien. Die Bedeutung des ENV im Krankheitsprozess der Multiplen Sklerose erscheint jedoch gestützt durch epidemiologische Studien und durch die klinischen Studienergebnisse des ENV-neutralisierenden Antikörpers Temelimab weiter untermauert.

5 Literaturverzeichnis

- Alliot, F.; Godin, I.; Pessac, B. (1999): Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. In: *Brain research. Developmental brain research* 117 (2), S. 145–152.
- Alonso, Alvaro; Hernan, Miguel A. (2008): Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis. A systematic review. In: *Neurology* 71 (2), S. 129–135. DOI: 10.1212/01.wnl.0000316802.35974.34.
- Ascherio, A.; Munger, K. L.; Lennette, E. T.; Spiegelman, D.; Hernan, M. A.; Olek, M. J. et al. (2001): Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis. A prospective study. In: *JAMA* 286 (24), S. 3083–3088.
- Ascherio, Alberto; Munger, Kassandra L. (2010): Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis. A review. In: *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 5 (3), S. 271–277. DOI: 10.1007/s11481-010-9201-3.
- Bannert, Norbert; Kurth, Reinhard (2006): The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. In: *Annual review of genomics and human genetics* 7, S. 149–173. DOI: 10.1146/annurev.genom.7.080505.115700.
- Belbasis, Lazaros; Bellou, Vanesa; Evangelou, Evangelos; Ioannidis, John P. A.; Tzoulaki,
 Ioanna (2015): Environmental risk factors and multiple sclerosis. An umbrella review
 of systematic reviews and meta-analyses. In: *The Lancet Neurology* 14 (3), S. 263–273.
 DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70267-4.
- Beynon, S. B.; Walker, F. R. (2012): Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. In: *Neuroscience* 225, S. 162–171.
- Blond, Jean-Luc; Lavillette, Dimitri; Cheynet, Valérie; Bouton, Olivier; Oriol, Guy; Chapel-Fernandes, Sylvie et al. (2000): An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. In: *Journal of virology* 74 (7), S. 3321–3329.

- Broderick, C.; Duncan, L.; Taylor, N.; Dick, A. D. (2000): IFN-gamma and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 41 (9), S. 2613–2622.
- Browne, Paul; Chandraratna, Dhia; Angood, Ceri; Tremlett, Helen; Baker, Chris; Taylor,
 Bruce V.; Thompson, Alan J. (2014): Atlas of Multiple Sclerosis 2013. A growing global
 problem with widespread inequity. In: *Neurology* 83 (11), S. 1022–1024.
- Burm, Saskia Maria; Peferoen, Laura Anna Norma; Zuiderwijk-Sick, Ella Alwine; Haanstra, Krista Geraldine; Adriaan't Hart, Bert; van der Valk, Paul et al. (2016): Expression of IL-1β in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself. In: *Journal of neuroinflammation* 13 (1), S. 138.
- Cannella, Barbara; Raine, Cedric S. (1995): The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. In: *Annals of neurology* 37 (4), S. 424–435.
- Caza, Tiffany N.; Fernandez, David R.; Talaber, Gergely; Oaks, Zachary; Haas, Mark;
 Madaio, Michael P. et al. (2014): HRES-1/Rab4-mediated depletion of Drp1 impairs
 mitochondrial homeostasis and represents a target for treatment in SLE. In: *Annals of the rheumatic diseases* 73 (10), S. 1888–1897. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013203794.
- Charcot, Jean-Martin (1868): Histologie de la sclérose en plaques. In: *Gazette des hopitaux* 1051 (41), S. 140.
- Chu, Fengna; Shi, Mingchao; Zheng, Chao; Shen, Donghui; Zhu, Jie; Zheng, Xiangyu; Cui,
 Li (2018): The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and
 experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of neuroimmunology* 318, S.
 1–7. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2018.02.015.
- Colton, Carol A. (2009): Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. In: *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4 (4), S. 399–418. DOI: 10.1007/s11481-009-9164-4.
- Compston, Alastair; Coles, Alasdair (2008): Multiple sclerosis. In: *The Lancet* 372 (9648), S. 1502–1517. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.

- Curtin, Francois; Lang, Alois B.; Perron, Herve; Laumonier, Marion; Vidal, Virginie; Porchet, Herve C.; Hartung, Hans-Peter (2012): GNbAC1, a humanized monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis-associated endogenous retrovirus. A first-in-humans randomized clinical study. In: *Clinical therapeutics* 34 (12), S. 2268–2278. DOI: 10.1016/j.clinthera.2012.11.006.
- Dendrou, Calliope A.; Fugger, Lars; Friese, Manuel A. (2015): Immunopathology of multiple sclerosis. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (9), S. 545–558. DOI: 10.1038/nri3871.
- Derfuss, Tobias; Curtin, Francois; Guebelin, Claudia; Bridel, Claire; Rasenack, Maria;
 Matthey, Alain et al. (2015a): A phase IIa randomised clinical study of GNbAC1, a humanised monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis-associated endogenous retrovirus in multiple sclerosis patients. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 21 (7), S. 885–893. DOI: 10.1177/1352458514554052.
- Derfuss, Tobias; Curtin, Francois; Guebelin, Claudia; Bridel, Claire; Rasenack, Maria;
 Matthey, Alain et al. (2015b): A phase IIa randomized clinical study testing GNbAC1, a humanized monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis associated endogenous retrovirus in multiple sclerosis patients a twelve month follow-up. In: *Journal of neuroimmunology* 285, S. 68–70. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2015.05.019.
- Dibaj, Payam; Nadrigny, Fabien; Steffens, Heinz; Scheller, Anja; Hirrlinger, Johannes; Schomburg, Eike D. et al. (2010): NO mediates microglial response to acute spinal cord injury under ATP control in vivo. In: *Glia* 58 (9), S. 1133–1144.
- Dolei, A.; Perron, H. (2009): The multiple sclerosis-associated retrovirus and its HERV-W endogenous family. a biological interface between virology, genetics, and immunology in human physiology and disease. In: *Journal of neurovirology* 15 (1), S. 4–13. DOI: 10.1080/13550280802448451.
- Dolei, Antonina (2006): Endogenous retroviruses and human disease. In: *Expert review* of clinical immunology 2 (1), S. 149–167.

- Dolei, Antonina; Serra, Caterina; Mameli, Giuseppe; Pugliatti, Maura; Sechi, Gianpietro; Cirotto, M. C. et al. (2002): Multiple sclerosis–associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. In: *Neurology* 58 (3), S. 471–473.
- Douville, Renee; Liu, Jiankai; Rothstein, Jeffrey; Nath, Avindra (2011): Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. In: *Annals of neurology* 69 (1), S. 141–151. DOI: 10.1002/ana.22149.
- Dubbelaar, Marissa; Kracht, Laura; Eggen, Bart J. L.; Boddeke, Erik HWGM (2018): The kaleidoscope of microglial phenotypes. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1753.
- Dujmovic, Irena; Mangano, Katia; Pekmezovic, Tatjana; Quattrocchi, Cinzia; Mesaros, Sarlota; Stojsavljevic, Nebojsa et al. (2009): The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: The elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. In: *Journal of neuroimmunology* 207 (1-2), S. 101–106.
- Durafourt, Bryce A.; Moore, Craig S.; Blain, Manon; Antel, Jack P. (2013): Isolating, culturing, and polarizing primary human adult and fetal microglia. In: Microglia: Springer, S. 199–211.
- Ejtehadi, H. D.; Freimanis, G. L.; Ali, H. A.; Bowman, S.; Alavi, A.; Axford, J. et al. (2006): The potential role of human endogenous retrovirus K10 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. A preliminary study. In: *Annals of the rheumatic diseases* 65 (5), S. 612–616. DOI: 10.1136/ard.2004.031146.
- Frank, Oliver; Giehl, Michelle; Zheng, Chun; Hehlmann, Rudiger; Leib-Mosch, Christine; Seifarth, Wolfgang (2005): Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. In: *Journal* of virology 79 (17), S. 10890–10901. DOI: 10.1128/JVI.79.17.10890-10901.2005.
- Freimanis, G.; Hooley, P.; Ejtehadi, H. Davari; Ali, H. A.; Veitch, A.; Rylance, P. B. et al. (2010): A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis.
 Investigating mechanisms of pathogenesis. In: *Clinical and experimental immunology* 160 (3), S. 340–347. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04110.x.

- Frendo, Jean-Louis; Olivier, Delphine; Cheynet, Valerie; Blond, Jean-Luc; Bouton, Olivier;
 Vidaud, Michel et al. (2003): Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in
 human trophoblast cell fusion and differentiation. In: *Molecular and cellular biology*23 (10), S. 3566–3574.
- Frischer, Josa M.; Bramow, Stephan; Dal-Bianco, Assunta; Lucchinetti, Claudia F.; Rauschka, Helmut; Schmidbauer, Manfred et al. (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. In: *Brain : a journal* of neurology 132 (Pt 5), S. 1175–1189. DOI: 10.1093/brain/awp070.
- Garson, J. A.; Tuke, P. W.; Giraud, P.; Paranhos-Baccala, G.; Perron, H. (1998): Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. In: *The Lancet* 351 (9095), S. 33. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)24001-3.
- GeNeuro News & Press (2019): GeNeuro's temelimab shows extended neuroprotective effects in relapsing-remitting MS. Hg. v. GeNeuro News & Press. Online verfügbar unter http://www.geneuro.com/data/news/GeNeuro-ECTRIMS-PR-160919-ENG.pdf, zuletzt geprüft am 07.01.2020.
- Ghasemi, Mehdi; Fatemi, Ali (2014): Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 45, S. 168–182.
- Gianfrancesco, Milena A.; Stridh, Pernilla; Rhead, Brooke; Shao, Xiaorong; Xu, Edison; Graves, Jennifer S. et al. (2017): Evidence for a causal relationship between low vitamin D, high BMI, and pediatric-onset MS. In: *Neurology* 88 (17), S. 1623–1629.
- Gomes, Marleide da Mota; Engelhardt, Eliasz (2013): Jean-Martin Charcot, father of modern neurology. An homage 120 years after his death. In: *Arquivos de neuro-psiquiatria* 71 (10), S. 815–817. DOI: 10.1590/0004-282X20130128.
- Goodin, Douglas S. (2014): The epidemiology of multiple sclerosis. Insights to disease pathogenesis. In: *Handbook of clinical neurology* 122, S. 231–266. DOI: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00010-8.

- Grandi, Nicole; Tramontano, Enzo (2018): HERV Envelope Proteins. Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 462. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00462.
- Griffiths, D. J. (2001): Endogenous retroviruses in the human genome sequence. In: Genome biology 2 (6), Reviews1017.
- Guerrero, Brooke L.; Sicotte, Nancy L. (2020): Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? In: *Frontiers in immunology* 11, S. 374. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00374.
- Hanisch, Uwe-Karsten (2002): Microglia as a source and target of cytokines. In: *Glia* 40 (2), S. 140–155.

Hartung, Hans-Peter; Cree, Bruce; Derfuss, Tobias; Sormani, Maria Pia; Barkhof, Frederik;
Curtin, Francois et al. (2019): Neuroprotective effects of temelimab in relapsingremitting Multiple Sclerosis patients extend to 96 weeks. Hg. v. GeNeuro News &
Press. News & Press. Online verfügbar unter
http://www.geneuro.com/data/news/P1379-Ectrims-2019.pdf, zuletzt geprüft am
07.01.2020.

- Hartung, Hans-Peter; Derfuss, Tobias; Cree, Bruce A. C.; Sormani, Maria Pia; Selmaj,
 Krzysztof; Stutters, Jonathan et al. (2021): Efficacy and safety of temelimab in
 multiple sclerosis: Results of a randomized phase 2b and extension study. In: *Mult Scler*, 135245852110249. DOI: 10.1177/13524585211024997.
- Hernán, M. A.; Zhang, S. M.; Lipworth, L.; Olek, M. J.; Ascherio, A. (2001): Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. In: *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 12 (3), S. 301–306.
- Hofman, F. M.; Hinton; Johnson, K.; Merrill, J. E. (1989): Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. In: *Journal of Experimental Medicine* 170 (2), S. 607–612.
- Islam, Talat; Gauderman, W. James; Cozen, Wendy; Mack, Thomas M. (2007): Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. In: *Neurology* 69 (4), S. 381–388. DOI: 10.1212/01.wnl.0000268266.50850.48.

- Jack, Carolyn S.; Arbour, Nathalie; Manusow, Joshua; Montgrain, Vivianne; Blain, Manon;
 McCrea, Ellie et al. (2005): TLR signaling tailors innate immune responses in human
 microglia and astrocytes. In: *The Journal of Immunology* 175 (7), S. 4320–4330.
- Jha, Mithilesh Kumar; Lee, Won-Ha; Suk, Kyoungho (2016): Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. In: *Biochemical pharmacology* 103, S. 1–16.
- Jong, Brigit A. de; Huizinga, Tom W. J.; Bollen, Eduard L E M; Uitdehaag, Bernard M. J.; Bosma, Gerlof P. Th; van Buchem, Mark A. et al. (2002): Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 126 (1-2), S. 172–179. DOI: 10.1016/s0165-5728(02)00056-5.
- Kingwell, Elaine; Marriott, James J.; Jette, Nathalie; Pringsheim, Tamara; Makhani, Naila;
 Morrow, Sarah A. et al. (2013): Incidence and prevalence of multiple sclerosis in
 Europe. A systematic review. In: *BMC neurology* 13, S. 128. DOI: 10.1186/1471-2377-13-128.
- Kloss, C. U.; Bohatschek, M.; Kreutzberg, G. W.; Raivich, G. (2001): Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. In: *Experimental neurology* 168 (1), S. 32–46.
- Koch-Henriksen, Nils; Sørensen, Per Soelberg (2010): The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. In: *The Lancet Neurology* 9 (5), S. 520–532. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70064-8.
- Krady, J. Kyle; Lin, Hsiao-Wen; Liberto, Christina M.; Basu, Anirban; Kremlev, Sergey G.;
 Levison, Steven W. (2008): Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. In: *Journal of neuroscience research* 86 (7), S. 1538–1547. DOI: 10.1002/jnr.21620.
- Krei, K.; Fredrikson, S.; Fontana, A.; Link, H. (1991): Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 31 (2), S. 147–153.

- Kremer, D.; Schichel, T.; Forster, M.; Tzekova, N.; Bernard, C.; van der Valk, P. et al.
 (2013): Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits
 oligodendroglial precursor cell differentiation. In: *Annals of neurology* 74 (5), S. 721–732. DOI: 10.1002/ana.23970.
- Kremer, David; Forster, Moritz; Schichel, Tanja; Gottle, Peter; Hartung, Hans-Peter;
 Perron, Herve; Kury, Patrick (2015): The neutralizing antibody GNbAC1 abrogates
 HERV-W envelope protein-mediated oligodendroglial maturation blockade. In:
 Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England) 21 (9), S. 1200–1203. DOI:
 10.1177/1352458514560926.
- Kremer, David; Gruchot, Joel; Weyers, Vivien; Oldemeier, Lisa; Göttle, Peter; Healy, Luke et al. (2019): pHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (30), S. 15216–15225. DOI: 10.1073/pnas.1901283116.
- Kremer, David; Heinen, Andre; Jadasz, Janusz; Gottle, Peter; Zimmermann, Kristin;
 Zickler, Philipp et al. (2009): p57kip2 is dynamically regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis and interferes with oligodendroglial maturation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (22), S. 9087–9092. DOI: 10.1073/pnas.0900204106.
- Kurtzke, J. F.; Beebe, G. W.; Norman, J. E., JR (1979): Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans. 1. Race, sex, and geographic distribution. In: *Neurology* 29 (9 Pt 1), S. 1228–1235.
- Kutzelnigg, Alexandra; Lucchinetti, Claudia F.; Stadelmann, Christine; Bruck, Wolfgang;
 Rauschka, Helmut; Bergmann, Markus et al. (2005): Cortical demyelination and
 diffuse white matter injury in multiple sclerosis. In: *Brain : a journal of neurology* 128
 (Pt 11), S. 2705–2712.
- Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Gilker, C.; Griffith, O. W.; Matthews, D. E.; Stuehr, D. J. (1990):
 L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The
 ureido oxygen derives from dioxygen. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (23),
 S. 13442–13445.

- Lampron, Antoine; Larochelle, Antoine; Laflamme, Nathalie; Prefontaine, Paul; Plante, Marie-Michele; Sanchez, Maria Gabriela et al. (2015): Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. In: *J Exp Med* 212 (4), S. 481– 495.
- Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J. et al. (2001):
 Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (6822), S. 860–921. DOI: 10.1038/35057062.
- Langer-Gould, Annette; Brara, Sonu M.; Beaber, Brandon E.; Zhang, Jian L. (2013):
 Incidence of multiple sclerosis in multiple racial and ethnic groups. In: *Neurology* 80 (19), S. 1734–1739. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182918cc2.
- Lassmann, Hans (2018): Multiple Sclerosis Pathology. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 8 (3). DOI: 10.1101/cshperspect.a028936.
- Leray, E.; Moreau, T.; Fromont, A.; Edan, G. (2016): Epidemiology of multiple sclerosis. In: *Revue neurologique* 172 (1), S. 3–13. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.10.006.
- Levin, Lynn I.; Munger, Kassandra L.; O'reilly, Eilis J.; Falk, Kerstin I.; Ascherio, Alberto
 (2010): Primary infection with the epstein-barr virus and risk of multiple sclerosis. In:
 Annals of neurology 67 (6), S. 824–830.
- Li, Qingyun; Barres, Ben A. (2018): Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. In: *Nature Reviews Immunology* 18 (4), S. 225.
- Li, Wenxue; Lee, Myoung-Hwa; Henderson, Lisa; Tyagi, Richa; Bachani, Muzna; Steiner, Joseph et al. (2015): Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. In: *Science translational medicine* 7 (307), 307ra153. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac8201.
- Lieberman, Andrew P.; Pitha, Paula M.; Shin, Hyun S.; Shin, Moon L. (1989): Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (16), S. 6348–6352.
- Lim, Su-Yin; Constantinescu, Cris S. (2010): TNF- α : A paradigm of paradox and complexity in multiple sclerosis and its animal models. In: *The open autoimmunity journal* 2 (1).

- Lin, Chih-Chung; Edelson, Brian T. (2017): New Insights into the Role of IL-1beta in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198 (12), S. 4553–4560.
- Liu, T.; Clark, R. K.; McDonnell, P. C.; Young, P. R.; White, R. F.; Barone, F. C.; Feuerstein,
 G. Z. (1994): Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. In: *Stroke* 25 (7), S. 1481–1488.
- Lively, S.; Schlichter, L. C. (2013): The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion. In: *Journal of neuroinflammation* 10, S. 75.
- Lublin, F. D. (2014): New multiple sclerosis phenotypic classification. In: *Eur Neurol* 72 Suppl 1, S. 1–5. DOI: 10.1159/000367614.
- Lublin, F. D.; Reingold, S. C. (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis.
 results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory
 Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. In: *Neurology* 46 (4),
 S. 907–911.
- Lublin, Fred D.; Reingold, Stephen C.; Cohen, Jeffrey A.; Cutter, Gary R.; Sorensen, Per Soelberg; Thompson, Alan J. et al. (2014): Defining the clinical course of multiple sclerosis. The 2013 revisions. In: *Neurology* 83 (3), S. 278–286. DOI: 10.1212/WNL.00000000000560.
- Lue, Lih-Fen; Beach, Thomas G.; Walker, Douglas G. (2019): Alzheimer's Disease Research Using Human Microglia. In: *Cells* 8 (8). DOI: 10.3390/cells8080838.
- Maimone, Davide; Guazzi, Gian Carlo; Annunziata, Pasquale (1997): IL-6 detection in multiple sclerosis brain. In: *Journal of the neurological sciences* 146 (1), S. 59–65.
- Mameli, G.; Astone, V.; Arru, G.; Marconi, S.; Lovato, L.; Serra, C. et al. (2007): Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. In: *The Journal of general virology* 88 (Pt 1), S. 264–274. DOI: 10.1099/vir.0.81890-0.
- Mameli, G.; Erre, G. L.; Caggiu, E.; Mura, S.; Cossu, D.; Bo, M. et al. (2017): Identification of a HERV-K env surface peptide highly recognized in Rheumatoid Arthritis (RA) patients. A cross-sectional case-control study. In: *Clinical and experimental immunology* 189 (1), S. 127–131. DOI: 10.1111/cei.12964.
- Mameli, Giuseppe; Poddighe, Luciana; Mei, Alessandra; Uleri, Elena; Sotgiu, Stefano;
 Serra, Caterina et al. (2012): Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes. Inference for multiple sclerosis. In: *PloS one* 7 (9), e44991. DOI: 10.1371/journal.pone.0044991.
- Marinelli, Carla; Di Liddo, Rosa; Facci, Laura; Bertalot, Thomas; Conconi, Maria Teresa; Zusso, Morena et al. (2015): Ligand engagement of Toll-like receptors regulates their expression in cortical microglia and astrocytes. In: *Journal of neuroinflammation* 12, S. 244. DOI: 10.1186/s12974-015-0458-6.
- McCarthy, Gizelle M.; Bridges, Courtney R.; Blednov, Yuri A.; Harris, R. Adron (2017): CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways. In: *F1000Research* 6, S. 1144. DOI: 10.12688/f1000research.12036.1.
- McCarthy, K. D.; Vellis, J. de (1980): Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. In: *The Journal of cell biology* 85 (3), S. 890–902.
- Mi, Sha; Lee, Xinhua; Li, Xiang-ping; Veldman, Geertruida M.; Finnerty, Heather; Racie,
 Lisa et al. (2000): Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human
 placental morphogenesis. In: *Nature* 403 (6771), S. 785–789.
- Mizee, Mark R.; Miedema, Suzanne S. M.; van der Poel, Marlijn; Adelia; Schuurman,
 Karianne G.; van Strien, Miriam E. et al. (2017): Isolation of primary microglia from
 the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. In: *Acta neuropathologica communications* 5 (1), S. 16. DOI: 10.1186/s40478-017-0418-8.
- Molteni, Monica; Gemma, Sabrina; Rossetti, Carlo (2016): The Role of Toll-Like Receptor
 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. In: *Mediators of inflammation* 2016,
 S. 6978936. DOI: 10.1155/2016/6978936.

- Montgomery, Sara L.; Bowers, William J. (2012): Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. In: *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 7 (1), S. 42–59.
- Morandi, Elena; Tanasescu, Radu; Tarlinton, Rachael E.; Constantinescu, Cris S.; Zhang, Weiya; Tench, Christopher; Gran, Bruno (2017): The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis. A systematic review and metaanalysis. In: *PloS one* 12 (2), e0172415.
- Moyes, David L.; Martin, Alex; Sawcer, Stephen; Temperton, Nigel; Worthington, Jane; Griffiths, David J.; Venables, Patrick J. (2005): The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. In: *Genomics* 86 (3), S. 337–341. DOI: 10.1016/j.ygeno.2005.06.004.
- Munger, K. L.; Zhang, S. M.; O'Reilly, E.; Hernan, M. A.; Olek, M. J.; Willett, W. C.;
 Ascherio, A. (2004): Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. In: *Neurology* 62 (1), S. 60–65.
- Nayak, D.; Roth, T. L.; McGavern, D. B. (2014): Microglia development and function. In: Annu Rev Immunol 32, S. 367–402. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.
- Nellåker, Christoffer; Yao, Yuanrong; Jones-Brando, Lorraine; Mallet, François; Yolken,
 Robert H.; Karlsson, Håkan (2006): Transactivation of elements in the human
 endogenous retrovirus W family by viral infection. In: *Retrovirology* 3 (1), S. 44. DOI:
 10.1186/1742-4690-3-44.
- Ni, Mingwei; Aschner, Michael (2010): Neonatal rat primary microglia. Isolation, culturing, and selected applications. In: *Current protocols in toxicology* Chapter 12, Unit 12.17. DOI: 10.1002/0471140856.tx1217s43.
- O'Loughlin, Elaine; Madore, Charlotte; Lassmann, Hans; Butovsky, Oleg (2018): Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 8 (2), a028993.
- Ogasawara, H.; Naito, T.; Kaneko, H.; Hishikawa, T.; Sekigawa, I.; Hashimoto, H. et al. (2001): Quantitative analyses of messenger RNA of human endogenous retrovirus in

patients with systemic lupus erythematosus. In: *The Journal of rheumatology* 28 (3), S. 533–538.

- O'Gorman, Cullen; Lin, Rui; Stankovich, James; Broadley, Simon A. (2013): Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. In: *Neuroepidemiology* 40 (1), S. 1–12. DOI: 10.1159/000341902.
- Olson, J. K.; Miller, S. D. (2004): Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173 (6), S. 3916–3924.
- Orihuela, R.; McPherson, C. A.; Harry, G. J. (2016): Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. In: *British journal of pharmacology* 173 (4), S. 649–665. DOI: 10.1111/bph.13139.
- Parseval, N. de; Heidmann, T. (2005): Human endogenous retroviruses. From infectious elements to human genes. In: *Cytogenetic and genome research* 110 (1-4), S. 318–332. DOI: 10.1159/000084964.
- Parseval, Nathalie de; Lazar, Vladimir; Casella, Jean-Francois; Benit, Laurence; Heidmann, Thierry (2003): Survey of human genes of retroviral origin. Identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. In: *Journal of virology* 77 (19), S. 10414–10422.
- Peri, Francesco; Piazza, Matteo; Calabrese, Valentina; Damore, Gaetana; Cighetti,
 Roberto (2010): Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. In:
 Biochemical Society transactions 38 (5), S. 1390–1395.
- Perron, H.; Dougier-Reynaud, H. L.; Lomparski, C.; Popa, I.; Firouzi, R.; Bertrand, J. B. et al. (2013): Human endogenous retrovirus protein activates innate immunity and promotes experimental allergic encephalomyelitis in mice. In: *PloS one* 8 (12), e80128. DOI: 10.1371/journal.pone.0080128.
- Perron, H.; Garson, J. A.; Bedin, F.; Beseme, F.; Paranhos-Baccala, G.; Komurian-Pradel, F. et al. (1997): Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple

Sclerosis. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (14), S. 7583–7588.

- Perron, H.; Geny, C.; Laurent, A.; Mouriquand, C.; Pellat, J.; Perret, J.; Seigneurin, J. M. (1989): Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. In: *Research in virology* 140 (6), S. 551–561.
- Perron, H.; Germi, R.; Bernard, C.; Garcia-Montojo, M.; Deluen, C.; Farinelli, L. et al. (2012a): Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. In: *Multiple sclerosis* (*Houndmills, Basingstoke, England*) 18 (12), S. 1721–1736. DOI: 10.1177/1352458512441381.
- Perron, H.; Hamdani, N.; Faucard, R.; Lajnef, M.; Jamain, S.; Daban-Huard, C. et al. (2012b): Molecular characteristics of Human Endogenous Retrovirus type-W in schizophrenia and bipolar disorder. In: *Translational psychiatry* 2, e201. DOI: 10.1038/tp.2012.125.
- Perron, H.; Lalande, B.; Gratacap, B.; Laurent, A.; Genoulaz, O.; Geny, C. et al. (1991):
 Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. In: *The Lancet* 337 (8745),
 S. 862–863. DOI: 10.1016/0140-6736(91)92579-Q.
- Perron, H.; Lang, A. (2010): The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. In: *Clinical reviews in allergy & immunology* 39 (1), S. 51–61. DOI: 10.1007/s12016-009-8170-x.
- Perron, H.; Lazarini, F.; Ruprecht, K.; Pechoux-Longin, C.; Seilhean, D.; Sazdovitch, V. et al. (2005): Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins.
 physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. In: *Journal of neurovirology* 11 (1), S. 23–33.
- Petersen, G.; Wittmann, R.; Arndt, V.; Göpffarth, D. (2014): Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. In: *Der Nervenarzt* 85 (8), S. 990–998.

- Politis, Marios; Giannetti, Paolo; Su, Paul; Turkheimer, Federico; Keihaninejad, Shiva;
 Wu, Kit et al. (2012): Increased PK11195 PET binding in the cortex of patients with MS correlates with disability. In: *Neurology* 79 (6), S. 523–530.
- Popescu, Bogdan F. Gh; Lucchinetti, Claudia F. (2012): Pathology of demyelinating diseases. In: Annual review of pathology 7, S. 185–217. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132443.
- Prineas, J. W.; Barnard, R. O.; Kwon, E. E.; Sharer, L. R.; Cho, E. S. (1993): Multiple sclerosis. Remyelination of nascent lesions. In: *Annals of neurology* 33 (2), S. 137–151.
 DOI: 10.1002/ana.410330203.
- Pullmann, Rudolf; Bonilla, Eduardo; Phillips, Paul E.; Middleton, Frank A.; Perl, Andras (2008): Haplotypes of the HRES-1 endogenous retrovirus are associated with development and disease manifestations of systemic lupus erythematosus. In: *Arthritis & Rheumatology* 58 (2), S. 532–540.
- Ransohoff, Richard M. (2016): A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? In: *Nature neuroscience* 19 (8), S. 987–991.
- Reynier, F.; Verjat, T.; Turrel, F.; Imbert, P. E.; Marotte, H.; Mougin, B.; Miossec, P.
 (2009): Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. In: *Scandinavian journal of immunology* 70 (3), S. 295–299. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02271.x.
- Richards, R. G.; Simpson, F. C.; Beard, S. M.; Tappenden, P. (2002): A review of the natural history and epidemiology of multiple sclerosis. Implications for resource allocation and health economic models.
- Rolland, A.; Jouvin-Marche, E.; Viret, C.; Faure, M.; Perron, H.; Marche, P. N. (2006): The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (12), S. 7636–7644.
- Rolland, Alexandre; Jouvin-Marche, Evelyne; Saresella, Marina; Ferrante, Pasquale; Cavaretta, Rosella; Creange, Alain et al. (2005): Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSRV (multiple sclerosis associated

retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 160 (1-2), S. 195–203. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.019.

- Rossi, Silvia; Studer, Valeria; Motta, Caterina; Germani, Giorgio; Macchiarulo, Giulia; Buttari, Fabio et al. (2014): Cerebrospinal fluid detection of interleukin-1beta in phase of remission predicts disease progression in multiple sclerosis. In: *Journal of neuroinflammation* 11, S. 32.
- Rothaug, Michelle; Becker-Pauly, Christoph; Rose-John, Stefan (2016): The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1863 (6), S. 1218–1227.
- Saha, Ramendra N.; Pahan, Kalipada (2006): Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. In: *Antioxidants & redox signaling* 8 (5-6), S. 929–947.
- Sawcer, Stephen; Hellenthal, Garrett; Pirinen, Matti; Spencer, Chris C. A.; Patsopoulos, Nikolaos A.; Moutsianas, Loukas et al. (2011): Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. In: *Nature* 476 (7359), S. 214–219. DOI: 10.1038/nature10251.
- Scalfari, Antonio; Knappertz, Volker; Cutter, Gary; Goodin, Douglas S.; Ashton, Raymond;
 Ebers, George C. (2013): Mortality in patients with multiple sclerosis. In: *Neurology* 81 (2), S. 184–192. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31829a3388.
- Sharief, Mohammad K.; Hentges, Romain (1991): Association between tumor necrosis factor-α and disease progression in patients with multiple sclerosis. In: *New England Journal of Medicine* 325 (7), S. 467–472.
- Sicat, Jocelyn; Sutkowski, Natalie; Huber, Brigitte T. (2005): Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. In: *The Journal of rheumatology* 32 (9), S. 1821–1831.
- Simone, Roberta de; Niturad, Cristina Elena; Nuccio, Chiara de; Ajmone-Cat, Maria Antonietta; Visentin, Sergio; Minghetti, Luisa (2010): TGF-beta and LPS modulate ADP-induced migration of microglial cells through P2Y1 and P2Y12 receptor expression. In: *Journal of neurochemistry* 115 (2), S. 450–459.

- Simpson, Steve, JR; Blizzard, Leigh; Otahal, Petr; van der Mei, Ingrid; Taylor, Bruce (2011): Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis. A meta-analysis. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82 (10), S. 1132– 1141. DOI: 10.1136/jnnp.2011.240432.
- Smith, Kenneth J.; Lassmann, Hans (2002): The role of nitric oxide in multiple sclerosis. In: *The Lancet Neurology* 1 (4), S. 232–241.
- Sotgiu, S.; Mameli, G.; Serra, C.; Zarbo, I. R.; Arru, G.; Dolei, A. (2010): Multiple sclerosisassociated retrovirus and progressive disability of multiple sclerosis. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 16 (10), S. 1248–1251. DOI: 10.1177/1352458510376956.
- Tamashiro, Tami T.; Dalgard, Clifton Lee; Byrnes, Kimberly R. (2012): Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (66), e3814. DOI: 10.3791/3814.
- Thompson, Alan J.; Banwell, Brenda L.; Barkhof, Frederik; Carroll, William M.; Coetzee, Timothy; Comi, Giancarlo et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. In: *The Lancet Neurology* 17 (2), S. 162–173. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- van Horssen, Jack; van der Pol, Susanne; Nijland, Philip; Amor, Sandra; Perron, Herve (2016): Human endogenous retrovirus W in brain lesions. Rationale for targeted therapy in multiple sclerosis. In: *Multiple sclerosis and related disorders* 8, S. 11–18. DOI: 10.1016/j.msard.2016.04.006.
- Varela, Mariana; Spencer, Thomas E.; Palmarini, Massimo; Arnaud, Frederick (2009):
 Friendly viruses. The special relationship between endogenous retroviruses and their host. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1178, S. 157–172. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05002.x.
- Voisset, Cecile; Weiss, Robin A.; Griffiths, David J. (2008): Human RNA "rumor" viruses.
 The search for novel human retroviruses in chronic disease. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 72 (1), 157-96, table of contents. DOI: 10.1128/MMBR.00033-07.

Weiner, Howard L. (2004): Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. In: Archives of neurology 61 (10), S. 1613–1615. DOI: 10.1001/archneur.61.10.1613.

World Health Organization (2008): Atlas. Multiple sclerosis resources in the world 2008.

- Wu, Zhouwei; Mei, Xingyu; Di Zhao; Sun, Yue; Song, Jun; Pan, Weihua; Shi, Weimin
 (2015): DNA methylation modulates HERV-E expression in CD4+ T cells from systemic
 lupus erythematosus patients. In: *Journal of dermatological science* 77 (2), S. 110–
 116. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.12.004.
- Xiao, Ran; Li, Shan; Cao, Qian; Wang, Xiuling; Yan, Qiujin; Tu, Xiaoning et al. (2017):
 Human endogenous retrovirus W env increases nitric oxide production and enhances the migration ability of microglia by regulating the expression of inducible nitric oxide synthase. In: *Virologica Sinica* 32 (3), S. 216–225.
- Xue, Qingjie; Yan, Yingchun; Zhang, Ruihua; Xiong, Huabao (2018): Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. In: *International journal of molecular sciences* 19 (12).
- Yao, Linli; Kan, Enci Mary; Lu, Jia; Hao, Aijun; Dheen, S. Thameem; Kaur, Charanjit; Ling, Eng-Ang (2013): Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia. Role of TLR4 in hypoxic microglia. In: *Journal of neuroinflammation* 10, S. 23. DOI: 10.1186/1742-2094-10-23.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Hr. Prof. Dr. Patrick Küry für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hervorragende Betreuung danken.

Ein besonderer Dank gilt Hr. PD Dr. David Kremer für die fachliche und organisatorische Betreuung während des gesamten Zeitraums meiner Promotion, die vielen Ratschläge und Diskussionen. Danke für die unzähligen Stunden der Einarbeitung im Labor und die geduldige Unterstützung zu jeder Tageszeit.

Den Mitgliedern unserer Forschungsgruppe möchte ich für die Bereitstellung der ZNS-Mischkultur danken. Zudem danke ich für die gute Zusammenarbeit, das großartige Arbeitsklima, die stete Unterstützung und die konstruktiven Vorschläge.

Für die Korrektur der Dissertationsschrift danke ich meinen Freundinnen Nina und Miriam. Ein besonderer Dank gilt meinem Partner Alex: Du stehst immer an meiner Seite und hast mich unermüdlich ermuntert weiterzumachen. Ich weiß, dass ich immer auf dich zählen kann.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Partner, meiner Familie und meinen Freunden dafür bedanken, dass sie immer an mich glauben! Ihr seid immer da, wenn ich euch brauche und macht aus mir einen besseren Menschen: Ihr seid einfach die Besten!