Julia Vienenkötter

Untersuchung der Rolle von Lipocalin-2 bei viral-induzierten neuroinflammatorischen Prozessen am Beispiel BoDV-1-infizierter TNF**-a**-transgener und TNFR-knockout-Mäuse



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen Printed in Germany





STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890 email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christiane Herden

Untersuchung der Rolle von Lipocalin-2 bei viral-induzierten neuroinflammatorischen Prozessen am Beispiel BoDV-1-infizierter TNF-α-transgener und TNFR-knockout-Mäuse

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julia Vienenkötter

Tierärztin aus Warendorf

Gießen, 2019

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. C. Herden

Prof. Dr. C. Rummel

Tag der Disputation: 16. Dezember 2019

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten. **Meiner Familie**

In der Mitte von Schwierigkeiten liegen die Möglichkeiten. (Albert Einstein)

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHAL1	INHALTSVERZEICHNIS 1					
2	EINLEI	TUNG	6				
3	LITERA	TURÜBERSICHT	9				
	3.1 Bo	DV-1 und die Bornasche Krankheit	9				
	3.1.1	Borna Disease Virus-1	10				
	3.1.2	Epidemiologie und Klinik	15				
	3.1.3	Pathogenese					
	3.2 As	trozyten					
	3.2.1	Astrozytäre Funktionen unter physiologischen Bedingungen	20				
	3.2.2	Rolle von Astrozyten bei der Neuroinflammation	20				
	3.3 Lip	ocalin-2	25				
	3.3.1	Lipocalin-2: Struktur, Rezeptoren und zellulärer Ursprung	25				
	3.3.2	Bedeutung und Funktionen von Lipocalin-2 im ZNS	27				
	3.3.3	Lipocalin-2 im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse	28				
	3.3.4	Lipocalin-2-vermittelte Signalwege	30				
	3.4 Tu	mor Nekrose Faktor-α					
	3.4.1	$TNF\text{-}\alpha$ und seine Rezeptoren im ZNS	32				
	3.4.2	$TNF-\alpha$ und Neuroinflammation	36				
	3.4.2	.1 TNF-α und Virusinfektionen	38				
	3.4.2	.2 TNF-α und Epilepsie	38				
	3.4.3	Mausmodelle zur Untersuchung des TNF-α-Systems	40				
4	MATER	RIAL UND METHODEN	41				
	4.1 Ve	rsuchsplanung	41				
	4.1.1	In-vivo-Untersuchungen	41				
	4.1.2	In-vitro-Untersuchungen	43				
	4.2 Ve	rsuchstiere					
	4.2.1	Wildtyp-Mäuse	44				
	4.2.2	TNF-α-transgene Mäuse	44				

4	.2.3	TN	FR1-knockout-Mäuse	45
4	.2.4	TN	FR2-knockout-Mäuse	46
4	.2.5	Ana	alyse des transgenen Status der Mäuse	46
	4.2.5	.1	Analyse des transgenen Status der TNF-α-transgenen und Wildtyp-Mät	Jse
				46
	4.2.5.2		Analyse des transgenen Status der TNFR1- bzw. TNFR2-k.oMäuse	48
4.3	Un	ngang	g mit virus-infiziertem und genetisch verändertem Material	52
4.4	In-	vivo-l	Untersuchungen	53
4	.4.1	Imn	nunhistologische Untersuchungen (IHC)	53
	4.4.1	.1	Immunhistologischer Nachweis von Lipocalin-2-Antigen im murinen ZN	S53
	4.4.1	.2	Auswertung der immunhistologischen Untersuchung	58
	4.4.1	.3 Im	munhistologische Doppelmarkierung zum Nachweis von Lipocalin-2- und	Ł
		GF	-AP-Antigen	59
	4.4.1	.4	Auswertung der immunhistologischen Doppelmarkierung	60
4	.4.2	In-s	itu-Hybridisierung (ISH)	60
	4.4.2	.1	Synthese der RNA-Sonden	61
	4.4.2.2		Durchführung der In-situ-Hybridisierung (ISH)	67
	4.4.2	.3	Auswertung der In-situ-Hybridisierung	70
4	.4.3	Sta	tistische Auswertung der In-vivo-Untersuchungen	71
4.5	In-	vitro-	Untersuchungen	72
4	.5.1	Prä	paration und BoDV-1-Infektion primärer kortikaler Astrozytenkulturen	72
	4.5.1	.1	Präparation muriner kortikaler Astrozyten	72
	4.5.1	.2	Waschen und mikroskopische Kontrolle	73
	4.5.1	.3	BoDV-1-Infektion der murinen primären Astrozyten	73
	4.5.1	.4	Passage der murinen primären Astrozyten	73
	4.5.1	.5	Inkubation der murinen primären Astrozyten mit TNF-a	74
	4.5.1	.6	Pro- bzw. antiinflammatorische Stimulation der murinen Astrozyten	76
4	.5.2	Indi	irekte Immunfluoreszenz	76
	4.5.2	.1	Fixierung der Astrozytenkulturen	76

			4.5.2.2		Indirekte Immunfluoreszenz – Tripelmarkierung	76
		4	.5.2.	3	Auswertung der Immunfluoreszenz	79
		4.5	.3	Stat	tistische Auswertung der In-vitro-Untersuchungen	80
5		ER	GEB	NISS	E	81
	5.1	1	Erg	ebnis	sse der In-vivo-Untersuchungen	81
	;	5.1.	.1	Imn	nunhistologische Untersuchungen	81
		5	.1.1.	1	Immunhistologischer Nachweis der Lipocalin-2-Expression	81
		5.1.1.		2	Immunhistologische Doppelmarkierung zum Nachweis von Lipocalin-2 GFAP	2 und 94
	;	5.1	.2	In-s	itu-Hybridisierung zum Nachweis von Lipocalin-2-mRNA	95
	5.2	2	Erg	ebnis	sse der In-vitro-Untersuchungen	101
	;	5.2	.1	Lcn	2-Expression primärer muriner Astrozytenkulturen	101
		5	.2.1.	1	Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten der Wildtyp-Mäuse (wt/wt)	103
	5.2.1.2		2	Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten TNF-α-transgener (tg/tg) Mäuse	104	
		5	.2.1.	3	Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten von TNFR1-k.oMäusen	106
		5	.2.1.	4	Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten von TNFR2-k.oMäusen	107
		5	.2.1.	5	Vergleich der Lcn2-Expression und BoDV-1-Infektion der verschieden Mauslinien	en 108
	:	5.2	.2	Lcn Beh	2-Expression der primären murinen Astrozytenkulturen nach TNF-α- nandlung	111
		5	.2.2.	1	Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der Wildtyp-Mäu	se 111
		5	.2.2.	2	Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der TNF-α- transgenen Mäuse	113
		5	.2.2.	3	Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der TNFR1 Mäuse	-k.o 114

	5.2.2.4		Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der TNFR	2-k.o			
			Mäuse	115			
	5.	.2.2.5	Vergleich der Lcn2-Expression der Astrozyten verschiedener Mauslin	nien			
			nach TNF-α-Behandlung	116			
	5.2.	3 Lcr	2-Expression der primären murinen Astrozytenkulturen nach IFN-γ/LF	'S-			
		Bel	handlung	120			
	5.2.	4 Lcr	2-Expression der primären murinen Astrozytenkulturen nach IL-4-				
		Bel	handlung	123			
6	DIS	KUSSIO	N	125			
	6.1	In-vivo-	Untersuchungen	127			
	6.1.	1 Imr	nunhistologischer Nachweis von Lipocalin-2	127			
	6.1.	2 Na	chweis von Lipocalin-2-mRNA mittels In-situ-Hybridisierung	137			
	6.2	In-vitro-	Untersuchungen	140			
	6.2.	1 Lip	ocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen				
		Ast	rozytenkulturen	140			
	6.2.	2 Lip	ocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen				
		Ast	rozytenkulturen nach TNF-α-Behandlung	147			
	6.2.	3 Lip	ocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen				
		Ast	rozytenkulturen nach LPS/IFN-γ-Behandlung	150			
	6.2.	4 Lip	ocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen				
		Ast	rozytenkulturen nach IL-4-Behandlung	152			
7	ZUS	USAMMENFASSUNG					
8	SUN	JMMARY					
9	LITE	ERATURVERZEICHNIS16					
1() A	NHANG		218			
	10.1	Lösung	en und Puffer	218			
	10.2	Bezugs	quellen für Antikörper, Einmalwaren, Kits und Reagenzien	226			
	10.3	Bezugs	quellen für Geräte und Software	230			
	10.4	Rohdat	en	233			
	10.5 Abb		unasverzeichnis				
	10.6	Abbild	ungsverzeichnis	267			
	10.0	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,					

10.7	Tabellenverzeichnis	. 269)
------	---------------------	-------	---

2 EINLEITUNG

Die zentrale Rolle neuroinflammatorischer Prozesse bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) ist durch zahlreiche Studien belegt und reicht von akuten Läsionen bis hin zu chronischen neurodegenerativen Erkrankungen (CHEN et al., 2016; KEMPURAJ et al., 2016; RANSOHOFF, 2016). Auch funktionelle Störungen neuronaler Schaltkreise können durch Entzündungsmediatoren getriggert werden, so dass die Neuroinflammation von wesentlicher Bedeutung für die Epileptogenese ist (IORI et al., 2016).

Neben infiltrierenden Entzündungszellen sind auch Gliazellen an immunologischen Prozessen des Neuroparenchyms beteiligt. Mikrogliazellen als Mitglieder des mononukleären Phagozytensystems detektieren und bekämpfen Infektionserreger im ZNS, spielen aber auch eine Rolle bei verschiedenen immunpathologischen Zuständen (Streit, 2007; Saijo, 2011). Die Rolle der Astrozyten wurde zunächst auf ihre mechanisch stützende Funktion der Neuronen reduziert, bevor die neurotrophen Eigenschaften dieser Gliazellen entdeckt wurden (CLASADONTE und HAYDON, 2012). Mittlerweile werden Astrozyten auch weitreichende immunologische Funktionen zugesprochen: Mit Hilfe von pattern recognition receptors können sie Fremdantigene detektieren, durch die Sekretion von Mediatoren das Entzündungsgeschehen modulieren und per Phagozytose mögliche Erreger beseitigen (BABCOCK et al., 2003; FARINA et al., 2007; LIDDELOW und BARRES, 2017; LIDDELOW et al., 2017; MORIZAWA et al., 2017; SOFRONIEW, 2015). Des Weiteren regulieren sie über ihre Endfüße die Permeabilität der Blut-Hirnschranke und beeinflussen darüber indirekt die intrazerebrale Immunantwort bzw. die Infiltration von Entzündungszellen (ABBOTT, 2002; KANG et al., 2010; LEE et al., 2000; POZNER et al., 2005). Durch die enge trophische Verbindung zu den Neuronen können Astrozyten über deren Vitalität bei krankhaften Zuständen entscheiden und einwirken (LIDDELOW et al., 2017). Über eine Ca²⁺-vermittelte Freisetzung von Neurotransmittern, wie dem exzitatorischen Glutamat, sowie das re-uptake der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt steuern Astrozyten die neuronale Erregbarkeit und sind an der Pathogenese epileptischer Prozesse von entscheidender Bedeutung (DE LANEROLLE et al., 2010). Reaktive Astrozyten können eine erhöhte Exzitabilität von Neuronen induzieren und damit die Entstehung epileptiformer Krämpfe fördern (ORTINSKI et al., 2010).

In Anlehnung an verschiedene funktionelle Phänotypen von Mikrogliazellen beschrieben JANG et al. (2013a) die phänotypische Polarisierung von Astrozyten, welche einen proinflammatorischen "A1"-Phänotyp oder einen antiinflammatorischen "A2"-Phänotyp hervorbringen kann, die sich durch Unterschiede der Genexpressionsprofile manifestieren. *In-vitro*-Untersuchungen zeigten, dass "A1"-Astrozyten die Sensibilität von ko-kultivierten Neuronen gegenüber exzitotoxischen Reizen und oxidativem Stress erhöhten (JANG et al., 2013a; LEE et al., 2009).

Lipocalin-2 (Lcn2), ein kleines, extrazelluläres Glykoprotein aus der Familie der Lipocaline, wird bei verschiedenen pathologischen Prozessen, insbesondere bei entzündlichen Prozessen, vermehrt exprimiert (ABELLA et al., 2015; JHA et al., 2015; LI und CHAN, 2011; LIU und NILSEN-HAMILTON, 1995; XIAO et al., 2017). Im ZNS steigt die Lcn2-Expression unter neuroinflammatorischen Konditionen, die durch diverse Noxen ausgelöst wurden, drastisch an (CHIA et al., 2015; IP et al., 2011; KANG et al., 2017; MARQUES et al., 2008). Proinflammatorische Zytokine, zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), fördern die Lcn2-Synthese. Zugleich soll Lcn2 über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1)-vermittelten proinflammatorische und prokonvulsive Effekte von TNF- α fördern und die TNF-Rezeptor 2 (TNFR2)-vermittelten neuroprotektiven, antikonvulsiven Effekte hemmen (NAUDE et al., 2012).

Astrozyten gelten als Hauptquelle des zerebral synthetisierten Lipocalin-2 und sollen dieses als proinflammatorischen auto- und parakrinen Botenstoff nutzen (BI et al., 2013; LEE et al., 2009). In der Literatur werden positive Effekte des Lcn2-knockout-Phänotyps beschrieben, welcher eine mildere Entzündungsreaktion nach proinflammatorischen Stimuli zeigt und somit die Hypothese der proinflammatorischen Wirkung von Lcn2 unterstützen (CHUN et al., 2015; JHA et al., 2013; JIN et al., 2014a; JIN et al., 2014b; KANG et al., 2017; NAM et al., 2014; NI et al., 2015; RATHORE et al., 2011).

Die Infektion mit dem neurotropen RNA-Virus Borna Disease Virus 1 (BoDV-1) wurde als Trigger neuroinflammatorischer Prozesse genutzt. Bei Fehlwirten, wie Pferden und Schafen, aber auch nach experimenteller Infektion von Nagern, kann das Virus eine fulminante Enzephalomyelitis hervorrufen, welche auf einem virus-induzierten immunpathologischen Geschehen basiert und in deren Verlauf eine reaktive Astrozytose sowie Mikrogliaaktivierung mit entsprechender Aufregulation proinflammatorischer Zytokine zu beobachten ist (HATALSKI et al., 1998; HERDEN et al., 2013; HERDEN et al., 2005; SHANKAR et al., 1992; WEISSENBÖCK et al., 2000). Die BoDV-1-Infektion erfolgte an Mausstämmen mit unterschiedlichen Veränderungen des TNF-Systems. Homo- und heterozygot TNF-α-transgene Mäuse wiesen eine moderate TNF-α-Überexpression in definierten Hirnarealen auf. Infolge der BoDV-1-Infektion zeigten die Tiere in früheren Arbeiten neuroinflammatorische Veränderungen und epileptiforme Krämpfe, so dass ein synergistischer, prokonvulsiver und proinflammatorischer Effekt von BoDV-1 und TNF-α vermutet wird (KRAMER, 2006; KRAMER et al., 2012; SCHAUDIEN, 2007). Nicht die Überexpression von TNF- α , sondern vielmehr die Verfügbarkeit der TNF-Rezeptoren scheinen entscheidend für die Entstehung der Erkrankung (SCHAUDIEN, 2007). Weiterhin wurden vergleichend C57BL/6-Wildtyp-Mäuse und TNFR1- bzw. TNFR2-k.o-Mäuse untersucht, die in vorigen Arbeiten eine geringe Empfänglichkeit für eine BoDV-1-induzierte Neuroinflammation sowie epileptiforme Krämpfe aufwiesen, jedoch der Klärung TNFR-abhängiger Effekte dienen sollten (ERICKSON et al., 1994; HIRZ, 2017; KRAMER, 2006; KRAMER

et al., 2012; MARCHETTI et al., 2004; ROTHE et al., 1993; SCHAUDIEN, 2007).

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Rolle von Lcn2 bei neurotropen Virusinfektionen, die mit einer Immunpathogenese einhergehen, unter besonderer Berücksichtigung der Wechselwirkung mit TNF-α. Ferner sollte auch die mögliche Rolle von Lcn2 in der Entstehung epileptiformer Krämpfe untersucht werden.

3 LITERATURÜBERSICHT

3.1 BoDV-1 und die Bornasche Krankheit

Infolge eines seuchenhaften Ausbruches bei Kavalleriepferden wurde die zunächst auch als "hitzige Kopfkrankheit des Pferdes" bezeichnete Bornasche Krankheit nach der Stadt Borna in Sachsen benannt (HERDEN et al., 2013; RICHT et al., 1997). Bereits 1909 beschrieben JO-EST und DEGEN (1909) nach histopathologischen Untersuchungen von equinem Hirngewebe die typischen intranukleären Einschlusskörperchen und diskutierten eine virale Genese. Die Infektionsversuche von ZWICK et al. (1925; 1927) und der Ausschluss einer bakteriellen Ätiologie erhärteten wenige Jahre später den Verdacht einer Virusinfektion. Die Isolation von Viruspartikeln sowie die Genomsequenzierung gelangen jedoch erst in den 1990er Jahren (BRIESE et al., 1992; LIPKIN et al., 1990; RICHT et al., 1993).

Die Bornasche Krankheit betrifft in Form einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis mit schwerer neurologischer Symptomatik insbesondere Pferde und Schafe in bestimmten Endemiegebieten, vor allem in Mittel- und Süddeutschland sowie in der Schweiz, Österreich und Liechtenstein (CAPLAZI et al., 1999; DÜRRWALD et al., 2006; DÜRRWALD und LUDWIG, 1997; HERZOG et al., 1994; METZLER et al., 1979; WEISSENBÖCK et al., 1998b). Darüber hinaus wurden natürliche Infektionen in einem großen Spektrum weiterer Tierarten beobachtet: Neben Nutz- und Zootieren, zum Beispiel Alpakas und Rinder, traten sehr selten auch spontane Erkrankungen bei Haustieren, wie Katzen und Hunde, auf (BODE et al., 1994; CAPLAZI et al., 1994; JACOBSEN et al., 2010; LUNDGREN et al.; MALKINSON et al., 1995; WEISSENBÖCK et al., 1998a).

Erst im letzten Jahrzehnt konnten aviäre Bornaviren als weitere Spezies in die Familie der *Bornaviridae* eingeordnet und als Verursacher der Neuropathischen Drüsenmagendilatation (*proventricular dilatation disease*, PDD) der Vögel entdeckt werden. Die PDD ist eine durch entzündliche Läsionen des gastrointestinalen autonomen Nervensystems charakterisierte Erkrankung (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; PAYNE et al., 2012). In den letzten Jahre wurde sowohl zahlreiche neue Mitglieder der Familie der Bornaviridae entdeckt als auch bisher unbekannte, durch Bornaviridae verursachte Krankheitsbilder identifiziert, die zudem eine Revision des zuvor als gering eingeschätzten zoonotischen Potentials von Bornaviren notwendig machten (AFONSO et al., 2016; AMARASINGHE et al., 2018; AMARASINGHE et al., 2017; KUHN et al., 2015). Das kürzlich bei Bunthörnchen entdeckte und der Spezies *Mammalian 2 bornavirus* zugeordnete Variegated squirrel 1 bornavirus (VSBV-1) konnte mit fatalen Enzephalitiden einzelner Bunthörnchenzüchter ursächlich in Verbindung gebracht werden und entfachte neues Interesse an der Familie der *Bornaviridae* (HOFFMANN et al., 2015; SCHLOTTAU et al., 2017; TAPPE et al., 2018). Erst Anfang 2018 wurden erstmals Fälle fataler Enzephalitiden bei Menschen bekannt gegeben, bei denen BoDV-1 als ursächlicher Erreger nachgewiesen werden konnte (ABBOTT, 2005; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2018; FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2018; KORN et al., 2018; RUBBENSTROTH et al., 2018; SCHLOTTAU et al., 2018).

3.1.1 Borna Disease Virus-1

Das Borna Disease Virus-1 (BoDV-1) ist ein behülltes, unsegmentiertes, einzelsträngiges und negativ-polarisiertes RNA-Virus, dessen Genom 8,9 Kilobasen (kb) umfasst (BRIESE et al., 1992; CUBITT und DE LA TORRE, 1994; DE LA TORRE et al., 1990; LIPKIN et al., 1990). Innerhalb der Ordnung der Mononegavirales bilden Bornaviridae eine eigene Familie, die sich durch ihr intranukleäres Replikationsverhalten sowie verschiedene ko-transkriptionale und posttranskriptionale Modifikationen, z. B. das "Überlesen" von Terminationspunkten der Transkription (read-through) oder das Spleißen der Transkripte des BoDV-1-Nukleoproteins auszeichnen (BRIESE et al., 1992; CUBITT et al., 1994a; DE LA TORRE, 1994; KOJIMA et al., 2019; POENISCH et al., 2008b; PRINGLE, 1996). Angesichts irreführender Bezeichnungen und zahlreicher neu entdeckter Angehöriger der Bornaviridae bei verschiedensten Tierarten wurde deren Klassifizierung und Nomenklatur überarbeitet und geändert: Die Spezies "Mammalian 1 bornavirus" enthält neben dem "klassischen" BoDV-1, welches den Untersuchungen in dieser Arbeit zugrunde liegt, auch das genetisch divergente BoDV-2. Das Mammalian 1 bornavirus zählt neben weiteren Spezies aviärer Bornaviren, einem bei Reptilien isolierten Bornavirus und der Spezies des Mammalian 2 bornavirus (beinhaltet das oben genannte variegated squirrel bornavirus) zum Genus Orthobornavirus (AFONSO et al., 2016; AMARASINGHE et al., 2018; AMARASINGHE et al., 2017; KUHN et al., 2015). Nach der Entdeckung von zwei weiteren bei Reptilien vorkommenden Bornaviren wurden diese Anfang 2018 dem Genus Carbovirus zugeordnet (AMARASINGHE et al., 2018; HYNDMAN et al., 2018). Die im Folgenden beschriebenen Erkenntnisse hinsichtlich der Genomstruktur beziehen sich auf BoDV-1, welches in der Vergangenheit im Fokus der Forschung stand. Das Genom des Genus Carbovirus ähnelt dem des Genus Orthobornavirus, zeichnet sich aber durch eine Transposition der Segmente, die für das virale Matrix- bzw. Glykoprotein kodieren, aus und begründet damit die Neuordnung der Taxonomie der Bornaviridae (HYNDMAN et al., 2018).

Die ungewöhnliche Genomorganisation des BoDV-1 ist durch das fast völlige Fehlen intergenischer Sequenzen und die resultierende Überlappung der Transkriptionseinheiten und von Start- sowie Terminationspunkten der Polymerase geprägt (BRIESE et al., 1994; POENISCH

et al., 2008b). Die unsegmentierte RNA des BoDV-1 weist 3 Transkriptionseinheiten und mindestens sechs offene Leseraster - Open Reading Frames (ORF) - auf, die für sechs virale Proteine kodieren. Die erste Transkriptionseinheit enthält lediglich den ORF I, welcher für das virale Nukleoprotein BoDV-1-N kodiert. Die zweite bicistronische Transkriptionseinheit umfasst die sich überlappenden ORFs X und II, welche die Seguenzen für das X-Protein BoDV-1-X beziehungsweise das Phosphoprotein BoDV-1-P enthalten. Die 3. Transkriptionseinheit ist ebenfalls polycistonisch, umfasst die ORFs III bis IV sowie die Introns I bis III und dient der Generierung des Matrixproteins BoDV-1-M. des Glykoproteins BoDV-1-GP sowie der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase L. Sämtliche mRNAs der 3. Transkriptionseinheit erfahren durch das Spleißen eine posttranskriptionale Prozessierung: Die mRNA, welche das Intron I (nt 1932 – 2025) aufweist bzw. nicht gespleißt vorliegt, generiert das Transkript für BoDV-1-M; die Beibehaltung von Intron II (nt 2410 - 3703) das Transkript für BoDV-1-GP und bei Fehlen beider Introns entsteht die mRNA zur Kodierung der RNA-Polymerase L (BRIESE et al., 1995; CUBITT et al., 1994b: DE LA TORRE, 2002: KOBAYASHI et al., 2000: TOMONAGA et al., 2002; WEHNER et al., 1997). Die Synthese des 7,1 kb großen Transkriptes der Polymerase L erfordert weiterhin ein Überlesen (readthrough) des 3. Terminationspunktes T3, wobei es sich um einen nicht unüblichen Mechanismus in der Ordnung der Mononegavirales handelt, dessen Bedeutung bzw. Zweck jedoch nicht bekannt ist (SCHNEEMANN et al., 1995a). Durch ein Spleißen von Intron III kann die Synthese weiterer Proteine initiiert werden, deren Funktionen bislang jedoch nicht bekannt sind (CUBITT et al., 2001; PLESCHKA et al., 2001). Die Bedeutung der genomischen Organisation und folgender transkriptionaler Prozesse auf die Überlebensfähigkeit bzw. Adaptionsfähigkeit von BoDV-1 konnten POENISCH et al. (2008b) näher charakterisieren. Sie zeigten, dass intergenische Seguenzen zwischen N und P das Überlesen des ersten Terminationspunktes begünstigen, wodurch die Synthese von BoDV-1-N. BoDV-1-X und BoDV-1-P reduziert, damit die Polymerase-Aktivität und Virusreplikation gebremst und somit die Persistenz von BoDV-1 ermöglicht wird.

Eine Übersicht über den genomischen Aufbau, die primären Transkripte und die posttranskriptional modifizierte mRNA von BoDV-1 bietet Abbildung 1. Abbildung 1: Genomischer Aufbau, primäre Transkripte und posttranskriptional modifizierte mRNA von BoDV-1 (modifiziert aus KEHR (2016a), nach DE LA TORRE et al. (2002)



Boxen: ORF I bis V und X, die für die folgenden viralen Proteine kodieren: GP: Glykoprotein; L: RNA-abhängige Polymerase; M: Matrixprotein; N: Nukleoprotein, P: Phosphoprotein; X: X-Protein; schraffierte ORFs werden nicht translatiert; S1 – S3: Startcodons (blaue Pfeile); T1 – T4 und t6: Stoppcodons; Scherensymbole und assoziierte Zacken (v): entfernte Introns (gespleißte RNA); Angaben zu den entfernten Introns finden sich auch neben der Abbildung der Spleißprodukte; Angaben zur Größe der primären Transkripte befinden sich ebenfalls linksseitig neben diesen.

Das Nukleoprotein BoDV-1-N liegt in 2 Isoformen mit einem Gewicht von 38 beziehungsweise 40 kDa vor und stellt mit circa 50 % der Gesamtproteinmenge das am meisten synthetisierte Protein im Rahmen einer BoDV-1-Infektion dar (PYPER und CLEMENTS, 1994; PYPER und GARTNER, 1997). Die funktionelle Bedeutung dieser beiden Isoformen ist bisher unklar. Während die 40 kDA-Isoform des BoDV-1-N ein so genanntes *nuclear localization signal* (NLS) in Form spezifischer kurzer basischer Aminosäuresequenzen besitzt, welche den nukleären Eintritt des Proteins ermöglichen, fehlt das NLS bei der 38 kDa-Variante und führt zu einer vor-

wiegend zvtoplasmatischen Akkumulation (KOBAYASHI et al., 1998). Eine weitere bedeutende Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport hat das nuclear export signal (NES) des BoDV-1-N inne, welches das Ausschleusen aus dem Zellkern induzieren kann (KOBAYASHI et al., 2001; YANAI et al., 2017). Die Interaktion zwischen BoDV-1-N und -P erfolgt ebenfalls im Bereich der NES des BoDV-1-N und hat dessen Maskierung und somit einen reduzierten nukleozytoplasmatischen Transport zur Folge (HONDA und TOMONAGA, 2013; KOBAYASHI et al., 2001). Durch die Bindung an BoDV-1-P kann auch die 38 kDa-Variante in den Nukleus gelangen, ist dort aber im Gegensatz zur 40 kDa-Isoform nicht essentiell für die Aktivität der Polymerase L (PEREZ et al., 2003). BoDV-1-N bindet intranukleär an die virale genomische RNA und bildet gemeinsam mit BoDV-1-P und der RNA-Polymerase den viralen Ribonukleoproteinkomplex (RNP). Das Nichtstrukturprotein BoDV-1-X dient der Regulation der Aktivität der RNA-Polymerase und somit der viralen Synthese, vermutlich mittels Interaktion mit BoDV-1-P (POENISCH et al., 2008a; POENISCH et al., 2004; YANAI et al., 2006). Durch das Fehlen von BoDV-1-X wird die Bildung infektiöser Viruspartikel unmöglich (POENISCH et al., 2007). Neuere Untersuchungen haben zudem ergeben, dass das BoDV-1-X mit den Mitochondrien assoziieren kann und durch die Blockade der mitochondrialen Aktivierung der Caspase-abhängigen Apoptose mit für die nicht-zytolytische Replikation und Persistenz von BoDV-1 sorgt (POENISCH et al., 2009). Das Phosphoprotein BoDV-1-P ist an der Bildung des RNP beteiligt und interagiert mit BoDV-1-X. Zudem dient es als Kofaktor der RNA-Polymerase L, dessen Aktivität von seiner Phosphorylierung abhängig ist (SCHWEMMLE et al., 1997; THIEDEMANN et al., 1992). Die Relation von BoDV-1-P zu BoDV-1-N ist ein gravierender Faktor für die Regulation der Polymerase-Aktivität (RAUER et al., 2004; SCHNEIDER, 2005; SCHNEIDER et al., 2003). So kann durch die Reduktion der BoDV-1-N-Expression in der chronischen Phase der Infektion die moderate Virusvermehrung ermöglicht und eine Persistenz begünstigt werden (HERDEN, 2009; POROMBKA et al., 2008; WATANABE et al., 2000). MATSUMOTO et al. (2012) beschreiben die enge Assoziation des RNP mit den Chromosomen der Wirtszelle und die Weitergabe der intranukleären Elemente in Oligodendrogliavorläuferzellen während der Mitose als weitere Infektionsweise und Strategie zur Erhaltung der Persistenz des BoDV-1. Das Matrixprotein BoDV-1-M ist ein nicht-glykosyliertes Membranprotein und an der Innenfläche der Virushülle lokalisiert, wo es in erster Linie von stützender Funktion ist (KRAUS et al., 2001). Vor dem Hintergrund der Fähigkeit des BoDV-1-M zur Bindung an einzelsträngige RNA und der intranukleären Kolokalisation wird auch eine Beteiligung an der Bildung des RNP vermutet, ohne aber einen Einfluss auf die Aktivität der RNA-Polymerase zu nehmen und möglicherweise mit dem Ziel eine Unterstützung der nicht-zytolytischen persistenten Infektionsweise des Virus zu erreichen (CHASE et al., 2007; NEUMANN et al., 2009). Durch die Formation von stabilen Tetrameren trägt BoDV-M zudem entscheidend zur Viruspartikelbildung bei

(KRAUS et al., 2005). Das BoDV-1-GP ist das einzige Glykoprotein in der Virushülle von BoDV-1 (SCHNEIDER et al., 1997). Durch die Expression des ORF IV entsteht ein 57 kDa-Polypeptid, welches im endoplasmatischen Retikulum zu einem 94 kDa-Glykoprotein prozessiert wird (EICKMANN et al., 2005). Dessen Spaltung durch die zelluläre Endoprotease Furin oder Subtilisin-ähnliche Proteasen generiert ein C-terminales Glykoprotein BoDV-1-GP-C sowie ein N-terminales Glykoprotein BoDV-1-GP-N (LENNARTZ et al., 2016: RICHT et al., 1998). Diese posttranslationale Spaltung ist essentiell für die erfolgreiche BoDV-1-Glykoprotein-vermittelte Adhäsion und Fusion des Virus mit der Wirtszelle (GONZALEZ-DUNIA et al... 1997; LENNARTZ et al., 2016; RICHT et al., 1998). BoDV-1-GP-N zeichnet sich durch eine ausgeprägte Glykosylierung aus und dient der Rezeptorbindung des Viruspartikels (GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; KIERMAYER et al., 2002). Das GP-N-bindende Chaperon BiP (immunoglobulin binding protein) konnte als wichtiges Element der Zellinfektion identifiziert werden (HONDA et al., 2009). BoDV-1-GP-C wird in der Virushülle verankert und ist an der Fusion mit der Wirtszellmembran beteiligt (DAITO et al., 2011: GONZALEZ-DUNIA et al., 1998). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase BoDV-L ist ein 190 kDa-Protein, das sich im Kern infizierter Zellen befindet, wo es mit dem phosphorylierten BoDV-1-P kolokalisiert vorliegt (WALKER et al., 2000). Eine eigene NLS ermöglicht der BoDV-1-L – ebenso wie BoDV-1-N und BoDV-1-P – den aktiven Transport in den Kern durch Importine (WALKER und LIPKIN. 2002).

Die Replikationseffizienz des BoDV-1 wird durch ein *genomic trimming* mit folgender Bildung unvollständiger *inverted terminal repeats* (ITRs) auf einem suboptimalen Niveau gehalten und trägt so zu einer persistenten Infektion mit BoDV-1 bei (POROMBKA et al., 2008; SCHNEIDER, 2005; SCHNEIDER et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2005). ITRs bilden häufig eine so genannte *panhandle*-Struktur, die bei anderen einzelsträngigen RNA-Viren mit negativer Polarität für die Initiation der Transkription wichtig ist (CHEONG et al., 1999).

BoDV-1 konnte als bisher einziges bekanntes nicht-retrovirales RNA-Virus identifiziert werden, welches endogene Sequenzen in das humane Genom integriert hat. Die auch in weiteren Spezies (u. a. Primaten, Nager, Elefanten) nachgewiesenen Sequenzen weisen ausgeprägte Homologien zu verschiedenen Genen des BoDV-1 (u.a. BoDV-1-M und BoDV-1-N) auf und werden daher als *EBL-Elemente* (*endogenous borna-like elements*) bezeichnet (BELYI et al., 2010; HORIE et al., 2013). Die grundsätzlich höhere Resistenz von Spezies mit EBL-Elementen gegenüber einer BoDV-1-Infektion, der Nachweis von *open reading frames* im Bereich dieser Elemente bei einigen Spezies sowie die Korrelation zwischen vermehrter *EBLN*-Protein-Expression und erhöhter BoDV-1-Resistenz von Zellen des Dreizehnstreifen-Hörnchens legen eine Beteiligung der *EBLN*-Sequenzen an der antiviralen Immunantwort nahe (FUJINO et al., 2014; HONDA und TOMONAGA, 2016; HORIE, 2017; SOFUKU et

al., 2015). Weitere mögliche Funktionen werden derzeit diskutiert.

Die elektronenmikroskopisch darstellbaren sphärischen BoDV-1-Viruspartikel besitzen einen Durchmesser von circa 100 bis 130 nm und zeigen circa 7 nm lange *spike*-Strukturen auf ihrer Oberfläche, welche die viralen Glykoproteine darstellen (KOHNO et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 1994). Eine schematische Abbildung eines Viruspartikels zeigt Abbildung 2.





3.1.2 Epidemiologie und Klinik

Galten Pferde und Schafe lange als die einzigen von der BD betroffenen Tierarten, musste das Spektrum infektionsempfänglicher Tierarten im Laufe der Zeit erheblich erweitert werden: Neben weiteren Vertretern der *Equidae*, konnte die BD auch bei Paarhufern, unter anderem bei Rindern, Ziegen, Alpakas, aber auch bei Zoo- und Wildtieren, wie bei Luchsen, sowie bei Haustieren, zum Beispiel bei Hunden und Kaninchen beobachtet werden (BINZ et al., 1994; CAPLAZI et al., 1994; DEGIORGIS et al., 2000; KINNUNEN et al., 2013; LUNDGREN et al., 1995; MALKINSON et al., 1995; METZLER et al., 1978; WEISSENBÖCK et al., 1998a). Experimentelle Infektionen mit dem BoDV-1 sind bei einer noch größeren Bandbreite an Tierarten möglich und reichen von Mäusen und Ratten bis hin zu Rhesusaffen (EFSA AHAW PANEL (EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE) et al., 2017; HALLENSLEBEN et al., 1998; HERDEN et al., 2013; KINNUNEN et al., 2013; NARAYAN et al., 1983; STITZ et al.,

1980). Das weitgehend territorial und saisonal gehäufte Auftreten der BD reflektiert die Lebensweise des Reservoirwirtes, der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*), welche das Virus über lange Zeiträume in hohen Mengen ausscheidet, ohne selbst zu erkranken (BOURG et al., 2013; DÜRRWALD et al., 2006; ENCARNAÇÃO et al., 2013; HILBE et al., 2006; NOBACH et al., 2015). Im Reservoirwirt zeigt sich nicht der typische Neurotropismus von BoDV-1, vielmehr zeigt sich eine disseminierte Virusverteilung, jedoch ohne begleitende entzündliche oder degenerative Läsionen und dementsprechend fehlende klinische Symptomatik (NOBACH et al., 2015; WEISSENBÖCK et al., 2017). Die Ausscheidung des Virus erfolgt auf vielfältige Weise: BoDV-1 konnte zum Beispiel in Urin, Haut, Speichel, Fäzes und der Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden (DÜRRWALD et al., 2014; NOBACH et al., 2015).

Die klinische Symptomatik nach natürlicher Infektion von Pferden basiert auf der Lokalisation und dem Ausmaß der zerebralen Entzündung (GRABNER et al., 2002). Pferde zeigen initial häufig Verhaltensauffälligkeiten und Bewusstseinsstörungen, im weiteren Verlauf können Hirnnervenausfälle, Bewegungsstörungen und Krampfanfälle auftreten (GRABNER et al., 2002; HERDEN et al., 2013; RICHT et al., 2000). GRABNER und FISCHER (1991) definieren 3 Hauptsymptomkomplexe der BD: Depression oder Exzitation, zentral-verursachte sensorische Störungen und Hyperkinesie oder Ataxie. Die Mortalitätsrate bei erkrankten Pferden ist außerordentlich hoch: 90 % versterben innerhalb von 4 Wochen nach den ersten Krankheitszeichen (HERDEN et al., 2013; RICHT et al., 2000).

Experimentelle Infektionen bei Labornagern erzeugen in Abhängigkeit von dem gewählten Infektionszeitpunkt, dem Alter, der Spezies, dem Immunstatus und genetischen Hintergrund des Wirts sowie dem Virusisolat unterschiedliche Krankheitsbilder. Adult-infizierte Lewis-Ratten zeigen einen charakteristischen biphasischen Verlauf und zunächst ein von Bewegungs- und Verhaltensstörungen gekennzeichnetes Krankheitsbild, das der natürlichen Infektion von Pferden und Schafen ähnelt und auf einer ausgeprägten Entzündungsreaktion basiert. Im weiteren Verlauf zeigen die überlebenden Tiere einen Rückgang der schweren zentralnervösen Symptomatik sowie der entzündlichen Veränderungen und weisen in der Regel Somnolenz und Apathie auf, manchmal auch bestehenbleibende Paresen oder Paralysen oder eine Obesitas ohne neurologische Symptome, obwohl keine Viruselimination erfolgt (HERDEN et al., 2013; HIRANO et al., 1983; NARAYAN et al., 1983). Neonatal infizierte Ratten werden lebenslange Virusträger, die lediglich milde Verhaltens- und Lernstörungen, jedoch keine Enzephalitis zeigen, obwohl sie hohe zerebrale Virusmengen aufweisen und - analog zu den Reservoirtieren - eine Ausbreitung des Virus in die Peripherie erfolgt (BAUTISTA et al., 1994; DITTRICH et al., 1989). Mäuse erkranken ausschließlich nach neonataler BoDV-1-Infektion und weisen sehr große Mausstamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Empfänglichkeit bzw. Resistenz gegenüber der BoDV-1-Infektion auf (HALLENSLEBEN et al., 1998; RUBIN et al., 1993). C57BL/6-Mäuse, die als weitgehend resistent gegenüber der Entwicklung einer BD gelten, entwickeln jedoch nach transgener zerebraler Überexpression proinflammatorischer Zytokine, zum Beispiel TNF- α und IL-12, deutliche neurologische Störungen – im Falle der TNF- α -Überexpression insbesondere auch epileptiforme Krämpfe (HOFER et al., 2004; KRAMER et al., 2012).

Die beschriebenen humanen Fälle von schweren, durch Infektionen mit dem variegated squirrel 1 bornavirus verursachten Enzephalitiden waren insbesondere durch hohes Fieber, psychomotorische Störungen (u. a. Verwirrtheit, unsicherer Gang, okuläre Paresen) und finalem Koma gekennzeichnet (CORAS et al., 2019; HOFFMANN et al., 2015; KORN et al., 2018; SCHLOTTAU et al., 2018).

3.1.3 Pathogenese

Das BoDV-1 zeigt in seinen End- bzw. Fehlwirten, wie Pferd und Schaf, einen ausgeprägten Neurotropismus. Experimentelle Infektionen gelingen daher insbesondere nach intrazerebraler und -nasaler Virusapplikation (CARBONE et al., 1987; GOSZTONYI und LUDWIG, 1984; KUPKE, 2016; MORALES et al., 1988; NARAYAN et al., 1983). Die periphere BoDV-1-Applikation, durch intramuskuläre oder subkutane Injektionen, ist wesentlich weniger effizient und hat, aufgrund der zentripetalen Virusausbreitung entlang peripherer Nerven, eine längere Inkubationszeit zur Folge (CARBONE et al., 1987). Die Nase wird – zum einen aufgrund des typischen Verteilungsmusters des Virus und der Neuroinflammation, zum anderen aufgrund des direkten Kontakts der olfaktorischen Nerven mit der Umwelt in diesem Bereich – als wahrscheinlichste Eintrittspforte für BoDV-1 im Rahmen der natürlichen Infektion des Fehlwirtes eingeschätzt (JOEST, 1912; KUPKE, 2016; KUPKE et al., 2019; MORALES et al., 1988). Die primäre Infektion der Zielzellen erfolgt mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose. Im neuronalen Parenchym wird hingegen die überwiegende Ausbreitung durch Zell-zu-Zell-Weitergabe von eventuell nur kurzzeitig entstehenden Viruspartikeln vermutet (CLEMENTE und DE LA TORRE, 2007; CLEMENTE und DE LA TORRE, 2009; CLEMENTE et al., 2009; GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; GOSZTONYI et al., 1993; LENNARTZ et al., 2016). Durch die Assoziation des viralen RNP-Komplexes mit den Wirts-Chromosomen ist auch eine Weitergabe des Virus an die Tochterzellen während der Mitose möglich (MATSUMOTO et al., 2012). BoDV-1 infiziert und repliziert primär in Neuronen, zudem in neuronalen Vorläuferzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwannzellen und Ependymzellen, ohne dass eine Zytolyse der betroffenen Zellen auftritt (CARBONE et al., 1991; CARBONE et al., 1989; MORALES et al., 1988). Das limbische System ist als bevorzugte Lokalisation der BoDV-1-Infektion und Replikation bekannt, was auf die dort sehr günstigen Replikationsbedingungen zurückgeführt werden kann

– zum Beispiel durch höhere virale Transkriptionseffizienzen im Vergleich zu anderen Hirnarealen sowie eine reiche Ausstattung mit der für die virale Replikation notwendigen Phosphokinase C (HERDEN, 2009; POROMBKA et al., 2008; SCHWEMMLE et al., 1997).

Die klinische Krankheitssymptomatik der akuten BD ist mit einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis assoziiert und basiert auf einem immunpathologischen Prozess im Sinne einer Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Tvp (HERZOG et al., 1985; HIRANO et al., 1983; NARAYAN et al., 1983; STITZ et al., 1989), Zvtotoxische CD8+-T-Lymphozyten, die in-vitro. nicht aber in vivo, den Untergang virus-infizierter Zellen induzieren können, sowie CD4+-T-Helferzellen bilden die Haupteffektorzellen der virus-induzierten Neuroinflammation (BILZER und STITZ, 1994; HAUSMANN et al., 1999; NOSKE et al., 1998; PLANZ et al., 1993; STAEHELI, 2002; STITZ et al., 2002). Weiterhin fällt eine reaktive Astrozytose und Mikrogliaaktivierung sowie eine Aufregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1ß, IL-2, IL-6, TNF-α und Interferon-y (IFN-y) auf (HATALSKI et al., 1998; HERDEN et al., 2005; SHANKAR et al., 1992; WEISSENBÖCK et al., 2000). Astrozyten exprimieren in der Frühphase der BoDV-1-Infektion vermehrt Chemokine und induzieren auf diesem Weg möglicherweise die Aktivierung von Mikrogliazellen und Infiltration von Lymphozyten in das Neuroparenchym (OVANESOV et al., 2008a; SAUDER et al., 2000). In vitro konnten darüber hinaus die Antigenpräsentierenden Funktionen BoDV-1-infizierter Astrozyten dargestellt werden (RICHT und STITZ, 1992). Die zentrale Rolle proinflammatorischer Zytokine wird insbesondere durch die Infektion per se resistenter Mausstämme verdeutlicht, bei denen die inflammatorische Reaktion auf die Hirnareale mit TNF- α - bzw. IL-12-Überexpression beschränkt bleibt (HOFER et al., 2004; KRAMER et al., 2012).

Die Ursache für die Regression der klinischen Symptomatik und pathohistologischen Läsionen in der späteren Krankheitsphase adult infizierter Ratten ist noch nicht in Gänze bekannt, ein Wechsel von der Th1- zu einer Th2-Immunantwort wird vermutet (HATALSKI et al., 1998). Neonatal-infizierte Ratten zeigen lediglich eine transiente entzündliche Reaktion: reaktive Astrozyten und eine ausgeprägte Mikrogliaaktivierung sowie eine assoziierte Aufregulation proinflammatorischer Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α) dominieren die zerebralen Befunde (SAUDER und DE LA TORRE, 1999). Die Untergänge von Neuronen werden auf eine Mikrogliaaktivierung durch BoDV-1-infizierte Astrozyten zurückgeführt (OVANESOV et al., 2008a; WEISSENBÖCK et al., 2000). Auch direkte Einflussnahme des Virus auf Signaltransduktionswege der Wirtszellen wird für die Verhaltensstörungen persistent infizierter Tiere ursächlich in Betracht gezogen (HANS et al., 2004; NISHINO et al., 2016; PLESCHKA, 2008).

Die Persistenz des BoDV-1 basiert zum einen auf einer Evasion der antiviralen Immunantwort, zum anderen auf der strengen Regulation der viralen Replikation und Partikelsynthese auf einem niedrigen Maß, so dass ein Absterben der Wirtszelle verhindert und die Detektion durch

das wirtseigene Immunsystem erschwert wird (RANDALL und GRIFFIN, 2017; WERNER-KEIŠS et al., 2008). Beispielsweise scheint die Bindung des viralen Phosphoproteins BoDV-P an die Traf family member-associated ΝFκB activator (TANK)-binding kinase 1 (TBK-1) die neuronale NFkB-Aktivierung zu verhindern und ermöglicht es dem Virus, einer antiviralen Expression von Typ I-Interferonen zu entkommen (BOURTEELE et al., 2005; PLANZ et al., 2009; UNTERSTAB et al., 2005). Einige weitere Mechanismen mit dem Ziel, eine antivirale Interferonproduktion der Wirtszelle zu verhindern, konnten für BoDV-1 nachgewiesen werden: Die posttranskriptionale Kürzung des RNA-Stranges hat eine Maskierung für den intrazellulären pathogen recognition receptor (PRR) retinoic acid inducible gene I (RIG-1) zur Folge (HABJAN et al., 2008). Der hemmende Effekt auf die Interferon-Signalkaskade wird darüber hinaus durch die Interaktion des BoDV-1-Nukleoproteins mit dem Transkriptionsfaktor IRF-7 (SONG et al., 2013) sowie durch einen bisher unbekannten Mechanismus des X-Proteins erreicht (WENSMAN et al., 2013). Durch ein dem NFkB1 homologes Sequenzmotiv greift das BoDV-1-Nukleoprotein inhibitorisch in die NFkB-gesteuerte Transkription von Entzündungsmediatoren ein (MAKINO et al., 2015) Die in BoDV-1-infizierten Astrozyten verminderte Synthese der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (inducible nitric oxide synthase, iNOS) scheint aus einer BoDV-1-P-vermittelten Interferenz mit der NFkB-Aktivierung zu resultieren (PENG et al., 2007). Neben einer direkten antiapoptotischen Wirkung durch das X-Protein (POENISCH et al., 2009), ermöglicht insbesondere die stark regulierte Virusvermehrung die Persistenz in der Wirtszelle. Die Reduktion der Virussynthese wird ebenfalls durch multiple Mechanismen erreicht, die an verschiedenen Elementen des Virusmetabolismus ansetzen: Die Replikationseffizienz wird grundsätzlich durch das genomic trimming der viralen RNA vermindert (SCHNEIDER et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2005). Zudem übt BoDV-1-X eine inhibitorische Wirkung auf die virale Polymerase aus (SCHNEIDER, 2005). Die Transkription der Seguenzen für die virale Polymerase findet ausschließlich nach dem Überlesen (readthrough) des 3. Stoppsignals T3 statt, was nur in ca. 5 % der Ableseprozesse erfolgt, so dass die Transkripte der Polymerase lediglich in geringer Zahl vorliegen (SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEEMANN et al., 1995a: SCHNEEMANN et al., 1995b: SCHNEIDER, 2005). Erst kürzlich zeigten KOJIMA et al. (2019), dass durch die posttranskriptionale Prozessierung (Spleißen) verschiedene Isoformen der BoDV-1-N-Transkripte generiert werden, die dann in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind, wodurch die Replikationseffizienz von BoDV-1 reduziert werden kann. Auf der epigenetischen Ebene induziert das BoDV-1-P eine Reduktion der Azetylierung von Histonen der Wirtszelle, die mit einer verminderten Virusreplikation und proteinsynthese einhergeht, aber auch eine mögliche Erklärung für neuronale bzw. gliale Dysfunktionen bietet (BONNAUD et al., 2015).

3.2 Astrozyten

Astrozyten sind nach ihrer sternförmigen Gestalt benannt und bilden die zahlenmäßig größte Zellpopulation im Parenchym des zentralen Nervensystems (PEKNY und PEKNA, 2014). Wurden diese Gliazellen früher auf ihre Funktion als mechanische und nutritive Unterstützer der Neuronen reduziert, so wird seit einigen Jahren auch ihre Rolle bei neuroinflammatorischen und –degenerativen Prozessen intensiver erforscht und diskutiert (KETTENMANN und VERKHRATSKY, 2008; PEKNY et al., 2016).

3.2.1 Astrozytäre Funktionen unter physiologischen Bedingungen

Astrozyten bilden das funktionelle Bindeglied zwischen dem Gefäßsystem und den Neuronen (ABBOTT et al., 2006). Dabei konstituieren die Astrozyten der grauen Substanz eigene Domänen, die sich nur sehr wenig überlappen – lediglich in der Peripherie der jeweiligen Domäne erfolgt der Kontakt zu benachbarten Astrozyten über die Fortsätze (BUSHONG et al., 2002; OGATA und KOSAKA, 2002). Durch vaskuläre Fortsätze (endfeet) stehen die Astrozyten in engem Kontakt mit den Endothelzellen der zerebralen Gefäße, während ihre perisynaptischen Fortsätze die neuronalen Synapsen umgeben (IADECOLA und NEDERGAARD, 2007; KACEM et al., 1998; LÉCUYER et al., 2016). Aufgrund der funktionellen und anatomischen Verbindung wird die Kombination einer astrozytären Domäne mit den assozijerten Neuronen und Gefäßen auch als gliovaskuläre Einheit (gliovascular unit) bezeichnet (NEDERGAARD et al., 2003). Die räumliche Nähe der astrozytären Endfüße zum Gefäßsystem sowie die Produktion vasoaktiver Substanzen lassen eine Beteiligung an der Regulation der zerebralen Durchblutung vermuten (KIMELBERG, 2010; KOEHLER et al., 2009). Astrozyten umschließen mit ihren Endfortsätzen die Synapsen und sind essentiell für deren Genese und Funktion (CHRISTOPHERSON et al., 2005; PFRIEGER und BARRES, 1997; ULLIAN et al., 2001). Neben der Aufrechterhaltung der Ionen-Homöostase sowie der Konzentrationen der Neurotransmitter L-Glutamat und v-Aminobuttersäure (GABA) im synaptischen Spalt, um die neuronale Synapsenfunktion zu ermöglichen und exzitotoxische Effekte zu vermeiden, versorgen Astrozyten die Nervenzellen auch mit energetischen Metaboliten (OLIET et al., 2001; ROUACH et al., 2008; VERKHRATSKY und NEDERGAARD, 2014). Die neuronale Modulation des Calcium-Ionen-Einstromes in das astrozytäre Zytoplasma durch verschiedene Neurotransmitter sowie die astrozytäre Beeinflussung der neuronalen Signalweiterleitung deuten auf eine neuro-astrogliale Kommunikation im Bereich der Synapsen hin, welche jedoch noch kontrovers diskutiert wird (AGULHON et al., 2008; KANG et al., 1998).

3.2.2 Rolle von Astrozyten bei der Neuroinflammation

Aufgrund der ausgeprägten astrozytären Zytokin- und Chemokinexpression auf verschiedene

Noxen (u. a. virale und bakterielle Infektionen, traumatische Noxen) ist von einer Beteiligung dieser Gliazellen an der Immunantwort und dementsprechend auch an der Genese zahlreicher entzündlicher und degenerativer Prozesse im zentralen Nervensystem auszugehen (BURDA et al., 2016; CEKANAVICIUTE und BUCKWALTER, 2016; DONG und BENVENISTE, 2001; EDDLESTON und MUCKE, 1993; LIEBERMAN et al., 1989).

Astrozyten sind in der Lage, mit Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunantwort zu interagieren: zudem kommunizieren sie mit infiltrierenden Leukozyten ebenso wie mit residenten Zellen des ZNS. Die proinflammatorischen Zvtokine TNF-α und IFN-y können eine Aufregulation der astroglialen MHC II-Moleküle induzieren (NIKCEVICH et al., 1997; PANEK et al., 1994; WONG et al., 1984). Die Fähigkeit der Astrozyten Antigene zu präsentieren, wird noch kontrovers diskutiert, da essentielle kostimulatorische Faktoren nur nach entsprechender Stimulation (zum Beispiel durch IFN-y) gebildet werden können beziehungsweise deren Produktion bisher lediglich in vitro dargestellt werden konnte, so dass diese Zellen oft als "nonprofessional antigen-presenting cells" bezeichnet werden (CONSTANTINESCU et al., 2005; CROSS und KU, 2000; GIRVIN et al., 2002; NIKCEVICH et al., 1997; RIEDHAMMER und WEISSERT, 2015; VARDJAN et al., 2012; VERKHRATSKY et al., 2016). Astrozyten exprimieren eine Reihe PRRs, welche die Identifizierung infektiöser Fremdorganismen aber auch endogener Gefahrensignale und eine schnelle Reaktion darauf ermöglichen (FARINA et al., 2007). Virale Erreger werden insbesondere durch die toll like receptors (TLR) TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkannt, welche auch von Astrozyten exprimiert werden können (ALEXOPOULOU et al., 2001; BSIBSI et al., 2002; FARINA et al., 2007; FARINA et al., 2005; MCKIMMIE et al., 2005; PARK et al., 2006; SO und KIM, 2009). Im Entzündungsgeschehen von Astrozyten aufregulierte Oberflächenmoleküle - intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) - sowie zahlreiche sezernierte Chemokine unter anderem CCL2, CCL12, CXCL1 und CXCL2 - dienen der Rekrutierung und Migration von Leukozyten (ABBOTT, 2002; KANG et al., 2010; LEE et al., 2000; POZNER et al., 2005). Die Sekretion verschiedener Zyto- und Chemokinspektren ermöglicht den Astrozyten, Einfluss auf die adaptive Immunantwort zu nehmen, im Sinne der Modulation zu Gunsten eines Th1-, Th2- oder Th17-dominierten Entzündungstyps oder aber die Aktivierung von Effektorzellen zu verhindern (CEKANAVICIUTE und BUCKWALTER, 2016; CONSTANTINESCU et al., 2005; GIMSA et al., 2004; TRAJKOVIC et al., 2004).

Astrozyten können ihre proinflammatorische Zytokinexpression aufgrund eines von infiltrierenden Leukozyten generierten proinflammatorischen Zytokinmilieus aufregulieren, jedoch auch *de novo* eine derartige Immunantwort hervorrufen (CALDERON et al., 2006; DONG und BENVENISTE, 2001; NAIR et al., 2008; ROTHHAMMER und QUINTANA, 2015). Eine Akti-

vierung von Astrozyten – die so genannte "reaktive Astrozytose bzw. -gliose" – kann im Rahmen zahlreicher neuroinflammatorischer und –degenerativer Konditionen beobachtet werden (JAIN et al., 2015; KARIMI-ABDOLREZAEE und BILLAKANTI, 2012; KOLOKOLTSOVA et al., 2014; KOU et al., 2009; PEKNY und PEKNA, 2014; VARGAS und JOHNSON, 2010). PAR-PURA und VERKHRATSKY (2014) definieren die reaktive Astrogliose als eine konstitutive, stufenweise verlaufende und evolutionär-konservierte Abwehrreaktion der Astrozyten. Aktivierte Astrozyten zeichnen sich durch eine verstärkte Expression des sauren Gliafaserproteins (*glial fibrillary-acidic protein*, GFAP) und eine Hypertrophie des Zellkörpers sowie der -fortsätze aus; zudem kann es im Falle einer ausgeprägten reaktiven Astrogliose auch zu einer Proliferation der Zellen kommen (ENG und GHIRNIKAR, 1994; SOFRONIEW, 2009; SOFRONIEW und VINTERS, 2010; WILHELMSSON et al., 2006). Kürzlich konnten MORIZAWA et al. (2017) sogar eine phagozytotische Aktivität von reaktiven Astrozyten infolge neuronaler Untergänge nach ischämischen Noxen beobachten.

Es handelt sich bei der reaktiven Astrozytose nicht um einen einheitlichen Zustand. Vielmehr zeigen die Expressionsprofile reaktiver Astrozyten ausgeprägte Unterschiede. In Abhängigkeit von dem induzierenden Stimulus begünstigt das astrozytäre Genexpressionsmuster eher eine proinflammatorische, schädliche oder eine antiinflammatorische, (neuro-)protektive Reaktion (ZAMANIAN et al., 2012). Der Wechsel von einem pro- zu einem antiinflammatorischen Phänotyp konnte bei kultivierten Astrozyten nachgewiesen werden (TARASSISHIN et al., 2011). Aktivierte Astrozyten können indirekt durch die Förderung einer Entzündungsreaktion und die damit einhergehende Leukozyteninfiltration eine Schädigung des neuronalen Parenchyms bedingen (BABCOCK et al., 2003). Darüber hinaus ist dies aber auch durch die Sekretion neurotoxischer Produkte, wie zum Beispiel freier Radikale (THORNTON et al., 2006), NO (CHAO et al., 1996), Glutamat (BEZZI et al., 2001) oder auch Lipocalin-2 (BI et al., 2013), möglich. Die Neuroprotektion durch Astrozyten beruht zum Teil auf der Synthese antiinflammatorischer Mediatoren (JANG et al., 2013a). So kann die Aktivierung von Mikrogliazellen und deren Fähigkeit zur Antigen-Präsentation durch die astrozytäre Produktion von TGF-ß deutlich reduziert werden (HAILER et al., 1998). Die Bildung von so genannten Glianarben hat ebenfalls einen indirekten neuroprotektiven Effekt: Durch Separation geschädigter Areale mittels einer astroglialen Proliferation wird das benachbarte Neuroparenchym geschützt (BUSH et al., 1999; FAULKNER et al., 2004).

Astrozyten und epileptiforme Krämpfe

Astrozyten regulieren maßgeblich die Homöostase im synaptischen Spalt und beeinflussen damit die neuronale Exzitabilität (DE LANEROLLE et al., 2010; VERKHRATSKY und NEDERGAARD, 2014). Die astrozytäre Wiederaufnahme (*re-uptake*) von exzitatorisch wirkenden Neurotransmittern, insbesondere Glutamat, aus dem synaptischen Spalt über spezielle

Transporter, zum Beispiel durch den Glutamat-Transporter GLT-1, ist für die physiologische neuronale Funktion unabdingbar (PETR et al., 2015). Zudem sind Astrozyten in der Lage, selbst Neurotransmitter in den synaptischen Spalt abzugeben (MIN und NEVIAN, 2012; SAHLENDER et al., 2014). Neuroinflammatorische Zustände können die Astrozyten-Funktionen im Hinblick auf den Erhalt der synaptischen Homöostase stören (DAVID et al., 2009; SZYMOCHA et al., 2000; VEZZANI et al., 2011). So haben erhöhte zerebrale TNF-α-Spiegel eine Reduktion des astrozytären Glutamat-*re-uptake* sowie eine vermehrte Glutamat-Synthese zur Folge (BEZZI et al., 2001; CLARK und VISSEL, 2016; FINE et al., 1996). Sicherlich kommt es im Zuge der Epilepsie zu einer Aktivierung residenter Hirnzellen, vor allem von Mikrogliazellen und Astrozyten, dennoch wird diesen Zellen auch eine Rolle bei der Erhaltung der Neuroinflammation und der perpetuierenden Epileptogenese zugesprochen (VEZZANI et al., 2011).

Astrozyten und Virusinfektionen

Astrozyten können Zielzellen für Viren darstellen, sind aber auch ohne direkte Infektion in die antivirale Entzündungsreaktion involviert (SOFRONIEW und VINTERS, 2010), Eine virale Replikation in Astrozyten wurde unter anderem im Rahmen der Infektion mit humanem Herpesvirus 6. dem Virus der murinen Theilerschen Enzephalomvelitis sowie BoDV-1 festgestellt (CARBONE et al., 1991; CARPENTIER et al., 2008; DONATI et al., 2005; HERDEN et al., 2005; POROMBKA et al., 2008; SOFRONIEW und VINTERS, 2010; ZHENG et al., 2001). PFEFFERKORN et al. (2016) beobachteten zudem eine transiente Infektion von Astrozyten auch durch Viren mit eigentlichem Tropismus für Neuronen (unter anderem Lyssavirus) und wiesen in diesem Zuge die Induktion einer TLR- und RIG-vermittelten antiviralen IFN-Kaskade nach. Neben Mikrogliazellen stellen Astrozyten die Hauptguelle der zerebralen IFN-Synthese infolge neurotroper Virusinfektionen dar und leisten damit einen entscheidenden Beitrag zur Abwehr viraler Infektionen des ZNS (KALLFASS et al., 2012). Grundlage der antiviralen Reaktion bildet die Erkennung der Pathogene durch die PRRs. Die Expression des toll-like receptors 3 (TLR3) durch Astrozyten konnte in vitro sowie in vivo nachgewiesen werden und dient der Erkennung von viraler doppelsträngiger RNA (ALEXOPOULOU et al., 2001; FARINA et al., 2007; PARK et al., 2006). Nach Stimulation des virusspezifischen TLR3 zeigen Astrozvten eine verstärkte Expression proinflammatorischer Zvtokine (u.a. TNF- α), von Effektormolekülen (u.a. iNOS) sowie antiviralem IFN-ß (CARPENTIER et al., 2005: PARK et al., 2006). SO et al. (2006) zeigten am Beispiel der Theilerschen murinen Enzephalomyelitis eine astrozytäre TLR3-vermittelte Induktion proinflammatorischer Zytokine, die auf eine mögliche astrozytäre Beteiligung an der Immunpathogenese dieser Virusinfektion hinweist. Das Potential von Astrozyten, eine neuroinflammatorische Reaktion infolge einer TLR-Stimulation zu induzieren,

konnte auch mit Hilfe der intrazerebralen Applikation des TLR7-Agonisten Imiquimod demonstriert werden (BUTCHI et al., 2010). Darüber hinaus besitzen Astrozyten noch ein größeres Spektrum an TLRs, das die TLRs 1 bis 9 umfasst, wobei insbesondere die TLRs 7 und 8 der Detektion einzelsträngiger viraler RNA (z.B. der Bornaviren) dienen (ARUMUGAM et al., 2009; WANG et al., 2011).

Von großer Bedeutung sind auch astrozytäre Dysfunktionen infolge viraler Infektionen: Die Interaktion von mit humanem T-lymphotropem Virus Typ1-infizierten T-Lymphozyten und Astrozyten resultiert in einer gestörten Glutamat-Homöostase und folgender Exzitotoxizität (SZYMOCHA et al., 2000). Auch die Neurodegeneration und Demenz, die bei HIV-Infizierten auftreten kann, scheint auf einer virus-induzierten Astrozytendysfunktion zu beruhen (WANG et al., 2004).

Die Rolle von Astrozyten in der BoDV-1-vermittelten Neuropathogenese bedarf weiterer Untersuchungen. Die charakteristische ausgeprägte astrozytäre Hypertrophie, welche in diesem Zusammenhang zu beobachten ist, weist auf eine Aktivierung dieser Zellen hin (HERDEN, 2009; HERDEN et al., 2005). Eine frühe, der Entzündungszellinfiltration vorausgehende Aufregulation proinflammatorischer Zytokine in Astrozyten nach experimenteller BoDV-1 von Mäusen und Ratten spricht für die Beteiligung an der Initiation der Entzündungsreaktion (SAUDER und DE LA TORRE, 1999). Eine frühe astrozytäre Aufregulation der antioxidativwirkenden Hämoxygenase-1 (HO-1) im Rahmen der experimentellen BoDV-1-Infektion von Ratten zeigt auch die neuroprotektiven Eigenschaften dieses Zelltyps (HERDEN et al., 2005). Auch hinsichtlich der bei TNF- α -transgenen C57BL/6-Mäusen beobachteten und durch die BoDV-1-Infektion getriggerten epileptiformen Krämpfe ist ein astrozytäre Effekt ursächlich zu vermuten: So zeigen die Astrozyten dieser Tiere eine morphologisch ungewöhnliche Hypertrophie, die ebenfalls mit einer veränderten proinflammatorischen Zytokinexpression einhergehen und das Krampfgeschehen begünstigen könnte (HERDEN, 2009; HIRZ, 2017; KRAMER et al., 2012).

3.3 Lipocalin-2

3.3.1 Lipocalin-2: Struktur, Rezeptoren und zellulärer Ursprung

Lipocaline repräsentieren eine Gruppe kleiner extrazellulärer Proteine, welche dem Transport hydrophober Liganden dienen und sich durch eine 8-strängige antiparallele ß-Fass-Struktur auszeichnen, die ihre Trichter-ähnliche Form bedingt (COWAN et al., 1990; GANFORNINA et al., 2000; JHA et al., 2015). Obwohl Lipocaline nur ein geringes Maß an Sequenzhomologien aufweisen, können sie anhand bestimmter Regionen ihrer Tertiärstruktur – 3 sogenannten "structurally conserved regions" – einer Proteinfamilie zugeordnet werden (FLOWER et al., 1993). Schon GANFORNINA et al. (2000) betonten die zahlreichen funktionellen Möglichkeiten der Lipocaline aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften.

Lipocalin-2 wurde erstmals 1989 als sogenanntes "Onkogen 24P3" aus einer murinen Nierenzelllinie gewonnen, nachdem diese mit Polyomavirus beziehungsweise Simian-Virus 40 infiziert worden war (HRABA-RENEVEY et al., 1989). Eine weitere Bezeichnung lautet daher "SV-40 induced 24P3 protein". Dieses Protein erwies sich als identisch mit dem sogenannten "superinducible protein 24 (SIP24)", welches von kultivierten Balb/c 3T3-Fibroblasten nach der Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren sowie von Cycloheximid vermehrt synthetisiert wurde (LIU und NILSEN-HAMILTON, 1995; NILSEN-HAMILTON et al., 1982). In den Granula humaner neutrophiler Granulozyten konnte Lipocalin-2 ebenfalls nachgewiesen werden und wird daher auch als Neutrophilengelatinase-assozijertes Lipocalin (Ngal) bezeichnet (RUDD et al., 1999; TRIEBEL et al., 1992). Die konservierten Regionen der Tertiärstruktur ermöglichten FLOWER et al. (1991) die Zuordnung des murinen Proteins 24P3 zu der Familie der Lipocaline. Die ausgeprägte Expression von Lipocalin in murinem Uterusgewebe im perinatalen Zeitraum begründete den Begriff des "Uterocalins" (KASIK und RICE, 1995). Die Sekretion von Lcn2 durch das Fettgewebe definiert es zudem als Mitglied der Adipokine (OUCHI et al., 2011). Die Vielfältigkeit der Namensgebung dieses Proteins ist eine Reflexion der vielfältigen Mechanismen, in die es involviert sein soll, und lässt auf die Komplexität seiner möglichen Funktionen schließen.

Das 25 kDA große Glykoprotein besteht aus 200 Aminosäuren, deren charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur die Einordnung als "Kern-Lipocalin" ermöglicht (FLOWER et al., 1993). Das 24P3-Gen weist 6 Exone auf und befindet sich auf dem murinen Chromosom 2 (SALIER, 2000). Die Aminosäuresequenzen des humanen und murinen Lipocalin-2 sind zu 62,1 % identisch (COWLAND und BORREGAARD, 1997). Trotz geringer Homologie sind funktionell wichtige Sequenzabschnitte zwischen den Spezies konserviert (CHAKRABORTY et al., 2012). In verschiedenen Studien zeigten das humane und murine Lipocalin-2 vergleichbare Reaktionsmuster (MARQUES et al., 2017).

In Untersuchungen von GOETZ et al. (2002) sowie HOLMES et al. (2005) konnte die Bindung bakterieller Siderophoren mit dem Zweck der antibakteriellen Eisendepletion dargelegt und dem Lipocalin-2 somit eine Funktion als Teil des angeborenen Immunsystems zugewiesen werden. Die Bezeichnung "Siderocalin", welche auf den Liganden verweisen soll, wurde in diesem Zusammenhang etabliert. DEVIREDDY et al. (2010) entdeckten die Siderophore Enterocholin als endogenen Lipocalin-2-Liganden, der nicht bakteriellen Ursprungs ist, sondern von Säugetierzellen selbst stammt. Die damit verbundene Möglichkeit des Eingreifens in die zelluläre Eisenhomöostase zeigt die Bedeutung von Lipocalin-2 bei Zellstoffwechselprozessen auf. YANG et al. (2002) zeigten, dass Lipocalin-2 durch den Transport von Eisen und dessen intrazellulärer Bereitstellung Eisen-responsive Gene induzieren kann und somit auch eine essentielle Rolle an der Zelldifferenzierung und -physiologie innehat. An verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien konnte zudem die Induktion der Apoptose mittels einer Reduktion der intrazellulären Eisenkonzentration durch Lipocalin-2 erkannt werden (DEVIREDDY et al., 2001). Die trichterförmige Ligandenbindungsregion des Lipocalin-2 ist im Vergleich zu den weiteren Mitgliedern der Lipocalin-Familie außergewöhnlich groß, polar und weit geöffnet (COLES et al., 1999; GOETZ et al., 2000). Eine schwache Bindung an den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) sowie das Leukotrien B4 konnte festgestellt werden und die Bindung weiterer makromolekularer Liganden, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, wird von verschiedenen Quellen vermutet (BRATT et al., 1999).

Unter physiologischen Bedingungen wird das murine Lcn2 in Geweben sämtlicher Keimblätter exprimiert (CHAKRABORTY et al., 2012). GARAY-ROJAS et al. (1996) konnten entsprechende mRNA in Leber, Milz, Lunge und Hoden von 3 Wochen alten Mäusen nachweisen; in der Niere wurde nur eine geringe Lcn2-Expression bei 10 Tage alten Mäusen festgestellt. In Niere, Gehirn, Thymus und Muskulatur gesunder adulter Mäuse wurde keine Lcn2-Expression beobachtet. AIGNER et al. (2007) zeigten – analog zum humanen Lcn2 – die vermehrte Lcn2-Synthese in neutrophilen Granulozyten sowie eine geringe Expression im gesunden Myokard. Messungen der mRNA-Gehalte von humanem Lipocalin-2 (LCN2) in 50 verschiedenen Geweben gesunder adulter Menschen ergaben eine hohe Expression in Knochenmark, Uterus, Prostata, Speicheldrüse, Magen, Appendix, Kolon, Trachea und Lunge (COWLAND und BORREGAARD, 1997). Im gesunden murinen und humanen Hirngewebe ist keine bzw. ledig-lich eine sehr geringe Lipocalin-2-Expression feststellbar (CHIA et al., 2015; IP et al., 2011; NAUDE et al., 2012; ZAMANIAN et al., 2012).

Bisher sind 2 Rezeptoren des Lipocalin-2 beschrieben. 24P3R oder auch murine brain-type organic cation transporter soll zwölf Transmembran-Helices aufweisen sowie die Bindung und Internalisierung von Lipocalin-2 in die Zelle ermöglichen (DEVIREDDY et al., 2005; RICHARDSON, 2005). Neben verschiedenen Entzündungszellen, zum Beispiel neutrophilen

Granulozyten und Makrophagen (JHA et al., 2014), wird der Rezeptor auch in den Epithelzellen der renalen distalen Tubuli und Sammelrohre (LANGELUEDDECKE et al., 2012) sowie Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und dem Plexus choroideus exprimiert (NAM et al., 2014). Megalin (auch low density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2) oder gp330) bindet eine Vielzahl verschiedener Liganden, darunter auch Lactoferrin und andere Lipocaline, und kann der Familie der low density lipoprotein (LDL)-Rezeptoren zugeordnet werden (SAITO et al., 1994), HVIDBERG et al. (2005) konnten zeigen, dass Megalin humanes Lipocalin-2 mit hoher Affinität bindet und für dessen zelluläre Aufnahme durch Endozvtose verantwortlich ist. Insbesondere Epithelien mit absorptiven Funktionen, zum Beispiel Epithelzellen der renalen proximalen Tubuli, Ependymzellen, Typ II-Pneumozyten, zeigen eine ausgeprägte Expression des Rezeptors (LUNDGREN et al., 1997; ZHENG et al., 1994). Im zentralen Nervensystem konnte Megalin in Zellen des Plexus choroideus, in Endothelzellen (CARRO et al., 2005; CHUN et al., 1999), den Ependymzellen der lateralen Hirnventrikel (GAJERA et al., 2010) und retinalen Ganglienzellen (FITZGERALD et al., 2007) nachgewiesen werden. Der Rezeptor ist für den Transport seiner Liganden durch die Blut-Hirn-Schranke von großer Bedeutung (PAN et al., 2004). Kulturen primärer muriner Astrozyten (JANG et al., 2013a) und Neuronen (AMBJORN et al., 2008; LEE et al., 2012) wiesen ebenfalls eine deutliche Expression dieses Rezeptors auf und besitzen damit die Voraussetzung für die zelluläre Aufnahme von Lcn2, was eine auto- bzw. parakrine Wirkung von Lcn2 im Gehirn ermöglichen sollte (GOUWELEEUW et al., 2015).

3.3.2 Bedeutung und Funktionen von Lipocalin-2 im ZNS

Lipocalin-2 wird im Zusammenhang mit zahlreichen pathologischen Zuständen aufreguliert. Im zentralen Nervensystem kann eine vermehrte Lipocalin-2-Expression nicht nur nach inflammatorischen Stimuli, zum Beispiel intrazerebraler oder peripherer Lipopolysaccharid-Injektion (CHIA et al., 2015; IP et al., 2011; KANG et al., 2017; MARQUES et al., 2008), sondern auch bei hypoxischen Zuständen infolge von Gefäßverschlüssen (JIN et al., 2014b) und traumatischen Hirnverletzungen (ALMEIDA-SUHETT et al., 2014) beobachtet werden. Unter inflammatorischen Bedingungen gelten die Astrozyten als Hauptquelle von Lipocalin-2 im zentralen Nervensystem, so dass Lcn2 teilweise auch als Marker reaktiver Astrozyten bezeichnet wird (ANDERSON et al., 2014; SUK, 2016). Neben der vermehrten Expression in Astrozyten werden unter unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen auch Endothelzellen, Mikrogliazellen und Zellen des Plexus choroideus als zelluläre Ursprünge von Lcn2 genannt (CHUN et al., 2015; HAMZIC et al., 2013; NAUDE et al., 2012; ZAMANIAN et al., 2012). Die Expression von Lipocalin-2 in Neuronen wird von verschiedenen Autoren propagiert (JEON et al., 2013; MUCHA et al., 2011; NAUDE et al., 2012). Jedoch konnte in einer Untersuchung von IP et al. (2011) zwar Lipocalin-2 mittels immunhistologischer Untersuchung unter anderem in Neuronen nachgewiesen werden, die entsprechende mRNA war in Neuronen mittels In-situ-Hybridisierung jedoch nicht identifizierbar, so dass vermutet wird, dass die Neurone lediglich von Gliazellen sezerniertes Lipocalin-2 aufnehmen.

Das charakteristische Expressionsmuster im Rahmen zerebraler pathologischer Zustände legt die Vermutung nahe, dass Lipocalin-2 an der Modulation des Entzündungsgeschehens und damit an der Progression der verschiedenen Erkrankungen beteiligt sein könnte - entweder in Form einer pro- oder antiinflammatorischen Wirkung (FERREIRA et al., 2015; KANG et al., 2017). Transkriptomanalysen an Hirngewebe von Lcn2-k.o.- und Wildtyp-Mäusen ließen nur minimale Unterschiede im physiologischen Zustand, jedoch massive Unterschiede, insbesondere hinsichtlich des Zytokinprofils, nach inflammatorischer Stimulation durch LPS erkennen (KANG et al., 2017). Die funktionelle Bedeutung von Lcn2 wird aktuell jedoch noch kontrovers diskutiert.

3.3.3 Lipocalin-2 im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse

In verschiedensten neuroinflammatorischen Modellen konnten bei Lcn2-k.o.-Tieren eine mildere Symptomatik und reduzierte Entzündungsreaktion festgestellt werden: In Untersuchungen von NAM et al. (2014) sowie CHUN et al. (2015) zeigten Lipocalin-2-k.o.-Mäuse, bei denen eine experimentelle autoimmune Enzephalomvelitis (EAE) bzw. eine experimentelle autoimmune Neuritis des Nervus opticus induziert wurde, nicht nur einen milderen Krankheitsgrad, sondern auch eine geringere entzündliche Infiltration und Gliaaktivierung, reduzierte proinflammatorische Zytokinspiegel sowie eine weniger stark ausgeprägte Demyelinisierung. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach einer Okklusion der Arteria cerebri media: Das Infarktvolumen, die neurologischen Ausfälle, die Expression von Entzündungsmediatoren und die Gliaaktivierung fielen bei Lcn2-k.o.-Tieren signifikant geringer aus (JIN et al., 2014b). NI et al. (2015) beobachteten, dass Lcn2-k.o.-Mäuse nach artifiziellen intrazerebralen Blutungen mildere neurologische Defizite, geringere Hirnschwellung und -atrophie sowie Mikrogliaaktivierung zeigten. Auch nach einem spinalen Trauma zeigen Lcn2-k.o.-Tiere eine schnellere klinische Regeneration und eine bessere Gewebeerhaltung (RATHORE et al., 2011). JHA et al. (2013) konnten in Untersuchungen zum pathologischen Schmerz, welcher mit einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten verbunden ist, bestätigen, dass Lcn2-k.o.-Mäuse eine mildere klinische Symptomatik und Gliaaktivierung zeigen und darüber hinaus die negativen Effekte von Lipocalin-2 bei Wildtypmäusen durch die intrathekale Applikation eines anti-Lipocalin-2-Antikörpers unterbinden bzw. abmildern. An verschiedene Modellen der Parkinson'schen Krankheit wurde eine Aufregulation von Lcn2 in engem zeit- und räumlichen Zusammenhang mit neuroinflammatorischen und -degenerativen Prozessen beschrieben (CHOY et al., 2015; KIM

et al., 2016). Die Funktion von Lcn2 im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse wird dennoch kontrovers diskutiert, da auch verschiedene Studien eine neuroprotektive Funktion zeigten: BERARD et al. (2012) beobachteten an Lcn2-k.o.-Tieren, bei denen eine EAE induziert wurde, einen schwereren Krankheitsgrad und eine verstärkte Expression proinflammatorischer Mediatoren im ZNS, so dass dem Lipocalin-2 eine neuroprotektive Rolle zugesprochen wurde. Erst kürzlich konnten in Sepsismodellen bei Lcn2-k.o.-Mäusen nach peripherer LPS-Injektion erhöhte intrazerebrale TNF- α - und IL-6-Spiegel sowie gravierendere Verhaltensstörungen als bei Mäusen mit normaler Lcn2-Expression nachgewiesen werden; eine Transkriptomanalyse zeigte zugleich eine Verschiebung in Richtung eines proinflammatorischen Zytokinprofils (KANG et al., 2017; MARQUES et al., 2017).

Ein zentraler Punkt der Funktion von Lcn2 im Rahmen neuroinflammatorischer und - degenerativer Prozesse ist der proinflammatorische Einfluss auf Astrozyten und Mikroglia (JANG et al., 2013a; JANG et al., 2013b; KIM et al., 2016; RANJBAR TAKLIMIE et al., 2019). Reaktive Astrozvten können – analog zu Mikrogliazellen – im Rahmen von neuroinflammatorischen Bedingungen gegensätzliche funktionelle Zustände annehmen, die sich durch die Förderung oder Inhibition der Entzündungsreaktion auszeichnen (JHA et al., 2016; JOHN et al., 2003; ZAMANIAN et al., 2012). JANG et al. (2013a) untersuchten diese so genannte "funktionelle Polarisierung" der Astrozyten und deren Effekte auf kokultivierte Neuronen, die auch in Abbildung 3 dargestellt werden. Lipocalin-2 ist ein zentraler Mediator der funktionellen Polarisierung von Astrozyten: So exprimieren mit Lipocalin-2 behandelte Astrozyten typische Marker der klassischen Aktivierung und zeigen die charakteristische Morphologie reaktiver Astrozyten (JANG et al., 2013a; LEE et al., 2009). Der Weg der alternativen Aktivierung wird jedoch durch Lcn2 eher blockiert, infolge einer Inhibition der IL-4-vermittelten STAT6-Phosphorylierung und entsprechend reduzierter Expression von antiinflammatorischen Mediatoren. Bei Astrozyten von Lcn2-k.o.-Mäusen ist eine klassische Aktivierung in vitro nicht möglich, was auf die zentrale Position von Lcn2 in diesem Prozess hinweist, während der Weg der alternativen Aktivierung nicht beeinflusst wird (JANG et al., 2013a).


Abbildung 3: Die Rolle von Lcn2 bei der phänotypischen Polarisierung von Astrozyten, nach JHA et al. (2016)

Lipocalin-2 begünstigt die Polarisierung von Mikroglia und Astrozyten in Richtung eines proinflammatorischen "M1"- bzw. "A1"-Phänotyps und blockiert parallel den neuroprotektiven, antiinflammatorischen "M2"- bzw. "A2"-Phänotyp in einer auto- und parakrinen Art und Weise. Die roten "Perlen" symbolisieren sezerniertes Lipocalin-2.

A1: proinflammatorischer Phänotyp von Astrozyten, A2: antiinflammatorischer Phänotyp von Astrozyten, Lcn2: Lcn2, Lipocalin-2; M1: proinflammatorischer Phänotyp von Mikroglia, M2: antiinflammatorischer Phänotyp von Mikroglia

Weiterhin ist ein dosisabhängiger direkter neurotoxischer Effekt von Lipocalin-2, ebenso wie eine neuronale Sensibilisierung gegenüber verschiedenen Noxen, zum Beispiel freien Radikalen, mit entsprechender Erhöhung der Apoptoserate, *in vitro* nachvollziehbar (LEE et al., 2012; WANG et al., 2015). Die Aufregulation des proapoptotischen Faktors Bim (auch bezeichnet als *Bcl-2-like protein 11*) ist dabei von essentieller Bedeutung und vermutlich Folge einer veränderten intrazellulären Eisenkonzentration durch die Chelator-Funktion von Lipocalin-2 (CHIA et al., 2015; DEVIREDDY et al., 2005; WANG et al., 2015). Indirekte neurotoxische Effekte durch die vermehrte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsgeschehen konnten ebenfalls auf Lipocalin-2 zurückgeführt werden (RATHORE et al., 2011). Zudem zeigen neutrophile Granulozyten von Lcn2-k.o.-Tieren eine Reduktion wichtiger antimikrobieller Fähigkeiten, wie Chemotaxis, Migration und Phagozytose (LIU et al., 2013).

3.3.4 Lipocalin-2-vermittelte Signalwege

Zahlreiche Zytokine, Wachstumsfaktoren, Glukokortikoide, Östrogen und Lipopolysaccharide können die Expression von Lipocalin-2 modulieren (FERREIRA et al., 2015). Die Partizipation an proinflammatorischen Signalwegen ist ein zentraler Faktor hinsichtlich der

vermuteten neurotoxischen Effekte von Lipocalin-2 und kann insbesondere an den Wechselwirkungen mit dem TNF-α veranschaulicht werden. In vitro induziert TNF-α nach Bindung an den TNFR1 über eine NFkB-abhängige Signalkaskade eine verstärkte Lipocalin-2-Expression in Neuronen-, Mikroglia- und Astrozytenkulturen (NAUDE et al., 2012). TNF-α zählt zu den effizientesten Induktoren der neuronalen NFkB-Aktivität. Insbesondere Gliazellen müssen als primäre Effektorzellen betrachtet werden (KIM et al., 2013; LISTWAK et al., 2013), ZHAO und STEPHENS (2013) konnten eine NFKB-Bindungsstelle in der Promoterregion des Lipocalin-2-Gens identifizieren. NFKB wird als wichtigster Transkriptionsfaktor von Lipocalin-2 bezeichnet, dennoch sind auch weitere Transkriptionsfaktoren bekannt. So erwies sich STAT3 unter chronischen neuroinflammatorischen Umständen als weiterer Transkriptionsfaktor von Lipocalin-2 in spinalen Astrozyten und zugleich als notwendiger Faktor der reaktiven Astrozytose (SHIRATORI-HAYASHI et al., 2015). In einer Studie an Lcn2-inkubierten murinen Astrozyten konnte gezeigt werden, dass beide Transkriptionsfaktoren zugleich als Downstream-Signalwege in der Lipocalin-2-Kaskade fungieren. So induziert Lipocalin-2 über einen STAT3-abhängigen Signalweg die Expression des proinflammatorischen Chemokins CXCL-10, während NFkB die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) ermöglicht, infolgedessen eine vermehrte GFAP-Expression und Aktivierung der Zellen erfolgt (LEE et al., 2011). Auch die Signalwege von TNF-α können durch Lipocalin-2 beeinflusst werden: Die über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2) vermittelte Neuroprotektion von TNF-a, welche auf einer PKB/Akt-induzierten NFkB-Aktivierung basiert, wird von Lcn2 durch die Aufregulation von der Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) - einem Inhibitor des P13/Akt-Pfades - vermindert. Mit TNF-a und Lcn2 ko-inkubierte Neuronen zeigen dementsprechend eine deutlich höhere Sensibilität gegenüber den toxischen Wirkungen von Glutamat und Amyloid ß sowie eine verstärkte Expression des proapoptotischen Faktors *cleaved caspase* 3 als lediglich mit TNF- α inkubierte Neuronen (MARCHETTI et al., 2004; NAUDE et al., 2012).

3.4 Tumor Nekrose Faktor-α

3.4.1 TNF-α und seine Rezeptoren im ZNS

Das Zytokin TNF- α wurde aufgrund seiner Fähigkeit, Nekrosen in bestimmten Tumoren zu induzieren, 1975 von CARSWELL et al. entdeckt und benannt (CARSWELL et al., 1975). Die Synthese von TNF- α generiert zunächst ein 26 kDa schweres Typ II-Transmembranprotein (TNF- α_{Mem}), welches durch eine Metalloproteinase (*TNF-\alpha converting enzyme, TACE*) so gespalten wird, dass eine lösliche 17 kDa schwere Form des TNF- α (TNF- α_{sol}) entsteht (IDRISS und NAISMITH, 2000; KRIEGLER et al., 1988; LUETTIG et al., 1989). Beide Formen sind biologisch aktiv. Die membrangebundene Variante benötigt einen direkten Zell-zu-Zell-Kontakt, während das lösliche TNF- α sezerniert wird (PEREZ et al., 1990). TNF- α ist ein typischer Repräsentant der pleiotropen Zytokine mit proinflammatorischen, neurodegenerativen und antiinflammatorischen, neuroprotektiven Wirkungen und wird insbesondere im Rahmen eines akuten Entzündungsgeschehens sezerniert, umfasst jedoch ein sehr komplexes Funktionsspektrum, das bis *dato* noch nicht endgültig erforscht ist (PROBERT, 2015; VASSALLI, 1992; VILCEK und LEE, 1991).

TNF- α wird von zahlreichen Immun- und Nicht-Immunzellen gebildet. Im ZNS stellen Mikrogliazellen die Hauptquelle dar; Astrozyten, Neurone und Ependymzellen sind – insbesondere nach proinflammatorischer Stimulation bzw. Schädigung – auch zur Synthese befähigt (BREDER et al., 1993; CHUNG und BENVENISTE, 1990; GAHRING et al., 1996; LIU et al., 1994; TARLOW et al., 1993; VILCEK und LEE, 1991). Im Entzündungsgeschehen wird zudem weiteres TNF- α durch infiltrierende Immunzellen gebildet, ein Transporter-abhängiger Übertritt von TNF- α aus dem Blutsystem in das Neuroparenchym ist ebenfalls möglich (GUTIERREZ et al., 1993).

TNF- α bindet an 2 Rezeptoren, welche sich hinsichtlich ihrer Expressionsmuster, der Affinität für TNF- α und der nachgeschalteten Signalkaskaden unterscheiden: TNFR1 (auch: TNFRSF1A, CD120a oder p55) und TNFR2 (auch: TNFRSF1B, CD120b oder p75) (BROCKHAUS et al., 1990; LOETSCHER et al., 1990; SCHALL et al., 1990; VILCEK und LEE, 1991). Eine Übersicht über die Signalwege der TNF- α - Rezeptoren bietet Abbildung 4. TNF- α_{Mem} weist eine höhere Affinität zu TNFR2 auf, während TNF- α_{sol} den TNFR1 präferiert (GRELL et al., 1995; GRELL et al., 1998; THOMA et al., 1990). Lediglich TNFR1 besitzt eine so genannte Todesdomäne (*death domain*), beide Rezeptoren können aber eine Apoptose der Zelle induzieren (BRENNER et al., 2015; DEPUYDT et al., 2005; TARTAGLIA et al., 1993a). Die Signalvermittlung über den TNFR1 hat v.a. proinflammatorische, neurodegenerative und prokonvulsive Wirkungen, über den TNFR2 antiinflammatorische, neuroprotektive und antikonvulsive Wirkungen, wobei beide Rezeptoren miteinander interagieren (BALOSSO et

al., 2005; DONG et al., 2015; DONG et al., 2016; FONTAINE et al., 2002; NAUDÉ et al., 2011). Die Bindung von TNF-α an den TNFR1 bewirkt zunächst die Rekrutierung des so genannten TNFR1 death domain protein (TRADD) und die Bildung eines membrangebundenen Komplexes (Komplex 1), der zudem das TNFR-associated protein 2 (TRAF2) und die Kinase RIP1 enthält und über eine nachgeschaltete Signalkaskade eine Degradierung von inhibierend wirkenden kB-Proteinen (IkB) zur Folge hat, die normalerweise den Transkriptionsfaktor NFkB im Zytoplasma halten. Im Nukleus kann NFkB dann zahlreiche Gene ablesen (CHEN und GOEDDEL, 2002: DONG et al., 2015: NAUDÉ et al., 2011: TING und BERTRAND, 2016), Die anschließende Bildung eines zytoplasmatischen Komplexes (Komplex 2) aus der Fas-associated death domain (FADD), der Kinase RIP1, der Caspase 8 und der TRADD kann über eine Caspasenkaskade die Apoptose der Zelle induzieren, wenn der Komplex zum Beispiel nicht durch den NFkB-abhängigen Caspase-8-Inibitor FLIPL daran gehindert wird (MICHEAU und TSCHOPP, 2003). Der TNFR1 wird als der Rezeptor beschrieben, der den Großteil der biologischen Effekte von TNF-α vermittelt (AGGARWAL et al., 2000; KONDYLIS et al., 2017; TARTAGLIA et al., 1991). Die via TNFR1 induzierten Wirkungen sind überwiegend proinflammatorischer, teilweise auch zytotoxischer Natur. Der TNFR1 ist essentiell für die Induktion und den Ablauf der TNF-α-vermittelten Entzündungsreaktion auf verschiedene Stimuli, zum Beispiel nach parasitären, bakteriellen oder viralen Infektionen (CASTANOS-VELEZ et al., 1998; PFEFFER et al., 1993; SEDGER und MCDERMOTT, 2014; VILELA et al., 2010). TNFR2 kann mithilfe von TRAF2 ebenfalls PKB/Akt und NFkB aktivieren (CABAL-HIERRO und LAZO, 2012; LAEGREID et al., 1994; MARCHETTI et al., 2004; NAUDÉ et al., 2011; PROBERT, 2015; RAO et al., 1995). Die durch den TNFR2 vermittelten Effekte sind noch nicht vollständig bekannt und oft kontroverser Natur. Der Rezeptor ist in verschiedene physiologische Prozesse regulativ involviert, zum Beispiel im Rahmen der Hämatopoese und T-Zell-Entwicklung und Funktion (JACOBSEN et al., 1994; TARTAGLIA et al., 1993b; YE et al., 2018). Im Rahmen exzitotoxischer Zustände kann durch die Stimulation des TNFR2 eine erhöhte Resistenz der Neuronen gegenüber den Noxen erreicht und somit eine neuroprotektive Wirkung erzielt werden, die durch eine parallele Antagonisierung des TNFR1 weiter verstärkt werden kann (DONG et al., 2016; GHOSH et al., 2018). Weiterhin treten bei TNFR2-k.o.-Mäusen deutlich verstärkte TNF-α-mediierte entzündliche Reaktionen auf, die die protektive Rolle des TNFR2 im TNF-α-Metabolismus belegen (FONTAINE et al., 2002; PESCHON et al., 1998).

TNF- α ist der stärkste Aktivator des Transkriptionsfaktors NF κ B, welcher für die Wirkung von TNF- α im Entzündungsgeschehen von zentraler Bedeutung ist (CHATURVEDI et al., 1994; TING und BERTRAND, 2016).

33

TNFR1 wird ubiguitär und konstitutiv exprimiert, während die Expression des TNFR2 auf Zellen des Immunsystems, Endothelzellen sowie im ZNS auf Neurone, Oligodendrozyten, Oligodendrozytenvorläuferzellen und Astrozyten beschränkt ist (AGGARWAL et al., 2012; AGGARWAL et al., 2000; TCHÉLINGÉRIAN et al., 1995). Beide Rezeptoren bilden aufgrund der typischen wiederholten Zystein-reichen Motive in ihrer extrazellulären Domäne Prototypen der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor (NGF))/Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie (BODMER et al., 2002: LOTZ et al., 1996: SMITH et al., 1990). Die Rezeptoren setzen sich aus einer extrazellulären Domäne für die Ligandenbindung, einem Transmembransegment und einer intrazellulären Domäne für die Signaltransduktion zusammen (AGGARWAL et al., 2000). Durch Abspaltung der extrazellulären Domäne kommen beide TNF-Rezeptoren auch in löslicher Form vor und können auf diesem Weg TNF-α entgegenwirken. Sie fungieren daher auch als decoy receptor (ENGELMANN et al., 1989; NOPHAR et al., 1990). In niedrigen Konzentrationen scheinen die löslichen TNF-Rezeptoren jedoch auch zur Stabilität der TNF-α-Moleküle beizutragen (ADERKA et al., 1992), TNFR2 ist hauptsächlich in der Zellmembran lokalisiert, während sich TNFR1 vornehmlich im Golgi-Apparat aufhält und durch verschiedene Stimuli zur Zellmembran mobilisiert wird (BRADLEY et al., 1995; WANG et al., 2003).



Abbildung 4: TNFR1 und TNFR2-Signalwege (modifiziert nach NAUDE et al. (2011))

cFLIP: caspase-8 homologue FLICE-inhibitory protein; cIAP: cellular inhibitor of apoptosis; DD: death domain; FADD: Fas-associated death domain protein; IBa, inhibitor of kappa B; IkK: IkB kinase; NFkB: nuclear factor kappa B; NIK: NFkB-inducing kinase; P: Phosphat; p50 und p65: Polypeptide des NFkB-Proteins; PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; RelA und RelB:Proteine der NFkB-Familie; RIP: receptor interacting protein; TRADD: TNF receptor-associated death domain; TRAF: TNF receptor associate factor; Ub: Ubiquitin

TNFR1-Signalwege: Nach TNF-α-Bindung an den TNFR1 bindet TRADD und rekrutiert weitere Adapterproteine, unter anderem TRAF2, die dann den Komplex 1 bilden und NFκB aktivieren. Im Weiteren assoziieren TRAF2 oder TRAF5 mit clAP1/2, uBC13, TRADD und RIP und initiieren die Ubiquitinierung von RIP, das dann über den TAK1/TAB2-Komplex die katalytische IκB-Kinase aktiviert, welche durch Phosphorylierung IκBa als inhibitorisches Protein von NFκB inaktiviert, so dass NFκB in den Zellkem translozieren kann, um die Transkription zahlreicher antiapoptotischer und proinflammatorischer Gene zu induzieren. Die synthetisierten Proteine, zum Beispiel cFLIP, wirken dem Effekt eines weiteren Komplexes, dem zytoplasmatischen Komplex bzw. Komplex II, gebildet aus TRADD, FADD, RIP und der Caspase 8 entgegen, welcher die Induktion einer Caspasen-Kaskade mit finaler Apoptose der Zelle vorsieht. Im Falle, dass der Komplex 1 es nicht schafft, NFκB zu aktivieren, wird somit über den Komplex 2 der proapoptotische Signalweg initiiert.

TNFR2-Signalwege: Durch die Bindung von membrangebundenem TNF-α erfolgt eine Trimerisierung des TNFR2 mit anschließender Rekrutierung von TRAF2 und der damit assoziierten Proteine TRAF1, cIAP1 und -2. Auf diese Weise wird der Komplex dieser Proteine aus einer vorigen Verbindung mit TRAF3 und der NFκB-inducing kinase (NIK) gelöst. Dieser Prozess geht mit einem Stopp des NIK-Abbaus infolge einer cIAP-vermittelten Ubiquitinierung einher und resultiert in einer zytoplasmatischen Akkumulation von NIK. NIK aktiviert IKK, welches über eine Phosphorylierung des NFκB-Vorläuferproteins P100 dessen proteosomale Degradation zu Gunsten einer P52-Produktion verschiebt und schließlich die NFκB-Aktivierung erreicht. Alternativ kann nach der TNFR2-Stimulation auch der PKB/Akt-Signalweg aktiviert werden: Die Aktivierung der P13K führt zu einer vermehrten Bildung von an der Zellmembran verankerten Phosphoinositiden, an die PKB bindet. Aufgrund der hohen Affinität für die Phosphoinositiden transloziert Akt in die Zellmembran und wird dort durch die PKB phosphoryliert. Nach folgender IkB Kinase-Aktivierung kommt es schließlich zur NFκB-Aktivierung.

3.4.2 TNF-α und Neuroinflammation

Die Aktivität von TNF- α im ZNS kann unter dem Begriff der "funktionellen Multiplizität" zusammengefasst werden (PROBERT, 2015): Neben der Beteiligung an physiologischen Prozessen – beispielsweise der Erhaltung der synaptischen Homöostase – kann TNF- α im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse protektive als auch schädigende Effekte fördern bzw. generieren (SANTELLO et al., 2011). TNF- α wird im Zusammenhang mit zahlreichen akuten entzündlichen, aber auch chronischen degenerativen Zuständen des ZNS vermehrt synthetisiert. Insbesondere chronische neurodegenerative Erkrankungen basieren zu einem großen Teil auf einem perpetuierenden Entzündungsgeschehen, welches durch die Blockade von TNF- α bzw. seiner TNFR1-Bindung reduziert bis eliminiert werden kann (EUGSTER et al., 1999; HSIAO et al., 2014; IORI et al., 2016; KASSIOTIS et al., 1999; KASSIOTIS und KOLLIAS, 2001; MCALPINE et al., 2009; TAUPIN et al., 1997). Auch bei akuten Entzündungszuständen, zum Beispiel nach Gefäßokklusionen, konnte in verschiedenen Modellen eine Parenchymschädigung durch die Inhibition von TNF- α gemildert werden (MEISTRELL et al., 1997; NAWASHIRO et al., 1997).

Die Mechanismen der schädigenden TNF-α-Wirkungen im Zusammenhang mit Erkrankungen des ZNS sind vielfältig. TNF- α kann die Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle induzieren, wodurch eine Immunzellinfiltration ermöglicht wird, und ist entscheidend in die Leukozytenmigration involviert (BRISCOE et al., 1992; SEDGWICK et al., 2000; VARATHARAJ und GALEA, 2017). Durch die Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen wirkt TNF- α an der Generierung eines proinflammatorischen Milieus im ZNS mit und fungiert als wichtiger Faktor der Kommunikation zwischen residenten Zellen des Neuroparenchyms und der adaptiven Immunantwort (HAN et al., 2001). Am Beispiel der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis konnten KASSIOTIS et al. (1999) darlegen, dass die verstärkte TNF-α-Synthese und -Sekretion durch residente Zellen des ZNS ausreicht, um eine Demyelinisierung und neuronale Störungen zu initiieren, indem sie TNF-α-transgene Mäuse derart rückkreuzten, dass diese keine reifen B- und T-Lymphozyten aufwiesen, die das Entzündungsgeschehen maßgeblich durch ihre TNF-a-Synthese beeinflussen könnten. Die Aktivierung von Mikrogliazellen und Makrophagen und/oder die zytotoxischen Effekte von TNF-α auf Oligodendrozyten werden als Ursache des Myelinabbaus diskutiert (AKASSOGLOU et al., 1998; CHU et al., 2018; KASSIOTIS et al., 1999; PROBERT, 2015; TAUPIN et al., 1997; VALENTIN-TORRES et al., 2016). In Kombination mit IFN- χ stimuliert TNF- α sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species (ROS)) beziehungsweise reaktiver Stickstoffspezies (reactive nitrogen species (NOS) und kann auf diese Weise neuronale Untergänge induzieren (FALSIG et al., 2004; FISCHER und MAIER, 2015; MIR et al., 2009; MIR et al., 2008).

Das Paradoxon der Wirkung von TNF-g wird zum Beispiel durch die Studie von MARCHETTI et al. (2004) verdeutlicht, welche zeigt, dass TNF- α auch eine neuroprotektive Wirkung gegenüber exzitotoxischen Reizen haben kann, die auf einer TNFR2-vermittelten Signaltransduktion basiert. BRUCE et al. (1996) blockierten die Funktionen von TNF-α gänzlich durch die Schaffung einer TNFR-k.o.-Mauslinie, der beide TNF-Rezeptoren fehlten und welche vergleichsweise gravierendere Parenchymschäden nach ischämischer und hypoxischer Hirnverletzung aufwies als Wildtvp-Mäuse. Im Kontext der Epilepsie konnte die TNFR2-vermittelte, aktive Neuroprotektion durch TNF-α daraeleat werden: TNFR2-k.o.-Mäuse und TNFR1+2-k.o.-Mäuse zeigten ein wesentlich stärkeres Krampfgeschehen als TNFR1-k.o.-Mäuse (BALOSSO et al., 2005). Die neuronale Regeneration in der Folge eines Hirninfarktes wird durch TNF-α ebenfalls gefördert (HELDMANN et al., 2005). An rheumatoider Arthritis leidende Patienten, bei denen therapeutisch TNF-α-bindende Antikörper eingesetzt wurden, entwickelten vermehrt spontan auftretende Demyelinisierungen (FROMONT et al., 2009). LAMBERTSEN et al. (2009) konnten mit Hilfe von chimären TNF- α -k.o.-Mäusen darlegen, dass die Produktion des neuroprotektiven TNF-α nach einer Ischämie nicht durch die infiltrierenden Leukozyten, sondern vielmehr durch die residenten Zellen des ZNS - in erster Linie durch eine in dieser Studie nicht näher charakterisierte Mikrogliazellsubpopulation- erfolgt. Der TNFR2 wird stark auf regulatorischen T-Zellen exprimiert und fördert nach längerer TNF-α-Exposition deren Proliferation und Aktivierung, so dass eine Suppression von Effektor-T-Zellen erreicht und autoimmune Prozesse verhindert werden (ANNUNZIATO et al., 2002; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008). Auch im Rahmen regenerativer Prozesse - insbesondere der Remyelinisierung - ist der TNFR2 von zentraler Bedeutung, indem er die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen induziert und einen antioxidativen Schutz bietet (ARNETT et al., 2001; MAIER et al., 2013). Einzelne Studien implementieren eine antagonistische Wirkung der TNF-Rezeptoren: FONTAINE et al. (2002) zeigten, dass im Falle einer Ischämie der Retina ausschließlich neurodegenerative Effekte vom TNFR1 bzw. neuroprotektive Effekte vom TNFR2 vermittelt werden. Eine strikt Rezeptor-gebundene neuroprotektive/antiinflammatorische bzw. neurodegenerative/proinflammatorische Wirkung von TNF-a ist jedoch nicht der Fall. TAOUFIK et al. (2007) beschrieben eine neuroprotektive Rolle des TNFR1 im Rahmen einer experimentellen zerebralen Ischämie mittels einer NFkB-abhängigen Aufregulation des Fas-associated death domain-like interleukine-1-ß-converting enzyme-inhibitory protein (FLIP_L) und schlussendlich inhibitorischer Wirkung auf die Caspase 8.

Weitere Faktoren scheinen die TNF-α-Effekte entscheidend zu beeinflussen. So bestehen Unterschiede zwischen verschiedenen Hirnregionen, die möglicherweise auf die Dichte und den Aktivitätsstatus der Mikrogliazellen zurückzuführen sind, aber auch auf unterschiedlicher neuronaler TNF-Rezeptorexpression beruhen können (FIGIEL, 2008; SRIRAM et al., 2002). Die

37

Konzentration von TNF- α im Gewebe ebenso wie das Alter der Neuronen sind weitere Faktoren, die zum Beispiel die Amyloid ß-vermittelte Toxizität beeinflussen (VIEL et al., 2001). Grundsätzlich ist die TNF- α -Wirkung nicht isoliert zu betrachten, sondern muss vor dem Hintergrund der verschiedenen Zelltypen des Neuroparenchyms sowie der Interaktion zahlreicher weitere Zytokine in der Folge evaluiert werden, was die Erarbeitung eines simplen Ursache-Wirkungs-Prinzips für TNF- α erschwert bzw. unmöglich macht (FIGIEL, 2008).

3.4.2.1 TNF-α und Virusinfektionen

TNF- α ist für die vor allem via TNFR1 vermittelte Induktion einer protektiven Immunreaktion und Eindämmung der viralen Replikation insbesondere in der Frühphase einer Virusinfektion von zentraler Bedeutung (GUIDOTTI und CHISARI, 2000; SERGERIE et al., 2007; SHRESTHA et al., 2008). Bei Untersuchungen verschiedener viraler Infektionen, unter anderem durch Tollwut- und Influenzaviren, wurde die direkte und/oder indirekte antivirale Aktivität von TNF- α nachgewiesen (FABER et al., 2005; SEO und WEBSTER, 2002). An Kulturen humaner Hepatozyten konnten WANG et al. (2016) eine alleinige TNFR1-abhängige antivirale Wirkung von TNF- α gegen das Hepatitis C- und Hepatitis E-Virus zeigen. Durch die Kombination mit IFN- α war ein weiterer additiver Effekt zu beobachten. Patienten, die TNF- α -Inhibitoren erhalten, besitzen grundsätzlich ein höheres Risiko viraler Infektionen (MURDACA et al., 2015); eine Reaktivierung latenter Virusinfektionen, zum Beispiel von Hepatitis B, wird als mögliche Komplikation vermutet (NATHAN et al., 2006).

Des Weiteren ist TNF- α an der Induktion und Persistenz einer möglichen immunpathologischen Reaktion und daraus resultierender Kollateralschäden beteiligt und damit von entscheidender Bedeutung für den Verlauf einiger Virusinfektionen des ZNS (MBANWI und WATTS, 2014). TNFR1-k.o.-Mäuse zeigten nach experimenteller Tollwut-Infektion eine geringere Entzündungszellinfiltration und längere Überlebenszeit (CAMELO et al., 2000). Auch nach experimenteller Infektion neonataler Mäuse mit dem murinen Cytomegalievirus konnte mittels gegen TNF- α gerichteter Antikörper eine Entzündungsreaktion eingedämmt und die sonst typischen neuronalen Entwicklungsschäden reduziert werden (SELEME et al., 2017).

Die BoDV-1-Infektion von Mäusen und adulten Ratten geht mit einem deutlich erhöhten zerebralen TNF- α -Spiegel einher und ist durch eine immunpathologische Problematik gekennzeichnet (KRAMER et al., 2012; SAUDER et al., 2000; SHANKAR et al., 1992).

3.4.2.2 TNF-α und Epilepsie

Die Pathogenese der Epilepsie ist eng mit neuroinflammatorischen Prozessen verknüpft (IORI et al., 2016). Im Zusammenhang mit epileptischen Krämpfen konnten in zahlreichen Studien erhöhte zerebrale Spiegel von TNF- α und weiteren proinflammatorischen Zytokinen – oftmals in Kombination mit einer Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten – beobachtet werden

(DE SIMONI et al., 2000: DHOTE et al., 2007: KUTEYKIN-TEPLYAKOV et al., 2009: TURRIN und RIVEST, 2004). Die neuronale Überexpression von TNF- α in einem von PROBERT et al. (1995) geschaffenem transgenen Mausmodell resultierte in Krämpfen, Ataxie und Paresen sowie einer ausgedehnten Neuroinflammation einhergehend mit Mikrogliaaktivierung und Astrozytose sowie einer Demyelinisierung. Die Applikation eines TNF-α-neutralisierenden Antikörpers verhinderte das Auftreten der beschriebenen Pathologie und zeigt das Potenzial von TNF-α als alleiniger Trigger der Epileptogenese in diesem Tiermodell (PROBERT et al., 1995). Nach intrazerebraler Iniektion von Kainsäure oder elektrischer Stimulation der Amvodala zeigten Ratten mit zerebraler Überexpression von humanem TNF-α, welches lediglich den TNFR1 stimuliert, eine deutlich erhöhte Empfänglichkeit für das Auftreten von Krämpfen, während Ratten mit Überexpression von murinem TNF-α, das auf beide TNFRs wirkt, keine (Kainsäure-Modell) bzw. eine reduzierte Empfänglichkeit (elektrische Stimulation) aufwiesen (WEINBERG et al., 2013). Die Hypothese, dass die gegensätzliche Wirkung von TNF-α in der Epileptogenese auf die Stimulation der verschiedenen Rezeptoren zurückzuführen ist, wird auch durch die Studie von BALOSSO et al. (2005) gestützt: TNFR1-k.o.-Tiere zeigten eine Reduktion der Krampfneigung nach intrazerebraler Kainsäure-Injektion, dem TNFR2 werden dagegen antikonvulsive Eigenschaften zugewiesen. In-vitro-Versuche an hippokampalen slice-cultures belegen die antikonvulsive TNF-α-Wirkung über den TNFR2 nach Behandlung mit der exzitotoxischen Aminomethylphosphonsäure (AMPA) (BERNARDINO et al., 2005). In der Folge epileptischer Krämpfe konnten sowohl WEINBERG et al. (2013) als auch BALOSSO et al. (2013) eine Aufregulation von TNFR1 und Reduktion von TNFR2 in Hirngewebe beobachten, was auf einen prokonvulsiven Status hindeuten kann. Zentrale Mechanismen der via TNFR1 vermittelten Verschärfung exzitotoxischer Zustände sind die Aufregulation synaptischer AMPA- und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und Reduktion inhibitorisch wirkender GABA_A-Rezeptoren an der synaptischen Oberfläche (BEATTIE et al., 2002; STELLWAGEN et al., 2005; STELLWAGEN und MALENKA, 2006; WHEELER et al., 2009). Die Quelle des TNF-α, welches die Rezeptorpräsenz an der Synapse entscheidend moduliert, stellen nicht etwa Neuronen, sondern vielmehr Mikrogliazellen dar und verdeutlichen die enge neurogliale Kommunikation (STELLWAGEN und MALENKA, 2006). Zudem induziert TNF-α die Glutamat-Ausschüttung von Astrozyten und Mikrogliazellen bzw. hemmt die astrozytäre Wiederaufnahme von Glutamat und übt damit auch indirekt einen prokonvulsiven Effekt aus (BEZZI et al., 2001; FINE et al., 1996; IORI et al., 2016; SANTELLO et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2006; ZOU und CREWS, 2005). Eine TNFR2-abhängige antikonvulsive Wirkung von TNF-α konnten DOLGA et al. (2008) anhand der Induktion einer vermehrten Expression von Kalzium-abhängigen Kalium-Kanälen in Neuronenkulturen darlegen, welche mit einer Reduktion der neuronalen Exzitabilität einhergeht.

Die in dieser Arbeit integrierten TNF- α -transgenen C56BL/6-Mäuse zeigten in früheren Studien nach intrazerebraler BoDV-1-Infektion epileptiforme Krämpfe, nicht aber die nicht-infizierten Tiere. Im Rahmen der BoDV-1-Infektion konnte kein weiterer Anstieg der TNF- α -Mengen, sondern vielmehr eine vermehrte Expression beider TNF-Rezeptoren beobachtet werden (KRAMER, 2006; KRAMER et al., 2012; SCHAUDIEN, 2007).

3.4.3 Mausmodelle zur Untersuchung des TNF-α-Systems

MARCHETTI et al. (2004) verwendeten das Gen der NR2B-Untereinheit des murinen NMDA-Rezeptors als Promoter, um eine moderate und regional auf das Frontalhirn (insbes. zerebraler Kortex und Hippocampus) begrenzte neuronale TNF-α-Expression zu gewährleisten. Die transgenen Mäuse wiesen keine neurologischen Störungen oder neuroinflammatorischen Prozesse auf. lediolich in den Arealen mit verstärkter TNF-α-Konzentration konnten vermehrt aktivierte Mikrogliazellen beobachtet werden. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nach neonataler BoDV-1-Infektion diese TNF-α-transgenen C57BL/6-Mäuse neurologische Störungen geprägt von epileptiformen Krämpfen zeigen sowie eine nicht-eitrige Meningoenzephalitis, während nicht-transgene C57BL/6-Mäuse - trotz hoher Viruslast - keine Krankheitssymptomatik oder histopathologische Läsionen aufweisen (KRAMER et al., 2012). TNFR1-k.o.-Mäuse wurden durch den Ersatz des 2., 3. und eines Teils des 4. Exons mit einer neomycin-resistance-Kassette generiert. Sie zeigen eine erhöhte Resistenz nach einer Lipopolysaccharid-Applikation, gegenüber der TNF-α-vermittelten Induktion einer Depression und im Rahmen hypoxischer Umstände sowie einen milderen Verlauf von EAE, jedoch eine stärkere Empfänglichkeit für Infektionen mit Listeria monozytogenes (EUGSTER et al., 1999; FONTAINE et al., 2002; KASTER et al., 2012; ROTHE et al., 1993).

Für die Generierung von TNFR2-k.o.-Mäusen wurde eine *neomycin-resistance*-Kassette in das 2. Exon integriert. Diese Mäuse zeigen eine verminderte Lernfähigkeit juveniler Tiere, eine erhöhte Resistenz gegenüber dem TNF-α-induzierten Zelltod und der Entwicklung einer zerebralen Form der Malaria, jedoch schwerere Verlaufsformen der EAE (ERICKSON et al., 1994; EUGSTER et al., 1999; LUCAS et al., 1997; NAUDE et al., 2014).

40

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Versuchsplanung

Grundsätzlich gliederte sich der experimentelle Teil dieser Arbeit in die Analyse der Lcn2-Expression *in vivo* anhand der Auswertung von Gehirnen BoDV-1 infizierter Mäuse verschiedener Linien, zum anderen *in vitro* durch die Untersuchung primärer muriner Astrozytenkulturen hinsichtlich ihrer Lcn2-Expression. Die Verwendung verschiedener Mauslinien (C57BL/6-Wild-typ, TNF-α-überexprimierende TNF-α-transgene C57BL/6-Mäuse, TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Mäuse) verfolgte das Ziel, die Rolle von Lcn2 im TNF-α-Signalsystem näher zu verstehen und Interaktionen nachvollziehen zu können.

4.1.1 In-vivo-Untersuchungen

Die Lipocalin-2-Expression wurde an Gehirngewebe verschiedener C57BL/6-Mausstämme untersucht, welche teilweise einen transgenen Hintergrund aufwiesen und daher eine verstärkte TNF-α-Expression (im weiteren als TNF-α-transgene Tiere, kurz: tg bezeichnet), eine fehlende Expression des TNFR1 (im weiteren als TNFR1-k.o. bezeichnet) bzw. des TNFR2 (im weiteren als TNFR2-k.o. bezeichnet) zeigten (ERICKSON et al., 1994; MARCHETTI et al., 2004: ROTHE et al., 1993). Zusätzlich wurden auch nicht-transgene C57BL/6-Mäuse (im Weiteren als Wildtyp-Tiere, kurz: wt bezeichnet) untersucht. Genauere Informationen hinsichtlich des transgenen Hintergrundes dieser Tiere finden sich unter 4.2. Das Versuchsmaterial stammte aus dem Tierversuch "Untersuchung der Pathogenese epileptiformer Krämpfe nach Infektion mit dem Borna disease virus (BDV)" (Aktenzeichen: GI 18/4 Nr. 12/2012). Im Rahmen dieses Versuchs wurden die Versuchstiere der verschiedenen Mauslinien neonatal intrazerebral durch die Applikation von 1 µl einer 1 %igen, auf 37°C erwärmten Gehirnsuspension BoDV-1-infizierter C57BL/6-Mäuse (verdünnt in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)) mit dem BoDV-1-Virus infiziert bzw. durch gleichartige Applikation von 1 µl einer 1 %igen Gehirnsuspension nicht-infizierter Mäuse in Medium mockinfiziert oder überhaupt nicht durch Applikation bzw. Infektion beeinflusst (entspricht im Weiteren den als "nicht-infiziert" bezeichneten Tieren). Die Mäuse wurden hinsichtlich des Auftretens einer Krankheitssymptomatik beobachtet und zu verschiedenen Zeitpunkten (u. a. 21 bzw. 42 Tage nach Infektion (days post infectionem, dpi) euthanasiert. Die Tiere wurden zeitnah nach der Euthanasie seziert, ein breites Organspektrum Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach sagittaler Separation in der Medianen wurde eine Gehirnhälfte Formalin-fixiert, wie in Abbildung 10 beschrieben, transversal geschnitten und die Teilstücke in Paraffin eingebettet. Die andere Hirnhälfte wurde tiefgefroren (ca. -80° C) asserviert.

In dieser Arbeit fanden die Paraffinschnitte der Gehirne der 21, 42 und 49 Tage nach der

Infektion (dpi) euthanasierten Tiere sowie die Paraffinschnitte von Gehirnen einzelner BoDV-1-infizierter vorzeitig euthanasierter oder verstorbener Mäuse Verwendung. Die angegebenen Zeiträume galten auch entsprechend für die nicht-infizierten Tiere.

Neben immunhistologischen Untersuchungen zum Nachweis von Lipocalin-2 (siehe Kapitel 4.4.1) erfolgten Untersuchungen der Lcn2-mRNA mittels In-situ Hybridisierung (siehe Kapitel 4.4.2) mit dem Ziel, den zellulären Ursprung der Lipocalin-2-mRNA zu identifizieren. Eine Übersicht über den Ablauf des Tierversuches sowie die im anschließenden beschriebenen Untersuchungsmethoden bietet Abbildung 5.





dpi: "days post infection", Tage nach der Infektion; FFPE: "formalin-fixed and paraffin-embedded" = formalinfixiert und in Paraffin eingebettet; IHC: Immunhistologie; ISH: In-situ-Hybridisierung; Lcn2: Lipocalin-2; GFAP: glial fibrillary acidic protein; mock-Infektion: nach intrazerebraler Applikation von 10 %iger Gehirnsuspension von nicht-infizierten Mäusen; TNFR1-k.o.: homozygote TNFR1-k.o.-C57BL/6-Maus; TNFR2-k.o.: homozygote TNFR2-k.o.-C57BL/6-Maus; tg/tg: homozygote TNF-a-transgene C57BL/6-Maus; tg/wt: Kreuzung aus homozygoter Wildtyp-C57BL/6-Maus

4.1.2 In-vitro-Untersuchungen

Astrozyten wurden aus dem frontalen Cortex cerebri der oben genannten Mauslinien kultiviert und bildeten die Basis für die *In-vitro*-Untersuchungen (Meldung über die geplante Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken; 630_M). Auch hier wurden immer ein Teil der Zellen BoDV-1-infiziert und ein Teil nicht infiziert. Nach der Präparation der Astrozyten aus neonatalen Mäusen der verschiedenen Linien wurden die Zellen über 28 Tage kultiviert und jeweils im 7 Tage-Intervall zum Teil passagiert bzw. fixiert und hinsichtlich der Lcn2- und GFAP-Expression sowie BoDV-1-Infektion mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen geprüft. Diese Parameter wurden darüber hinaus an einer weiteren Subpopulation der Astrozyten untersucht, welche gezielt mit TNF- α , IL-4, oder LPS + IFN- γ inkubiert wurden. Ein Überblick über die *In-vitro*-Untersuchungen bietet Abbildung 6.

Abbildung 6: Schema der In-vitro-Untersuchungen an primären murinen Astrozytenkulturen



BoDV-1-N: Nukleoprotein von BoDV-1; dpi: days post infectionem (Tage nach der Infektion); F: Fixierung; GFAP: glial fibrillary acidic protein (Astrozytenmarker); h pa: Stunden post applicationem (nach Beginn der Zytokinbehandlung); IF: Immunfluoreszenz; Lcn2: Lipocalin-2; MT-OT: Multitest-Objektträger; P: Passage; TNFR1-k.o.: homozygote TNFR1-k.o.-C57BL/6-Maus; TNFR2-k.o.: homozygote TNFR2-k.o.-C57BL/6-Maus; tg/tg: homozygote TNF-α-transgene C57BL/6-Maus; tg/wt: Kreuzung aus homozygoter Wildtyp C57BL/6-Maus und homozygoter TNF-α-transgener C57BL/6-Maus; wt/wt: homozygote Wildtyp-C57BL/6-Maus

4.2 Versuchstiere

Das untersuchte Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Gehirngewebe sowie die primären kortikalen Astrozytenkulturen stammten von 4 verschiedenen Mauslinien, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Im Rahmen des Tierversuches sowie im Zuge der Gewinnung der primären kortikalen Astrozytenkulturen erfolgte für jedes Tier eine Analyse des transgenen Status, die unter 4.2.5 näher beschrieben wird.

Die Mäuse, welche für die Erzeugung der primären kortikalen Astrozytenkulturen dienten, wurden in der Zentralen Tierhaltung der Justus-Liebig-Universität, Frankfurter Straße 125, 35392 Gießen, gehalten. Die Durchführung des Tierversuches erfolgte in der Tierversuchsanlage des BSL2 -Labors der Phillipps-Universität Marburg, Hans-Meerwein Straße 2, 35043 Marburg.

4.2.1 Wildtyp-Mäuse

Es handelte sich um einen C57BL/6-Inzuchtstamm, der von der Harlan Laboratories GmbH (Eystrup, Deutschland) käuflich erworben wurde.

4.2.2 TNF-α-transgene Mäuse

Die verwendeten TNF-α-transgenen Mäuse besaßen einen C57BL/6-Hintergrund und zeichneten sich durch eine moderate neuronale TNF-α-Überexpression in den Regionen des zerebralen Cortex, Striatums, Thalamus sowie Hippocampus aus (MARCHETTI et al., 2004). Die selektive regionale Überexpression basiert auf dem Verteilungsmuster des Promoters: der NR2B-Untereinheit des neuronalen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors (WATANABE et al., 1993). Die offizielle Bezeichnung dieser Mäuse entsprechend der Nomenklatur nach den *"Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat*" lautet *C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK*. Die TNF-α-transgenen Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Ulrich L. M. Eisel, Faculty of Science and Engineering, GELIFES — Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences, Niederlande, überlassen. Das Transgenkonstrukt ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Transgen-Konstrukts der TNF-α-transgenen Mauslinie nach MARCHETTI et al. (2004)



Die blauen Kästen stellen die Exons 1 – 3 der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors dar, welche mit dem Gen des murinen TNF-a (grüne Kästen) verbunden wurde und einen Teil von dessen 5⁻- untranslatierter Region (5⁻-untranslated region, 5⁻UTR) ersetzt. Für den Zweck der Stabilisation des Genproduktes wurde die 3⁻UTR des murinen TNF-a-Gens größtenteils durch das humane ß-Globulin-Gen (rote Kästen) ersetzt.

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor; NR2B: Untereinheit des NMDA-Rezeptors, involviert in dessen Modulation; TNF-a: Tumornekrosefaktor-a

4.2.3 TNFR1-knockout-Mäuse

Der Ersatz der Exons 2 und 3 sowie eines Teiles von Exon 4 des TNFR1 durch eine neo (*neomycin resistance*)-Kassette bewirkt eine fehlende Kodierung für die Zystein-reichen Domänen des Rezeptors, welche für die Ligandenbindung und somit die Funktion des Rezeptors von essentieller Bedeutung sind. Das Transgenkonstrukt ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt. TNFR1-k.o.-Mäuse zeigen keinen spontanen Phänotyp, reagieren aber weniger sensitiv auf Lipopolysaccharid-Injektionen und sind anfälliger für Infektionen mit Listeria monozytogenes (ROTHE et al., 1993). Die TNFR1-k.o.-Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Ulrich L. M. Eisel, Faculty of Science and Engineering, GELIFES - Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences, Niederlande, überlassen. Die offizielle Bezeichnung dieser Mauslinie lautete B6.129P2-Tnfrsf1a^{tm1Bit}/GI.

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts der TNFR1-k.o.-Mäuse nach ROTHE et al. (1993)



Ersatz der Exons 2, 3 und teilweise 4 des TNFR1 durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette (Neo). Die grünen Boxen symbolisieren die jeweiligen Exone, die blaue Box die Neomycin-Resistenz-Kassette.

4.2.4 TNFR2-knockout-Mäuse

Die Generierung von TNFR2-k.o.-Mäusen basierte ebenfalls auf der Insertion einer Neomycin-Resistenz-Kassette in das Exon 2 des TNFR2-Gens. Diese Mauslinie zeichnet sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber TNF-α aus, was sich in einer reduzierten Gewebsnekrose nach entsprechender Injektion sowie in einer verminderten Mortalität nach systemischer TNF-α-Applikation äußert (ERICKSON et al., 1994). Eine schematische Darstellung des Transgenkonstrukts zeigt Abbildung 9. Die TNFR2-k.o.-Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Ulrich L. M. Eisel, Faculty of Science and Engineering, GELIFES - Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences, Niederlande, überlassen. Die offizielle Bezeichnung dieser Mauslinie lautet B6.129S2-Tnfrsf1b^{tm1Mwm}/GI.

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts der TNFR2-k.o.-Mäuse nach ERICKSON et al. (1994)



Einsatz einer Neomycin-Resistenz-Kassette (Neo) in das Exon 2 des TNFR2. Die grünen Boxen symbolisieren die jeweiligen Exone (I-XI), die blaue Box die Neomycin-Resistenz-Kassette.

4.2.5 Analyse des transgenen Status der Mäuse

Sämtliche in den *In-vivo*- und *In-vitro*-Untersuchungen verwendeten Mäuse wurden mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. einer quantitativen PCR (qPCR) auf ihren Genotyp hin untersucht. In der Folge konnten die Tiere als homozygote C57BL/6-Tiere (*"Wildtyp"*, wt/wt), homozygot TNF-α-transgen (tg/tg), heterozygot TNF-α-transgen (tg/wt), homozygot TNFR1-k.o. (TNFR1-k.o.) oder homozygot TNFR2-k.o. (TNFR2-k.o.) identifiziert werden. Da die TNFR1- bzw. TNFR2-k.o.-Tiere strikt innerhalb ihrer Mauslinie verpaart wurden, wurden hier keine heterozygoten Tiere erzeugt. Die einzelnen Methoden sind detailliert im Weiteren beschrieben.

4.2.5.1 Analyse des transgenen Status der TNF-α-transgenen und Wildtyp-Mäuse

Die Bestimmung des transgenen Status der TNF-α-transgenen und Wildtyp-Mäuse erfolgte mittels relativer Quantifizierung mit einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Hierzu wurde mit Hilfe des Puregene[®] Core Kit A (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben aus Mausschwänzen DNA isoliert und in die qPCR eingesetzt. Für die relative Quantifizierung wurde die Amplifikation des TNF-α-Gens im Vergleich zur Amplifikation des so genannten Referenzgens, in diesem Fall das Gen für die Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-

Dehydrogenase (GAPDH), auf der Basis der jeweiligen *threshold cycle* (ct-Wert; Zyklus, an dem die Amplifikationskurve des jeweiligen Gens einen bestimmten Schwellenwert überschreitet), betrachtet. Die Differenz dieser beiden Ct-Werte des zu identifizierenden Tieres ergab den sogenannten Δ ct-Wert des zu identifizierenden Tieres (Δ ct_{unb}). Im Folgenden wurde nun die Differenz des Δ ct_{unb} zu dem Δ ct-Wert eines so genannten Kalibrators (Δ ct_{Kal}) ermittelt. Als Kalibrator diente die DNA eines homozygot TNF- α -transgenen Tieres. Durch folgende Berechnungen (siehe Formel 1) konnte so die relative Quantität des zu untersuchenden Gens, hier TNF- α (*gene of interest, GOI*), ermittelt werden.

Formel 1: Formel zur Berechnung der relativen Quantität des Zielgens

 $ct_{GOI} - ct_{REF} = \Delta ct$ $\Delta ct_{unb} - \Delta ct_{Kal} = \Delta \Delta ct$ Relative Quantität des GOI: 2 - $\Delta \Delta ct$

ct: threshold cycle; Δct_{unb}: Δct des zu identifizierenden Tieres; Δct_{Kal}: Δct des Kalibrators; GOI: gene of interest (hier: TNF-α); REF: Referenzgen (hier: Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH))

Um auch vergleichbare Amplifikationswerte der verschiedenen Gene zu erhalten, müssen die Effizienzen der verschiedenen Gene ähnlich sein und circa 2 betragen. In jedem Lauf wurden neben DNA-Proben eines homozygot TNF-α-transgenen Tieres als Kalibrator, DNA eines heterozygot TNF-α-transgenen Tieres (tg/wt) sowie eines Wildtyptieres (wt/wt) als zusätzliche Kontrollen mitgeführt. Eine Probe, bei der die DNA durch steriles Wasser ersetzt wurde, diente als Negativkontrolle und wurde in jedem Lauf mitgeführt. Sämtliche zu untersuchende Proben und Kontrollen wurden im Doppelansatz in jedem Lauf gemessen. Entsprechend vorausgegangener Arbeiten von KRAMER bzw. KRAMER et al. (2006: 2012). SCHAUDIEN (2007) und HIRZ (2017) wurden Tiere mit einer relativen Quantität von 0.0 als nicht-transgen (wt/wt). Werte von 0,3 - 0,7 als heterozygot (tg/wt) und $\geq 0,8$ als homozygot transgen (tg/tg) eingestuft. Die qPCR erfolgte mit Hilfe des real-time PCR-Cycler Rotor-Gene® (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend der Rotor-Gene® Series Software (Qiagen GmbH, Hilden) und unter Verwendung des Rotor-Gene® SYBR® Green Kits (Qiagen GmbH, Hilden). Um die Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenzen zu kontrollieren, wurde im Anschluss an jeden Lauf eine Schmelzkurvenanalyse in einem Temperaturbereich von 72 °C bis 95°C durchgeführt. Bei iedem Schritt wurde die Temperatur um 1° C erhöht.

Die verwendeten Primerpaare, der Reaktionsansatz, die Reaktionsschritte sowie -bedingungen sind in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

47

Bezeichnung	Sequenz	Amplikonlänge	GenBank Acc. No.
Sense NMDAtg42	5`-CTG GAT ATT CCC AAC ATG CG-3`	251 bp	TNF-Trans-
Antisense mTNFseq3	5`-CCC CGA ACG TCA GTA GAC AG-3`	201.00	gen- konstrukt
Sense murines GAPDH	5`-GAG GCC GGT GCT GAG TAT GT-3`	288 hn	CI: 6670026
Antisense murines GAPDH	5`-GGT GGC AGT GAT GGC ATG GA-3`	200 00	GI: 00/9930

bp: Basenpaare; GAPDH: Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; GenBank Acc. No.: GenBank Accession Nummer; NMDAtg42 + mTNFseq3: Primerpaar zum Nachweis von transgenem TNF-α; TNF-α: Tumornekrosefaktor-alpha

Tabelle 2: Reaktionsansatz der qPCR

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen	Konzentration in 25 μl		
	Mastermix-Ansatz	Z			
SYBR [®] Green MM Puffer	2 x	12,50 µl	1 x		
sense-Primer	100 µM	0,25 µl	1000 nM		
antisense-Primer	100 µM	0,25 µl	1000 nM		
Wasser		11,00 µl			
qPCR-Ansatz					
Mastermix	-	24,00 µl	1 x		
DNA	-	1,00 µl	80 ng/µl		
Gesamt	-	25,00 µl	-		

DNA: Desoxyribonukleinsäure; qPCR: quantitative Polymerasekettenreaktion; SYBR[®] Green MM Puffer: Bestandteil des Rotor-Gene[®] SYBR[®] Green Kits (Qiagen GmbH, Hilden)

Tabelle 3: Reaktionsschritte der qPCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95° C	5 min	-
Denaturierung	95°C	5 s	
Annealing (Primeranlagerung)	60° C	10 s	40
Elongation	60° C	10 s	

4.2.5.2 Analyse des transgenen Status der TNFR1- bzw. TNFR2-k.o.-Mäuse

Die DNA-Isolation für die Bestimmung des Genotyps der TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Mäuse wurde mit dem Puregene[®] Core Kit A (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben aus Mausschwanzteilen durchgeführt.

Die Untersuchung des TNFR1-Genotyps erfolgte in 2 separaten PCRs: Zunächst wurde mit

dem Primerpaar TNFR1-2883 + TNFR1-4938 (siehe Tabelle 4) auf den TNFR1 des Wildtyps untersucht. Die andere PCR diente dem Nachweis der Neomycin-Resistenz-Kassette der *knockout*-Tiere, dazu wurde das Primerpaar Neolnt und Neo34 (siehe Tabelle 4) eingesetzt. Die Reaktionsansätze beider PCRs sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die Untersuchung des TNFR2 erfolgte im Rahmen einer Multiplex-PCR, bei der ein Primerpaar (TNFR2neuA und TNFR2neuB, siehe Tabelle 4) dem TNFR2-Nachweis des Wildtyps diente, während das zweite Primerpaar (NeoInt und Neo34, siehe Tabelle 4) die Neomycin-Resistenz-Kassette detektieren sollte. Ein jeweils sicher heterozygot getestetes TNFR1-k.o. bzw. TNFR2-k.o.-Tier diente als Positivkontrolle für den Wild- bzw. jeweiligen knockout-Phänotyp. Eine mit sterilem Wasser anstelle von *template*-DNA mitgeführte Reaktion bildete die Nega-tivkontrolle bei jedem Lauf. Den Reaktionsansatz der Multiplex-PCR zeigt Tabelle 6. Die Bedingungen sämtlicher PCRs zur Genotypisierung der k.o.-Mäuse entsprechen den in der folgenden Tabelle 7 dargestellten Angaben.

Die PCR-Produkte wurden hinsichtlich ihrer spezifischen Längen im Rahmen einer Gel-Elektrophorese auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und nach ca. 1 h kontrolliert und mit den jeweiligen Positivkontrollen abgeglichen. Die Visualisierung der Banden der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des DNA-Färbereagenz Midori Green Advance (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) unter UV-Licht bei 312 nm in einem UV-Transluminator (Vilber Loumant, Torcy, Frankreich).

Bezeichnung	Sequenz	Amplikon- länge	GenBank Acc. No.
Sense TNFR1-2883	5`-CTC TCT TGT GAT CAG CAC TG-3`	512 bp NM 011	
Antisense TNFR1-4938	5`-AGA AAT CTC AAG ACA ATT CTC TGC-3`		
Sense TNFR2neuA	5`-AGT GGC CCT GGT CCT TCC CG-3`	437 bp NM 011610	
Antisense TNFR2neuB	5`-GGA GCC ACC GCT GCC CCT AT-3`		
Sense NeoInt	5`-CGC CAA CCG GCT CCG TTC TT-3`	660 bp	
Antisense Neo34	5`-TCC CGC TTC AGT GAC AAC GTC-3`	bb	sistance-Kas- sette

Tabelle 4: Verwendete Primer der Multiplex-PCR zum Nachweis des TNFR1, TNFR2 sowie der Neomycin-Resistance-Kassette

GenBank® Acc. No.: GenBank Accession Nummer; NeoInt + Neo34: Primerpaar zur Detektion der Neomycin-Resistenz-Kassette

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen in 15 µl	Konzentration in 15 μl
Qiagen Multiplex- PCR-Mastermix	2 x	7,9 µl	1 x
Waaaa		4,5 µl ª	_
wasser	-	4,3 µl ^b	
Sense TNFR1-2883	10 pmol/µl	0,9 µI ^ь	0,6 pmol/µl
Antisense TNFR1-4938	10 pmol/µl	0,9 µl ^ь	0,6 pmol/µl
Sense NeoInt	10 pmol/µl	0,8 µl ª	0,5 pmol/µl
Antisense Neo34	10 pmol/µl	1 µl ª	2 ng/µl

Tabelle 5: Reaktionsansatz der PCRs zur Bestimmung des TNFR1-Status

^a PCR zur Untersuchung auf den TNFR1 des Wildtyps (mit Hilfe des Primerpaars TNFR1-2883 und TNFR1-4938);

^b PCR zur Untersuchung auf die Neomycin-Resistenz-Kassette (mit Hilfe des Primerpaars Neolnt und Neo34); beide PCRs wurden separat durchgeführt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR zur Bestimmung des TNFR2-Status

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen in 15 µl	Konzentration in 15 µl
Qiagen Multiplex- PCR-Mastermix	2 x	7,9 µl	1 x
Wasser	-	3,7 µl	-
Sense TNFR2neuA	10 pmol/µl	0,3 µl	0,2 pmol/µl
Antisense TNFR2neuB	10 pmol/µl	0,3 µl	0,2 pmol/µl
Sense NeoInt	10 pmol/µl	0,9 µl	0,6 pmol/µl
Antisense Neo34	10 pmol/µl	0,9 µl	0,6 pmol/µl
DNA-template	-	1 µl	2 ng/µl

DNA: Desoxyribonukleinsäure; PCR: polymerase chain reaction

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95° C	15 min	-
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing (Primeranlagerung)	65° C	60 s	35
Elongation	72° C	90 s	
Finale Elongation	72° C	10 min	-
Kühlung	4° C	bis zum Zeitpunkt der Probenent- nahme	-

Tabelle 7: Reaktionsschritte der verschiedenen PCRs zur Genotypisierung der Mäuse

4.3 Umgang mit virus-infiziertem und genetisch verändertem Material

Gemäß der Vorgaben der Biostoff-Verordnung (BioStoffV) vom 15. Juli 2013 (BGBI, I S.2514: zuletzt geändert durch Artikel 146 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBI. I S. 626)), des Gentechnikgesetzes (GenTG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBI, I S.2066: zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 17. Juli 2017 (BGBI, I S. 2421)), der Gentechnik-Sicherheitsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. März 1995 (BGBI. I S. 297; zuletzt geändert durch Artikel 57 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBI. I S. 1474)), der Verordnung über Aufzeichnungen bei gentechnischen Arbeiten und bei Freisetzungen (Gentechnik-Aufzeichnungsverordnung - GenTAufzV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. November 1996 (BGBI. I S. 1647; zuletzt geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 28. April 2008 (BGBI. I S. 766)) und der Betriebsanweisung des Institutes für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden Maßnahmen ergriffen. um eine Gefährdung der versuchsdurchführenden Personen und der Umwelt zu verhindern. Die Arbeiten mit BoDV-1 unterliegen, nach Einschätzung des Regierungspräsidiums Gießen, der Sicherheitsstufe 2 der Biostoff-Verordnung. Nach dem Auftreten mehrerer Fälle schwerer Enzephalitiden bei Menschen, die auf eine BoDV-1-Infektion zurückgeführt werden konnten (KORN et al., 2018), wurde die Zuordnung des BoDV-1 in die Sicherheitsstufe 2 durch die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS) neu überdacht, jedoch zunächst beibehalten. Bei der Haltung BoDV-1-infizierter Nager muss nun jedoch auf individuell ventilierte Käfige zurückgegriffen werden und ein Umsetzen der Tiere unter Käfigwechselstationen erfolgen (IBROM, 2019).

Die TNF-α-transgenen, TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Mauslinien sowie die daraus gewonnenen Zellen sind der Sicherheitsstufe 1 nach Gentechnik-Gesetz zuzuordnen. Bei Vorliegen von 2 verschiedenen Sicherheitsstufen ist immer die höhere zu beachten, so dass die allgemeinen Schutzmaßnahmen der Sicherheitsstufe 2 der Biostoff-Verordnung befolgt wurden.

4.4 In-vivo-Untersuchungen

4.4.1 Immunhistologische Untersuchungen (IHC)

4.4.1.1 Immunhistologischer Nachweis von Lipocalin-2-Antigen im murinen ZNS

Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gehirngewebe von nicht- bzw. mock- oder BoDV-1-infizierten Mäusen der verschiedenen Linien wurde immunhistologisch auf das Vorhandensein von Lipocalin-2-Antigen untersucht. Die Formalin-fixierten Gehirne wurden bereits im Rahmen des Tierversuchsvorhabens zunächst in der Medianen und anschließend an 3 Lokalisationen transversal geschnitten, wie Abbildung 10 darstellt. Eine Hälfte des Gehirnes wurde bei – 80° C tiefgefroren, während die andere in Paraffin eingebettet und zu Gewebeschnitten für (immun-)histologische Untersuchungen prozessiert wurde. Die Areale von Striatum (kranial), Striatum (kaudal), zerebraler Frontalcortex (lateral), Thalamus, Hippocamus, Kleinhirn und Medulla oblongata konnten somit auf insgesamt 4 Paraffinschnitten dargestellt und untersucht werden.



Abbildung 10: Darstellung der Schnittebenen der Formalin-fixierten Mäusegehirne

Die schwarzen Balken geben die Transversalebenen gemäß der Angaben von PAXINOS und WATSON (1986) an, in denen die Gehirne geschnitten wurden. Von den Schnittflächen der Teilstücke I bis IV (►) wurden dann Paraffinschnitte angefertigt.

Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht der immunhistologisch hinsichtlich der zerebralen Lcn2-Expression untersuchten Tiere der verschiedenen Gruppen.

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
	V382/12		V100/11
	V406/12	V110/13	V99/11
21 dpi	V440/12	V111/13	V98/11
	V59/13		V97/11
	V112/13		V95/11
	V75/13		V5/12
	V77/13	V122/13	V128/11
42 dpi	V82/13	V123/13	V124/11
	V83/13		V123/11
	V87/13		V106/11
49 dpi	V126/13		
	V129/13		

Tabelle 8: Übersicht der immunhistologisch untersuchten Wildtyp-Mäuse

Tabelle 9: Übersicht der immunhistologisch untersuchten homozygoten $\mathsf{TNF}\text{-}\alpha\text{-}\mathsf{transgenen}$ Mäuse

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
	V435/12		V3/11
	V436/12	140040	V1/11
21 dpi	V438/12	V100/13	V22/10
	V439/12	V140/13	V19/10
	V60/13		V18/10
	V72/13		V6/12
	V74/13	V118/13	V127/11
42 dpi	V76/13	V179/13	V126/11
	V80/13		V125/11
	V84/13		V120/11
40 stat	V130/13		
49 api	V131/13		

Tabelle 10: Übersicht der immunhistologisch untersuchten heterozygoten TNF- α -transgenen Mäuse

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
	V381/12		V20/10
	V404/12	1/107/12	V21/10
21 dpi	V437/12	V107/13 V109/12	V2/11
	V441/12	V21/12	
	V57/13		V22/12
	V86/13		V4/12
	V89/13 V120/13 42 dpi V96/13 V120/13	V200/12	
42 dpi		V 120/13	V201/12
	V98/13	V121/13	V202/12
	V99/13		V205/12

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
	V286/14		V238/12
	V287/14	1/212/14	V239/12
21 dpi	V288/14	V312/14	V240/12
	V289/14	V313/14	V302/14
	V290/14		V303/14
	V256/14		V259/12
	V257/14 V331/14 42 dpi V258/14 V330/14	1/221/14	V260/12
42 dpi		V328/14	
	V259/14	V332/14	V329/14
	V260/14		V330/14

Taballa	44.116	مؤما والمربية والمراجع	1	THEDA LA MAUSA
rapelle	TT: Upersignt	der immunnisto	ioaisch untersuchte	n INFRI-K O-Wause
lasono		aor minimarino to	logioon antoroaonto	

Tabelle 12: Übersicht der immunhistologisch untersuchten TNFR2-k.o.-Mäuse

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
	V45/14		V241/12
	V46/14	1/212/14	V242/12
21 dpi	V47/14	V212/14 V213/14	V246/12
	V48/14		V211/12
	V49/14		V216/12
	V64/14		V399/12
	V65/14	V261/14	V400/12
42 dpi	V66/14	V262/14	V401/12
	V204/14		V402/12
	V205/14		V403/12

Weiterhin wurden 6 weitere Tiere untersucht, die vorzeitig verstarben oder euthanasiert werden mussten. Eine Übersicht über diese Tiere ist in Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 13: Übersicht	über vorzeitig	verstorbene oder	euthanasierte	Mäuse
-----------------------	----------------	------------------	---------------	-------

Tier	Alter	Mauslinie	Infektionsstatus
V67/14	30 dpi	TNFR2-k.o.	BoDV-1
V63/14	37 dpi	TNFR2-k.o.	BoDV-1
V306/14	40 dpi	TNFR2-k.o.	BoDV-1
V361/14	29 dpi	TNFR1-k.o.	BoDV-1

BoDV-1: Borna disease virus 1, dpi: days post infectionem, TNFR1-k.o.; Tumornekrosefaktorrezeptor 1-knockout, TNFR2-k.o.; Tumornekrosefaktorrezeptor 2-knockout

Die Prozessierung der jeweiligen Gewebeschnitte wurde – wie im Folgenden beschrieben – durchgeführt. Für jeden zu testenden Gewebeschnitt wurde parallel eine entsprechende Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle des Primärantikörpers mit 1 x TBS (*tris-buffered saline*) inkubiert wurde. Zudem wurde in jedem Durchgang eine Positivkontrolle mitgeführt, um falschnegative Ergebnisse zu verhindern und sich der Funktionalität der Methode zu vergewissern. Dabei handelte es sich um die ZNS-Gewebeschnitte von BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen 49 d alten Mäusen (V131/13; V130/13), bei denen in Vorversuchen Lcn2 in der IHC nachgewiesen wurde.

Die in der Immunhistologie (inklusive der im folgenden Kapitel 4.4.1.3 beschriebenen Doppelmarkierung) verwendeten Antikörper sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Antikörper	Bezugs- quelle	Blocking- Agenz	Vorbe- handlung	Sekundär- antikörper	Bezugsquelle des Sekundäranti- körpers	Detek- tions- system
Lcn2 (Ziege, po- lyklonal)	Biotechne R&D Sys- tems, Wies- baden	10 %iges bo- vines Serumal- bumin	Proteinase	Pferd anti- Ziege	Vector Laboratories, Burlingame, USA	ABC
GFAP (Kaninchen, polyklonal)	Dako, Glos- trup, Däne- mark	20 %iges Schweineserum	-	Schwein anti-Kanin- chen	Dako, Glostrup, Dä- nemark	PAP

Tabelle 14: In der immunhistologischen Untersuchung verwendete Antikörper

ABC: Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, USA); GFAP: Glial fibrillary acid protein; Lcn2: Lipocalin-2; PAP: Peroxidase anti Peroxidase (Dako, Glostrup, Dänemark)

- Nach dem Schneiden ca. 1 µm dicker Paraffinschnitte wurden diese auf Superfrost[®] Plus-Objektträger (R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen) aufgezogen und anschließend für mind. 30 min im Wärmeschrank bei 60° C getrocknet. Das Material wurde anschließend direkt verwendet oder lichtgeschützt im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.
- Zunächst wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert: Die Schnitte wurden für 3 x 3 min in Roti[®]-Histol (Xylolersatzmittel; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), 2 x 3 min Isopropanol, 3 min 96 %igem Ethanol und 3 min in 80 %igem Ethanol inkubiert.
- Die Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität erfolgte in einer 0,05 %igen Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung, welche durch Zugabe von 3 ml 30 %igem Wasserstoffperoxid zu 177 ml Methanol erzeugt wurde. Im Anschluss daran wurden die Objektträger für 5 min in TBS gewaschen.
- 4. Für den Zweck der Antigen-Demaskierung wurden die Objektträger zunächst für 30 min bei 37° C im Wärmeschrank in einer NaCI-PBS-Lösung inkubiert, um dann 5 mg Proteinase (Typ XXIV; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) pro 10 ml NaCI-PBS hinzuzufügen und für 5 min zu inkubieren.
- 5. Dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit eiskaltem TBS diente dem Abstoppen der

Reaktion. Die Objektträger wurden schließlich aus den bisher verwendeten Küvetten entnommen und mit der Gewebe-tragenden Seite an zuvor mit TBS befeuchtete Shandon Coverplates[™] (Thermo Scientific, Runcorn, United Kingdom) angelegt und mit diesen in Cassette Racks (Thermo Scientific, Runcorn, United Kingdom) eingesetzt.

- 6. Als Blockingagenz diente eine 10 %ige bovine Serum Albumin (BSA, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA)/TBS-Lösung, welche für 10 min mit einer Menge von jeweils 100 µl in den kapillären Spalt zwischen Coverplate[™] und Objektträger appliziert wurde.
- 7. Der polyklonale Ziege anti-Lipocalin-2-Primärantikörper (Biotechne R&D Systems, Wiesbaden) wurde 1:100 in 1%igem BSA/PBS verdünnt und jeweils mit 100 µl zwischen Coverplate[™] und Objektträger aufgetragen. Entsprechende Negativkontrollen wurden lediglich mit PBS inkubiert. Sämtliche Objektträger wurden über Nacht bei 4° C im Kühlschrank gelagert.
- Nach 3-maligem Waschen f
 ür jeweils 5 min in TBS wurde am folgenden Tag der Biotingekoppelte Pferd anti-Ziege-Sekund
 ärantik
 örper (Vector Laboratories, Burlingame, USA), welcher 1:100 in 1 % BSA/PBS verd
 ünnt worden war, mit jeweils 100 µl f
 ür 1 h bei Raumtemperatur zwischen Coverplate[™] und Objekttr
 äger aufgetragen.
- Durch 3-maliges Waschen mit TBS f
 ür 5 min wurde nicht gebundener Sekund
 ärantik
 örper von den Objekttr
 ägern entfernt.
- Der Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain® ABC Kit Peroxidase Standard: Vector Laboratories, Burlingame, USA) wurde bereits mind. 30 min vor Gebrauch durch Zugabe von 9 µl der Avidin- und 9 µl der Biotin-Lösung ad 1000 µl TBS angesetzt. 100 µl der Gebrauchslösung wurden dann in den Spalt zwischen Coverplate[™] und Objektträger pipettiert und für 30 min inkubiert.
- Durch 3-maliges Waschen mit TBS f
 ür 5 min wurden nicht gebundene Avidin-Biotin-Komplexe von den Objekttr
 ägern entfernt und diese in eine Glask
 üvette
 überf
 ührt.
- 12. Eine anschließende 6-minütige lichtgeschützte Inkubationsphase in einer 0,1 M Imidazol/HCI-Pufferlösung (pH: 7,08) mit Zusatz von 0,05 % 3,3 -Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 0,01 % Wasserstoffperoxid resultierte in einer Farbreaktion und der Detektierbarkeit des untersuchten Antigens.
- 13. Nach 5-minütiger Inkubation in Aqua dest. wurden die Objektträger für 5 min in Kardasewitsch-Lösung inkubiert, um Formalinpigmente weitestgehend aus dem Gewebe zu entfernen und anschließend zweimalig für jeweils 2,5 min in Aqua dest. gewaschen.
- 14. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte für 10 bis 20 s in die Papanicolaous-Hämatoxylin-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) getaucht und anschließend kurz in Aqua dest. und schließlich für 5 min in lauwarmem Leitungswasser gebläut.

- Nach 5 minütigem Waschen in Aqua dest. wurden die Objektträger für jeweils 3 min durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt, welche aus 50 %igem, 70%igem Ethanol, 2 Küvetten Isopropanol sowie 3 Küvetten Roti[®]-Histol besteht.
- 16. Abschließend wurden die Objektträger im Eindeckautomaten (Tissue-Tek[®] Coverslipper, Sakura Finetek, Japan) mit Xylol und Eindeckfolie (Tissue-Tek[®] SCA[™], Sakura Finetek, Japan) luftblasenfrei eingedeckt.

4.4.1.2 Auswertung der immunhistologischen Untersuchung

Die Beurteilung der Signale von Lcn2 erfolgte mit Hilfe eines Leica 750DM Mikroskops (Leica GmbH, Wetzlar). Für die quantitative Auswertung wurden jeweils 5 Gesichtsfelder in der 200fachen Vergrößerung pro Gehirnareal quantitativ hinsichtlich der Anzahl der Lcn2-exprimierenden Gliazellen ausgezählt. Das Verhältnis der verschiedenen Lcn2-positiven Subpopulationen, zum Beispiel Astrozyten und Mikrogliazellen wurde abgeschätzt. Falls andere Zellen, zum Beispiel Endothelzellen oder Ependymzellen der Gehirnventrikel, Lcn2 aufwiesen, wurden diese vermerkt, jedoch nicht ausgezählt. Als positiver Nachweis von zellulärem Lcn2 wurde das Vorkommen von einem braunen, granulären bis scholligen Farbniederschlag im Zytoplasma gewertet.

Ferner wurde die Lcn2-Sekretion untersucht, welche sich durch eine keinem Zellkörper zuzuordnende, schwach bis intensiv-bräunliche Färbung des Neuroparenchyms auszeichnete und daher anhand der unterschiedlichen Farbintensitäten semiquantitativ ausgewertet wurde. Das Bewertungsschema mit den verschiedenen *scores* ist in Abbildung 16 näher dargestellt. Die parallele Prozessierung der Schnitte in einer einzigen immunhistologischen Färbung ermöglichte die vergleichende Betrachtung des sezernierten Lcn2. Folgende Hirnareale wurden untersucht:

- I. Striatum (kranial)
- II. Striatum (kaudal)
- III. Frontalcortex (lateral)
- IV. Hippocampus
- V. Thalamus
- VI. Klein- und Stammhirn

4.4.1.3 Immunhistologische Doppelmarkierung zum Nachweis von Lipocalin-2und GFAP-Antigen

Der vornehmlich astrozytäre Ursprung der Lipocalin-2-Expression und -Sekretion sollte im Rahmen einer immunhistologischen Doppelmarkierung zur Lcn2- und GFAP-Detektion an den Gehirn-Paraffinschnitten eines TNF-α-transgenen 42 dpi untersuchten BoDV-1-infizierten Tieres (V128/13) demonstriert werden. Die Lcn2-Detektion erfolgte erneut mit Hilfe der oben genannten Primär- und Sekundärantikörper sowie der beschriebenen Farbreaktion, so dass das immunhistologische Protokoll dem bereits beschriebenen bis einschließlich Schritt 12 entspricht. Im Anschluss wurde wie folgt verfahren:

- Die Schnitte wurden 3-malig in TBS gewaschen und erneut in Shandon Racks[®] eingesetzt.
- 14. Durch eine 10-minütige Inkubation in 20 %igem Schweineserum in TBS sollte die unspezifische Antikörperbindung reduziert werden (sogenanntes *Blocking*).
- 15. Der im Verhältnis 1:500 in einer 1 %igem BSA-TBS-Lösung verdünnte polyklonale Kaninchen anti-GFAP-Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) wurde mit jeweils 100 µl in den Spalt zwischen Coverplate[™] und Objektträger aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert.
- 16. Dreimaliges Waschen in TBS erfolgte zum Abwaschen von ungebundenem Primärantikörper.
- 17. Es folgte das Auftragen von jeweils 100 µl des 1:100 in einer 1 %igem BSA-TBS-Lösung verdünnten Schwein anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers (Dako, Glostrup, Dänemark) welcher für 30 min inkubiert wurde.
- 3-maliges Waschen in TBS erfolgte zum Abwaschen von ungebundenem Sekundärantikörper.
- Anschließend wurde der Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) 1:600 in einer 1 %igen BSA-TBS-Lösung verdünnt für 30 min inkubiert0.
- Dreimaliges Waschen in TBS erfolgte zum Abwaschen von ungebundenem Tertiärantikörper.
- 21. Die Objektträger wurden aus den Shandon Racks[®] entnommen und die Gewebestücke mit einem PapPen[®]-Stift umrahmt, um die Persistenz eines Flüssigkeitstropfens auf dem Zielgewebe zu gewährleisten.
- 22. Die Detektion von GFAP-Antigen erfolgte mit Hilfe des HistoGreen-Substratkits (Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim). Durch Mischen von 1 ml HistoGreen-Puffer mit 2 Tropfen HistoGreen-Chromogen und 2 Tropfen Wasserstoffperoxid wurde die

Gebrauchslösung zur chromogenen Antigendetektion frisch hergestellt, in ausreichender Menge direkt auf die liegenden Gewebeschnitte aufgetragen und für 2 - 3 min inkubiert.

- 23. Die Schnitte wurden dann 5 min in TBS und 30 s in Aqua dest. gewaschen.
- 24. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte für 10 bis 20 s in die Papanicolaous-Hämatoxylin-Lösung getaucht und anschließend kurz in Aqua dest. und schließlich für 5 min in lauwarmem Leitungswasser gebläut.
- 25. Nach 5-minütigem Waschen in Aqua dest. wurden die Objektträger für jeweils 3 min durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt, welche aus 50 %igem, 70%igem Ethanol, 2 Küvetten Isopropanol sowie 3 Küvetten Xylol besteht.
- 26. Abschließend wurden die Objektträger im Eindeckautomaten (Tissue-Tek[®] Coverslipper, Sakura Finetek, Japan) mit Xylol und Eindeckfolie (Tissue-Tek® SCA[™], Sakura Finetek, Japan) luftblasenfrei eingedeckt.

4.4.1.4 Auswertung der immunhistologischen Doppelmarkierung

Die Doppelmarkierung zur Darstellung von GFAP und Lcn2 wurde nicht quantitativ ausgewertet, sondern mit Hilfe des Mikroskops Eclipse 80i und der Software NIS-Elements Software BR 3.10, SP3 (Nikon GmbH, Düsseldorf) histologisch hinsichtlich der astrozytären Lcn2- und GFAP-Expression evaluiert und fotographisch dokumentiert.

4.4.2 In-situ-Hybridisierung (ISH)

Der Nachweis von Lipocalin-2-spezifischer mRNA erfolgte durch spezifische RNA-Sonden in Anlehnung an das bei ZURBRIGGEN et al. (1993) beschriebene und durch POROMBKA (2006) modifizierte Protokoll. Verwendet wurden sense- und antisense-Sonden, wobei lediglich die antisense-Sonde eine der Ziel-mRNA komplementäre RNA-Sequenz aufweist und somit detektierbar sein sollte. Die sense-Sonde diente primär als Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen der Sonden. Ein weiterer Gewebeschnitt, welcher nicht mit den Sonden inkubiert wurde, wurde weiterhin als Negativkontrolle für jeden Gewebeschnitt mitgeführt. Die Detektion gebundener Sonden erfolgte mittels gegen Digoxigenin-gerichteter, an eine alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper. Die chromogene Detektion der Antikörper wurde durch die enzymatische Umsetzung von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid und 5-Bromo-4chromo-3-indoxylphosphat durch die alkalische Phosphatase zu einem tiefschwarz-violettem Präzipitat ermöglicht.

4.4.2.1 Synthese der RNA-Sonden

Einen Überblick über die Arbeitsschritte der Sondenherstellung bietet das folgende Schema in Abbildung 11.



Abbildung 11: Schema des Arbeitsablaufes der Sondensynthese

dsDNA: doppelsträngige DNA; Fw: forward; PCR: polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion); Rev: reverse

Synthese der Matrizenstränge

Die Grundlage der RNA-Sonden-Synthese bildeten 2 synthetisch hergestellte Oligonukleotide (biomers, Ulm), deren Sequenzgrundlage die mRNA-Sequenz des murinen Lipocalin-2 (Genbank: X14607.1) darstellte. Während die Sequenz des ersten Oligonukleotids (im Weiteren als Oligo 1 bezeichnet) der Sequenz der Lipocalin-2-mRNA von Position 356 bis 492 entspracht, umfasste das komplementäre Oligonukleotid 2 (im Weiteren als Oligo 2 bezeichnet) die Sequenz der Lipocalin-2-mRNA von Position 256 bis 492 entspracht, umfasste das komplementäre Oligonukleotid 2 (im Weiteren als Oligo 2 bezeichnet) die Sequenz der Lipocalin-2-mRNA von Position 471 – 606. Die 21 nt lange überlappende komplementäre Sequenz der beiden Oligonukleotide ermöglichte im Rahmen einer PCR die Synthese und Amplifikation der gesamten Matrize für die Sondenherstellung der Lcn2-Sonden (Position 356 bis 606). Die Sequenzen der für die ISH-Sonden verwendeten Lcn2-mRNA, der 2 Oligonukleotide sowie der spezifischen Primer sind in Tabelle 15 aufgelistet. Der PCR-Reaktionsansatz ist in Tabelle 16 zu finden, die PCR-Bedingungen zeigt Tabelle 17.

Bezeichnung	Sequenz	Länge	GenBank Acc. No.
Lcn2-mRNA	5'-GGC CAG TTC ACT CTG GGA AAT ATG CAC AGG TAT CCT CAG GTA CAG AGC TAC AAT GTG CAA GTG GCC ACC ACG GAC TAC AAC CAG TTC GCC ATG GTA TTT TCC GAA AGA TTC TGA AAA CAA GCA ATA CTT CAA AAT TAC CCT GTA TGG AAG AAC CAA GGA GCT GTC CCC TGA ACT GAA GGA ACG TTT CAC CCG CTT TGC CAA GTC TCT GGG CCT CAA GGA CGA CAA CAT CAT CTT CTC TGT CCC CAC CGA-3'	250 bp	X14607.1
Oligo 1	5'-GGC AGT TCA CTC TGG GAA ATA TGC ACA GGT ATC CTC AGG TAC AGA GCT ACA ATG TGC AAG TGG CCA CCA CGG ACT ACA ACC AGT TCG CCA TGG TAT TTT TCC GAA AGA CTT CTG AAA ACA AGC AAT ACT TCA AAA-3'	135 bp	X14607.1, Pos.: 356- 492
Oligo 2	5'-TCG GTG GGG ACA GAG AAG ATG ATG TTG TCG TCC TTG AGG CCC AGA GAC TTG GCA AAG CGG GTG AAA CGT TCC TTC AGT TCA GGG GAC AGC TCC TTG GTT CTT CCA TAC AGG GTA ATT TTG AAG TAT TGC TTG TTT T-3'	135 bp	X14607.1, Pos.: 471- 606
Lcn2-Fw-Pri- mer	5'-GGC CAG TTC ACT CTG GGA AA-3`	20 bp	X14607.1, Pos.: 356- 375
Lcn2-Rev-Pri- mer	5`-TCG GTG GGG ACA GAG AAG AT-3`	20 bp	X14607.1, Pos.: 587- 606
M13-Fw-Pri- mer	5`-GTA AAA CGA CGG CCA G-3`	16 bp	

Tabelle 15: Übersicht über die Lcn2-mRNA als Ausgang der Generierung der RNA-Sonden sowie die entsprechenden Oligonukleotide

Die Nukleotide der überlappenden Region sind in der Tabelle rot markiert.

bp = Basenpaare; Fw: forward; GenBank Acc. No.: GenBank[®] Accession Nummer; Länge: Basenpaaranzahl der jeweiligen Sequenz; Lcn2-mRNA: mRNA-Sequenz, welche für die Sondenherstellung verwendet wurde; Pos.: Nukleotidlokalisation; Rev: reverse

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen in 25 µl	Konzentration in 20 μl
Qiagen Multiplex- PCR-Mastermix	2 x	12,5 µl	1 x
Wasser	-	9,5 µl	-
Lcn2-Fw	10 pmol/µl	0,5 µl	0,5 pmol/µl
Lcn2-Rev	10 pmol/µl	0,5 µl	0,5 pmol/µl
Oligo 1 (1:1000 ver- dünnt)	0,1 pmol/µl	1 µl	0,1 pmol/µl
Oligo 2 (1:1000 ver-	0,1 pmol/µl	1 µl	0,1 pmol/µl

Tabelle 16: Reaktionsansatz der PCR zur Synthese der Sondenmatrize

Fw: forward; Lcn2: Lipocalin-2; PCR: polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion); Rev: reverse

Tabelle 17: Reaktionsschritte der PCR zur Synthese der Sondenmatrize

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturie- rung	95° C	15 min	-
Denaturierung	94°C	15 s	
Annealing (Primeran- lagerung)	60° C	30 s	35
Elongation	72° C	60 s	
Finale Elongation	72° C	10 min	-
Kühlung	4° C	bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme	-

Das PCR-Produkt wurde hinsichtlich seiner spezifischen Länge im Rahmen einer Gel-Elektrophorese kontrolliert und anschließend mit Amicon[®] Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt.

Ligation der Sondenmatrize

Für die Ligation der Zielsequenz mit einem Plasmidvektor (pCR[™] 4-TOPO) wurde das TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (ThermoFischer Scientific, Waltham) verwendet. Der Plasmidvektor ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Reagenzien wurden entsprechend der in Tabelle 18 aufgeführten Mengen zusammengemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Komponente	Menge
Aufgereinigtes PCR-Produkt	2 μΙ
Wasser	2 µl
Salzlösung	1 µl
TOPO [®] Vektor	1 μΙ
Gesamt	6 µl

Tabelle 18: Reagenzien für die Ligation mit dem TOPO [®] TA Clonin	g® Ki	t
---	-------	---

Bis auf das PCR-Produkt stammen alle Reagenzien aus dem TOPO[®] TA Cloning[®] Kit.

Abbildung 12: Schematische Darstellung des pCR[™] 4-TOPO-Plasmidvektors (nach user guide des TOPO[®]Cloning[®] Kit for Sequencing; (Quelle: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcr4topo_map.pdf))



Die Abbildung zeigt eine Übersicht des verwendeten Plasmidvektors. Die multiple cloning site, welche nach der Ligation dem eingesetzten PCR-Produkt entspricht, wird von den Bindungsstellen für die M13-Primer und den Promotersequenzen der RNA-Polymerasen T3 bzw. T7 flankiert. Diese Polymerasen sind notwendig für die in-vitro Transkription.

Amplifikation der Sondenmatrizen

Das 1:10 000 in Aqua bidest. verdünnte Ligationsprodukt diente anschließend in einer PCR als Matrize (template), um die gewünschten Zielseguenzen für die In-vitro-Transkription zu erhalten. Die Wahl der Primerpaare bestimmte die Ausrichtung der synthetisierten DNA und somit der RNA-Sonden: Die Kombination des Plasmid-assoziierten M13-Forward (Fw)-Primers mit dem Lcn2-Forward-Primer in einer PCR resultierte in einem DNA-Strang, der im Rahmen der In-vitro-Transkription als template der antisense-Sonde diente: während der M13-Forward-Primer in Kombination mit dem Lcn2-Reverse (Rev)-Primer das template der sense.-Sonde diente. Das gewählte PCR-Programm entsprach ebenfalls den in Tabelle 17 dargestellten Angaben. Die verwendeten Primer und Mastermix-Komponenten sind in Tabelle 19 aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend hinsichtlich ihrer spezifischen Länge im Rahmen einer Gelelektrophorese kontrolliert und die restliche Menge mit Amicon[®] Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Ein Teil der aufgereinigten PCR-Produkte wurde zudem zur Sequenzierung zur Firma GATC Biotech (Konstanz) versandt und die analysierte Sequenz mit der gewünschten Zielseguenz abgeglichen. Nach Bestätigung der Seguenz wurden die aufgereinigten PCR-Produkte in der In-vitro-Transkription verwendet.

Tabelle 19: Reaktionsansatz der PCR zur Amplifikation der Sondenmatrizen au	s dem
Ligationsprodukt	

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen in 20 µl	Konzentration in 20 μl
Qiagen Multiplex- PCR-Mastermix	2 x	12,5 µl	1 x
Wasser	-	9,5 µl	-
M13-Fw	10 pmol/µl	0,5 µl	0,5 pmol/µl
Lcn2-Fw oder Lcn2-Rev	10 pmol/µl	0,5 µl	0,5 pmol/µl
Ligationsprodukt (1:10000 verdünnt)	-	2 µl	-

Fw: forward; Lcn2: Lipocalin-2PCR: polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion); Rev: re-verse
In-vitro-Transkription

Die *In-vitro*-Transkription erfolgte mit Hilfe des DIG-RNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und der T7-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Zuvor wurde der DNA-Gehalt der Amplifikationsprodukte der oben beschriebenen PCR mittels spektralphotometrischer Messung durch den Nanodrop 2000 (ThermoFischer Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Die Arbeitsschritte wurden in 1,5 ml Kunststoffgefäßen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) jeweils für die Herstellung der sense- bzw. antisense-Sonde durchgeführt unter Verwendung der in Tabelle 20 gelisteten Reagenzien.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen in 20 μl	Konzentration in 20 μl
Aufgereinigte DNA	-	je nach Bedarf (max. 10 μl)	1 μg in 20 μl (wenn möglich)
Wasser	-	je nach Bedarf (Wasser + DNA: 13 µl)	-
DIG RNA Labeling Mix	10 x	2 µl	1 x
Transcription buffer	5 x	2 µl	0,5 x
RNase Inhibitor	-	1 µl	-
RNA Polymerase T7	-	2 µl	-

Tabelle 20: Reagenzien der In-vitro-Transkription

Als RNase Inhibitor wurde RiboLock[™] (ThermoFischer Scientific, Waltham) verwendet. Es wurde versucht, 1 µg der DNA-Matrize in die In-vitro Transkription einzusetzen. War dies aufgrund zu niedriger DNA-Konzentrationen nicht möglich, wurde die maximal gestattete Menge (10 µl) der DNA-Lösung eingesetzt.

- 1. Zunächst wurden die in Tabelle 20 aufgeführten Reagenzien auf Eis pipettiert und gemischt.
- Anschließend erfolgte die Inkubation der vermischten Reagenzien bei 37° C im Heizblock Accublock[™] Mini (Labnet International, Edison, USA).1
- Die Elimination der Matrizen-DNA wurde durch Zugabe von 2 µl DNase I (RNase-Free DNase; Qiagen, Hilden) und anschließende Inkubation bei 37° C für 15 min in dem Heizblock Accublock[™] mini (Labnet International, Edison, USA) erreicht.
- 4. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 µl 0,2 M EDTA (pH: 8) hinzugefügt.
- 5. Anschließend wurden 2 µl 4 M Lithiumchlorid hinzugegeben und gut gemischt.
- Es folgte die Zugabe von 75 μl eiskaltem reinem Ethanol und schließlich eine Inkubation bei -20° C über Nacht mit dem Zweck der DNA-Fällung.
- Anschließend wurden die Proben bei 13 000 g in der Eppendorfzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg) für 15 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen.
- 8. 50 µl 70 %igem Ethanol wurden zu dem RNA-Pellet hinzugegeben, gut gemischt, dann

zentrifugiert für 5 min bei 13 000 g in der Eppendorfzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg).

- Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet getrocknet und anschließend resuspendiert in 100 µl Aqua bidest. DEPC.
- Die Sondenlösung (Gehalt ca. 10 μg markierte Sonde in 100μl) wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80° C tiefgefroren.

4.4.2.2 Durchführung der In-situ-Hybridisierung (ISH)

Die In-situ-Hybridisierung erfolgte an einer Auswahl von Versuchstieren, bei denen Lcn2 immunhistologisch nachweisbar war, und diente dem mRNA-Nachweis von Lipocalin-2 und damit der Verifizierung der Lcn2-Expression verschiedener Gliazellen, insbesondere von Astrozyten. Eine Übersicht der untersuchten Tiere sind in Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 24 dargestellt.

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
	V382/12		
	V406/12		
21 dpi	V440/12	-	-
	V59/13		
	V112/13		
	V75/13		
	V77/13		
42 dpi	V82/13	-	-
	V83/13		
	V87/13		
49 dpi	-	-	-

Tabelle 21:	Übersicht de	er mittels	ISH	untersuchten	Wildtyp-	Mäuse
	obci bionit at			antersaonten	Thatyp	maase

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
	V435/12		
	V436/12		
21 dpi	V438/12	-	-
-	V439/12		
	V60/13		
	V72/13		
	V74/13		
42 dpi	V76/13	-	-
-	V80/13		
	V84/13		
40 dui	V130/13		
49 api	V131/13		

Tabelle 22: Übersicht der mittels ISH untersuchten homozygoten TNF-α-transgenen Mäuse

BoDV-1: Borna disease virus 1, dpi: days post infectionem

Tabelle 23: Übersicht der mittels ISH untersuchten heterozygoten TNF-α-transgenen Mäuse

Alter	Infektionsstatus		
	BoDV-1	mock	nicht infiziert
21 dpi	-	-	-
42 dpi	V98/13 V99/13	-	-

BoDV-1: Borna disease virus 1, dpi: days post infectionem

Tabelle 24: Übersicht der mittels ISH untersuchten vorzeitig verstorbenen oder euthanasierten Mäuse

Tier	Alter	Mauslinie	Infektionsstatus
V67/14	30 dpi	TNFR2-k.o.	BoDV-1
V63/14	37 dpi	TNFR2-k.o.	BoDV-1
V306/14	40 dpi	TNFR2-k.o.	BoDV-1
V361/14	29 dpi	TNFR1-k.o.	BoDV-1

BoDV-1: Borna disease virus 1, dpi: days post infectionem, TNFR1-k.o.; Tumornekrosefaktorrezeptor 1-knockout, TNFR2-k.o.; Tumornekrosefaktorrezeptor 2-knockout

Es wurden jeweils 3 Objektträger pro Versuchstier mitgeführt, welche mit Lcn2-antisense-, Lcn2-sense-Sonde oder lediglich mit Hybridisierungsmix (Negativkontrolle) inkubiert wurden. Als (interne) Positivkontrolle wurden immer auch Gewebeschnitte eines 49 dpi alten, BoDV-1infizierten und homozygot TNF-α-transgenen Tieres (V131/13 bzw. V130/13) mitgeführt, welches sowohl in der ISH als auch immunhistologisch eine deutliche Lipocalin-2-mRNA-Expression zeigte. Die Ansätze der verschiedenen Lösungen und Puffer sind in Kapitel 10.1 aufgelistet und beschrieben.

- Entparaffinisierung durch dreimalige Inkubation in Roti[®]-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), dann in Isopropanol, 96 % igem Ethanol und 70 % igem Ethanol f
 ür jeweils f
 ür 5 min.
- Anschließend wurden die Gewebeschnitte f
 ür 5 min und 1 min in Aqua bidest. DEPC und 5 min in 1 x PBS gewaschen.
- Die zwanzigmin
 ütige Inkubation in 0,2 N HCI diente dem Aufschluss der Zellmembranen.
- 4. Es folgte ein zweimaliges Waschen für jeweils 30 min in 2 x SSC + EDTA bei 50° C.
- Die proteolytische Spaltung möglicher fixierungsbedingter Quervernetzungen erfolgte durch die Inkubation in einer Proteinase K-Lösung (0,5 µg Proteinase K/ml) für 15 min bei 37° C.
- Durch Zugabe von 0,2 %iges Glycin-PBS konnte die enzymatische Reaktion beendet werden.
- Eine Nachfixierung der Gewebeschnitte erfolgte durch die Inkubation in 4 %igem Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 4 min, welches dann durch zweimalige Inkubation in 1 x PBS für jeweils 1 min wieder ausgewaschen wurde.
- 8. Es folgte eine fünfzehnminütige Inkubation in 1 x PBS + 5 mM MgCl₂.
- Die Zugabe von 0,25 %igem Acetanhydrid (Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-UIm) in 0,1 M Triethanolamin (pH: 7,5; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) für 10 min verfolgte den Zweck der Azetylierung und sollte eine unspezifische Bindung der Sonde an positiv geladene Molekülgruppen, zum Beispiel von Proteinen, verhindern.
- Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimalig für 1 min und einmalig für 15 min in 1 x PBS gewaschen.
- 11. Für 1 h wurden die Gewebeschnitte anschließend bei 52° C im Wärmebad mit dem Prähybridisierungsmix inkubiert.
- 12. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (ca. 16 h) bei 52° C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden jeweils mit 35 µl Hybridisierungsmix überschichtet und dann mit Hilfe von zugeschnittenem Gelbond[®]-Film (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) abgedeckt und mit dem Montagekleber Fix-o-gum[®] (Marabu GmbH & Co. KG, Tamm) abgedichtet. Die Konzentration der Sonden betrugen dabei jeweils 5 µl Sondenlösung (ca. 0,1 µg/µl) pro 100 µl Hybridisierungsmix.
- 13. Die Entfernung überschüssiger bzw. nicht gebundener Sonden erfolgte am nächsten Tag nach manueller Entfernung von Gelbond[®]-Filmen und Fix-o-gum[®] durch multiple Waschungen mit steigender Stringenz nach folgendem Muster: 2 x 15 min in 6 x SSC mit 45 % Formamid bei 42° C, 2 x 5 min in 2 x SSC.

- Eine dreißigminütige Inkubation in einer RNase-Lösung bei 37° C bewirkte den enzymatischen Abbau einzelsträngiger und somit nicht spezifisch-gebundener RNA-Sonden.
- 15. Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut 2 x 5 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur und 2 x 15 min in 0,2 x SSC bei 50° C gewaschen.
- 16. Nach einminütiger Äquilibrierung in Puffer 1 wurden mögliche unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Zugabe einer Blocking-Lösung (1,2 ml steriles neutrales Schafserum und 1,8 ml Triton-X-100 in 60 ml Puffer 1; siehe auch Kapitel 10.1: Lösungen und Puffer) für 30 min weitestgehend blockiert.
- 17. Die Objektträger wurden abgetrocknet und die Gewebeschnitte mittels eines Fettstiftes (DAKO-Pen[®], DAKO Cytomation, Hamburg) umrandet, so dass jeweils 300 µl der anti-Digoxigenin-Antikörper-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgetragen werden konnten.
- 18. Anschließend wurden die Objektträger 2 x f
 ür 15 min in Puffer 1 und 1 min in Puffer 3 gewaschen.
- Die Farbreaktion erfolgte über Nacht (ca. 16 h) im Dunkeln durch Inkubation in einer Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)/ 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)-Färbelösung.
- 20. Die abschließenden Waschungen durch zweimalige Inkubation in Puffer 4 für 10 min,1 min Aqua bidest. und Leitungswasser fanden ebenfalls im Dunkeln statt.
- Das Eindecken der Gewebeschnitte erfolgte von Hand mit Hilfe von erwärmter Glyceringelatine (Merck KGaA, Darmstadt).

4.4.2.3 Auswertung der In-situ-Hybridisierung

Die Auswertung der In-situ-Hybridisierung erfolgte lichtmikroskopisch in Anlehnung an die Auswertung der immunhistologischen Untersuchung. Jeweils 5 Hauptgesichtsfelder der 200-fachen Vergrößerungsstufe wurden pro Gehirnareal hinsichtlich positiver Gliazellen quantitativ ausgewertet. Das Verhältnis der verschiedenen Lcn2-positiver Subpopulationen, zum Beispiel Astrozyten und Mikrogliazellen wurde abgeschätzt. Als positiv wurden dunkelblaue bis dunkelviolette Farbniederschläge gewertet, die sich in einer Ebene mit dem Gewebeschnitt befanden und in den Schnitten, welche mit sense-Sonde bzw. Hybridisierungsmix inkubiert worden waren, nicht zu finden waren. Das leicht granuläre Signal befand sich typischerweise intrazytoplasmatisch, in der Regel in der Nähe des Nukleus.

Folgende Hirnareale wurden differenziert betrachtet:

I. Striatum (kranial)

- II. Striatum (kaudal)
- III. Frontalcortex (lateral)
- IV. Hippocampus
- V. Thalamus
- VI. Klein- und Stammhirn

4.4.3 Statistische Auswertung der In-vivo-Untersuchungen

Die Datensätze dieser Untersuchung wurden mit Microsoft[®] Office Excel 2013 (Microsoft Corporation) verwaltet. Die statistische Bearbeitung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm BMDP1D des Statistikprogrammpaketes BMDP / Dynamic, Release 8.1 (1993, BDMP Statistical Software, Inc.) für die einfache Datenbeschreibung verwendet. Für die statistische Auswertung des immunhistologischen Nachweises von zellulärem Lcn2 wurde das generalisierte, lineare, multiple, gemischte Modell (*glmm analysis*) in der Variante mit Häufung von Nullwerten (zeroinflated) unter Verwendung der negativen Binomialverteilung als Basisverteilung für die Zählergebnisse angewandt. Die Anpassung des Modells an die vorliegenden Daten erfolgte mit dem R-Paket "Ime 4", Funktion "Imer" unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Technik. Daran schloss sich zur Prüfung der statistischen Signifikanz der Versuchseffekte (Mauslinie, Hirnareal) der Wald-Test an.

Die statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung zum Nachweis von sezerniertem Lcn2 erfolgte entsprechend des Verfahrens für die Bewertung des zellulären Lcn2, jedoch wurde die Poissonverteilung als Basisverteilung der Zählergebnisse zugrunde gelegt. Auch die statistische Auswertung der In-situ Hybridisierung erfolgte analog zu der oben beschriebenen Auswertung des immunhistologisch dargestellten zellulären Lcn2; neben der statistischen Signifikanz der Versuchseffekte (Mauslinie, Hirnareal) wurden jedoch auch deren mögliche Wechselwirkungen im Wald-Test geprüft.

Vorzeitig verstorbene oder euthanasierte Mäuse wurden nicht in die statistische Auswertung eingeschlossen.

4.5 In-vitro-Untersuchungen

4.5.1 Präparation und BoDV-1-Infektion primärer kortikaler Astrozytenkulturen

Grundlage der Gewinnung astrozytärer Kulturen – in Anlehnung an die Arbeiten von AHLE-MEYER et al. (2013) und MCCARTHY und DEVELLIS (1980) – waren neonatale Mäuse der 4 verschiedenen Zuchtlinien: Wildtyp-Mäuse (wt), TNF-α-transgene Mäuse, TNFR1-k.o.-Mäuse und TNFR2-k.o.-Mäuse. Die Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken wurde der zuständigen Behörde angezeigt (universitäts-interne Bezeichnung der Tötungsmeldung: 630_M). Für jede Präparation wurde ein gesamter Wurf verwendet, der durchschnittlich 6 neonatale homozygote Tiere der 4 Mauslinien (siehe oben) umfasste. Die Präparation der Mäuse erfolgte nacheinander, im weiteren Verlauf wurde das Zellmaterial gepoolt. Der Transgenstatus der verwendeten Tiere wurde mit Hilfe einer entsprechenden PCR (siehe Kapitel 4.2.5) im weiteren Verlauf kontrolliert. Als Ausgangsmaterial der DNA-Isolation dienten Schwanzspitzen, die während der Astrozytenpräparation von den bereits getöteten Mäusen entnommen wurden.

4.5.1.1 Präparation muriner kortikaler Astrozyten

- Die Mäuse wurden mittels Scherenschlag dekapitiert. Nach Desinfektion der Schädeldecke erfolgten ein medianer Hautschnitt und ein laterales Abziehen der Haut. Im Weiteren wurde die knöcherne Schädeldecke desinfiziert, mit einer Schere eröffnet und das Gehirn entnommen.
- Mit feinen Pinzetten wurden meningeale Strukturen so gut wie möglich entfernt und das Stamm- und Kleinhirn mit einem scharfen Spatel abgesetzt.
 Reste der Meningen wurden erneut mit Hilfe feiner Pinzetten entfernt und die beiden Hirnhälften durch einen medianen Schnitt voneinander getrennt.
- Der frontale und parietale Cortex wurden in Gänze präpariert und bis zur weiteren Verwendung in einer kleinen Petrischale (Cellstar Cell Culture Dishes, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit erwärmtem DMEM-low glucose-Zellkulturmedium (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) gelagert.
- 4. Jeweils 2 Cortizes wurden anschließend in ein 15 ml Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit 2 ml Trypsin-EDTA (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) überführt, welches zuvor im Wärmebad auf 37° C erwärmt worden war. Während der anschließenden Inkubation im 37° C warmen Wärmebad für 20 min konnten Zellverbindungen gelöst werden. Durch regelmäßiges Rütteln der Reaktionsgefäße konnte der Prozess optimiert werden.
- Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 150 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Gewebe in 1 ml DMEM-low glucose-Medium

resuspendiert.

- 6. Ein Metallsieb (200 mesh; Porengröße: 73,7 μm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde auf ein steriles Becherglas aufgesetzt und mit DMEM-low glucose-Medium angefeuchtet. Die Zellsuspension wurde auf das Sieb aufgetragen und mittels eines sterilen Glaspistills durch leichtes Klopfen in das Becherglas befördert.
- Jeweils 5 ml der Zellsuspension wurden in ein 15 ml Reagenz- und Zentrifugenröhrchen überführt und für 8 min bei 150 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.
- Unter Erhaltung des Pellets wurde anschließend der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml DMEM-low-glucose-Medium resuspendiert.
- 9. Je nach weiterem Versuchsvorhaben wurde die Zellsuspension dann auf 25 cm²-Zell-kulturflaschen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht), 24-well-Platten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit eingelegten Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (Poly-L-Lysin: Biochrom GmbH, Berlin; Deckgläschen: Gerhard Menzel B. V. & Co. KG, Braunschweig) oder Multitestobjekkträger (Dunn Labortechnik, Asbach) verteilt. Im Anschluss wurden die genannten Gefäße unmittelbar in einen Begasungsbrutschrank Typ B16 (Heraeus Instruments, Bereich Thermotech, Hanau) überführt und bei 5 % CO₂ und 37° C inkubiert.

4.5.1.2 Waschen und mikroskopische Kontrolle

Nach 24 h wurden die Astrozyten mikroskopisch durch das Mikroskop "Eclipse TS100" (Nikon GmbH, Düsseldorf) in den Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) begutachtet und insbesondere auch im Hinblick auf mögliche Kontaminationen betrachtet. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen kurz mit kaltem (ca. 7° C) 1 x PBS gewaschen und schließlich wieder mit Medium überschichtet.

4.5.1.3 BoDV-1-Infektion der murinen primären Astrozyten

48 h nach der Präparation wurden die Astrozyten in den Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) erneut mikroskopisch mit Hilfe des Mikroskopes Eclipse TS100 (Nikon GmbH, Düsseldorf) untersucht, das Medium abgenommen und ein Teil der Zellen mit einer 1:50-Mischung der (murinen) BoDV-1-Virussuspension (Virustiter: 5 x 10⁵ ID₅₀/ml) in DMEM-low glucose-Medium überschichtet und für 1 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Bei den restlichen Zellen wurde lediglich Medium abgenommen und neues DMEM-low glucose-Medium hinzugegeben. Nach der einstündigen Inkubationsphase wurde die Virussuspension wieder entfernt und die Astrozyten wieder mit DMEM-low glucose-Medium überschichtet.

4.5.1.4 Passage der murinen primären Astrozyten

Zu den Zeitpunkten 7, 14, 21 und 28 dpi wurden die BoDV-1- und nicht infizierten Astrozyten

der 25 cm²-Zellkulturflaschen nach dem folgenden Prozedere passagiert, um durch ein erneutes Aussäen weitere Astrozyten für die jeweils nächsten Zeitpunkte zu generieren.

- Nach Abnahme des Zellkulturmediums erfolgte ein kurzer Waschschritt mit erwärmtem PBS und anschließend die Zugabe von 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA (Thermo Fischer, Waltham, USA) und Inkubation für 8 min (nicht-infizierte Astrozyten) bzw. 10 min (BoDV-1-infizierte Astrozyten) im Brutschrank zur Ablösung der adhärenten Zellen. Der zeitliche Unterschied beruht auf der Beobachtung, dass die virus-infizierten Astrozyten oftmals adhärenter erschienen als die nicht-infizierten Zellen (persönliche Kommunikation von M. Hirz). Durch intermittierendes Schütteln und Klopfen konnte der Prozess optimiert werden.
- Der Überstand wurde unter Erhaltung des Zellpellets abgenommen und das jeweilige Zellpellet in 5 ml resuspendiert und zu gleichen Teilen auf die verschiedenen Zellkultursysteme verteilt.

4.5.1.5 Inkubation der murinen primären Astrozyten mit TNF-α

Die Inkubation mit TNF- α der primären Astrozyten der 4 verschiedenen murinen Zuchtlinien erfolgte nach der ersten Passage (7 dpi), im Rahmen derer ein Teil der BoDV-1-infizierten und nicht infizierten Astrozyten auf Multitestobjektträgern (Dunn Labortechnik, Asbach) ausgesät worden war. Die Phase des Anwachsens der Zellen auf den genannten Multitestobjektträgern wurde täglich mikroskopisch kontrolliert. Nach 2 bis 3 Tagen – mit Erreichen eines konfluenten Zellrasens – wurde auf die Vertiefungen der Multitestobjektträger jeweils 50 µl von 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml TNF- α in 1 ml DMEM-low glucose-Medium aufgetragen und über Nacht (ca. 16 h) inkubiert. Der Ansatz der TNF- α -Lösungen wird detailliert im Anhang 10.1 beschrieben. Danach wurde das TNF- α -/Medium-Gemisch abgenommen, kurzzeitig 1 x PBS aufgetragen und wieder abgenommen und die Zellen mit 50 µl Medium pro Vertiefung überschichtet. Zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h *post incubationem* wurden die entsprechenden Multitestobjektträger mit 4 % PFA fixiert und anschließend mit PBS überschichtet im Kühlschrank gelagert. Unbehandelte Kontrollen, die lediglich mit DMEM-low glucose-Medium inkubiert wurden, wurden für jeden Zeitpunkt sowie die BoDV-1- bzw. nicht infizierten Astrozyten mitgeführt. Ein übersichtliches Schema der TNF- α -Behandlung der Astrozyten zeigt Abbildung 13.



Abbildung 13: Schema der TNF-α-Behandlung der Astrozytenkulturen

BoDV-1: Borna disease virus 1; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; h: Stunden; tg: homozygot TNF-α-transgen; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α; TNFR1-k.o.: TNFR1-knockout; TNFR2-k.o.: TNFR2knockout; wt: Wildtyp

4.5.1.6 Pro- bzw. antiinflammatorische Stimulation der murinen Astrozyten

Die Inkubation mit LPS und IFN-γ zur proinflammatorischen Stimulation bzw. IL-4 zur antiinflammatorischen Stimulation der Astrozyten erfolgte – analog der TNF-α-Behandlung – nach der ersten Passage auf Multitestobjektträgern. Über Nacht (ca. 16 h) wurden die Astrozyten mit jeweils 50 µl pro Vertiefung IFN-γ- und LPS-enthaltendem bzw. IL-4 enthaltendem DMEM-Medium inkubiert. Die Konzentrationen in der jeweiligen Inkubationslösung betrugen 100 ng/ml für LPS (Sigma, St. Louis, USA), 50 U/ml für IFN-γ (PeproTech, Hamburg) und 100 ng/ml für IL-4 (PeproTech, Hamburg). Der Ansatz der jeweiligen Arbeitslösungen der Zytokine wird unter 10.1 detailliert beschrieben. Nach der Inkubationszeit wurden diese Inkubationslösungen abgenommen, kurz mit 1 x PBS gewaschen und dann analog zu Kapitel 4.5.1.5 fixiert.

4.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

4.5.2.1 Fixierung der Astrozytenkulturen

Die Astrozytenkulturen wurden für sämtliche Immunfluoreszenzuntersuchungen zunächst für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit frisch hergestelltem 4 %igen Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend erfolgten 2 weitere fünfminütige Waschungen mit PBS sowie schließlich die Überschichtung der Objektträger mit PBS und die Lagerung bei ca. 7° C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung.

4.5.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz – Tripelmarkierung

Der zeitgleiche Nachweis von BoDV-1-N, Lipocalin-2-Antigen sowie von GFAP-Antigen als Marker des astrozytären Ursprungs der Zellen war aufgrund der Verwendung von Primärantikörpern verschiedener Spezies möglich. Mit Hilfe von mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörpern konnten die verschiedenen Antigene detektiert werden. In die spätere fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurden jeweils 2 Präparationen jeder der genannten Mauslinien einbezogen. Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 25, die Primärantikörper in Tabelle 26 aufgeführt.

Als Negativkontrollen wurden bei jeder durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchung jeweils ein Deckgläschen mit TBS statt des Primärantikörpers bzw. statt des Sekundärantikörpers inkubiert.

Primärantikörper	Herkunft, Spezifität, Hersteller	Lokalisation	Verdünnung
Kaninchen-anti- GFAP	polyklonal, bovines GFAP (RM), Dako A/S (Glostrup, Dänemark)	IZ	1:50 in 3 % BSA in TBS mit 0,25 % Triton X
Ziege-anti-Lipocalin- 2/NGAL	polyklonal, murines Li- pocalin-2/NGAL biotechne R&D Sys- tems GmbH (Wiesba- den)	IZ	1:50 in 3 % BSA in TBS mit 0,25 % Triton X
Maus-anti-BoDV-1-N (Bo18)	monoklonal 38/40 kDa BDV-N (Herzog)	IN/IZ	1:100 in 3 % BSA in TBS mit 0,25 % Triton X

Tabelle 25: Primärantikörper der indirekten Immunfluoreszenz

BoDV-1-N = Nukleoprotein des BoDV-1; BSA = bovines Serumalbumin; GFAP = saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein); IN = intranukleär; IZ = intrazellulär; Lokalisation = Lokalisation des Antigens; NGAL = Neutrophilen-Gelatinase assoziiertes Lipocalin = Lipocalin-2 (neutrophil-gelatinase associated lipocalin); TBS = Tris-buffered saline

Der Maus-anti-BoDV-N-Antikörper (Bo18) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Sybille Herzog, Institut für Virologie des Fachbereichs Veternärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

Sekundärantikörper	Herkunft (Tier- art), Hersteller	Verdünnung	Abs _{MAX}	Em _{MAX}	Farbe
Alexa Fluor [®] 647 anti Kaninchen IgG (H+L)	Esel Dianova, Hamburg	1:100 in 3 % BSA in TBS mit 0,25 % Triton X	651	667	violett
Alexa Fluor [®] 488 anti Ziege IgG (H+L)	Esel Dianova, Hamburg	1:100 in 3 % BSA in TBS mit 0,25 % Triton X	493	513	grün
Cy [™] 3 anti Maus IgG (H+L)	Esel Dianova, Hamburg	1:100 in 3 % BSA in TBS mit 0,25 % Triton X	550	570	rot
DAPI	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	1:500 in TBS	358	461	blau

Tabelle 26: Sekundärantikörper und Kernfärbung der indirekten Immunfluoreszenz

 $Ab_{SMAX} = Ab_{SOP}$ absorptionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes; Cy = Cyanin-Farbstoffe, DAPI = 4',6-Dia $midin-2-phenylindol, ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff; <math>Em_{MAX} = Emissionsmaximum$ des Fluoreszenzfarbstoffes; IgG = Immunglobulin G; H = schwere Polypeptidkette des Immunglobulins (heavy chain); L = leichte Polypeptidkette des Immunglobulins (light chain); TBS = Tris-buffered saline

- 1. Die Deckgläschen bzw. Multitestobjektträger (Dunn Labortechnik, Asbach) wurden zweimalig für jeweils 5 min mit TBS in kleinen Petrischalen gewaschen.
- Die Permeabilisierung und das Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgten parallel durch Inkubation der Deckgläschen in 100 µl Blockingserum (20 % Pferdeserum + 3 % BSA + 0,25 % Triton-X-100 in TBS) durch Umstürzen der Deckgläschen in einen

entsprechenden Flüssigkeitstropfen auf einer Parafilmschicht bzw. durch Auftragen von jeweils 25 µl der genannten Lösung auf jede Vertiefung einer Multitestobjektträgers.

- Die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörpergemisch (siehe Tabelle 25) erfolgte ebenfalls auf die unter 2. beschriebene Art und Weise über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C.
- Zur Entfernung von ungebundenen Primärantikörpern wurden die Deckgläschen bzw. Multitestobjektträger dreimalig für jeweils 5 min mit TBS in den kleinen Petrischalen gewaschen.
- Die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten Fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörpergemisch (siehe Tabelle 26) erfolgte wie unter 2. beschrieben für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- Zur Entfernung von ungebundenen Sekundärantikörpern wurden die Deckgläschen bzw. Multitestobjektträger dreimalig für jeweils 5 min mit TBS in den kleinen Petrischalen im Dunkeln gewaschen.
- Die Kernfärbung erfolgte durch 5-minütige Inkubation der Deckgläschen in der 1:500 mit TBS verdünnter DAPI-Stocklösung wie unter 2. beschrieben im Dunkeln.
- 9. Durch Waschen der Deckgläschen mit Aqua dest. der Deckgläschen bzw. Multitestobjektträger für 5 min im Dunkeln wurden Salze entfernt.
- 10. Die Deckgläschen wurden in einen Tropfen des GLC[™] Mounting Mediums (Sakura Finetech Europe B.V., Niederlande) auf einem Superfrost Plus Objektträger eingedeckt und bis zur Auswertung im Dunkeln im Kühlschrank gelagert. Die Multitestobjektträger wurden ebenfalls mit einigen Tropfen des GLC[™] Mounting Mediums versehen, mit einem 24 x 60 mm Deckgläschen (Roth, Karlsruhe) eingedeckt und entsprechend gelagert.

4.5.2.3 Auswertung der Immunfluoreszenz

Jeweils 2 Präparationen jeder Mauslinie wurden kultiviert, der Immunfluoreszenz zugeführt und anschließend ausgewertet. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des Eclipse 80i Mikroskops (Nikon GmbH, Düsseldorf), an welchem mit der DS Qi1Mc-Kamera und der Software NIS-Elements BR 3.10, SP3 (Nikon GmbH, Düsseldorf) Aufnahmen der markierten Zellen in der 200fachen Vergrößerung gemacht wurden. Anhand der Aufnahmen wurden jeweils 200 Zellen pro Mauslinie, Zeitpunkt und Infektionsstatus bzw. gegebenenfalls zusätzlich noch Behandlungsart ausgezählt. Die 200 Zellen wurden zunächst lediglich mit Hilfe des DAPI-Signals ausgewählt und anschließend hinsichtlich der in Tabelle 27 beschriebenen Parameter ausgezählt. Zusätzlich wurden auch die Astrozyten gesondert gezählt, welche zugleich ein Signal für Lcn2 und BoDV-1-N aufwiesen.

Die Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz der TNF- α -, IL-4- oder LPS/IFN- γ -behandelten Astrozyten erfolgte nach den gleichen Kriterien wie bei den unter 5.2.1 beschriebenen nicht behandelten Astrozyten. Auch hier wurden lediglich Astrozyten, welche morphologisch vital erschienen, in die Auswertung einbezogen. Da die Anzucht und TNF- α -Behandlung der Astrozyten auf den Multitest-Objektträgern erfolgte, auf denen suboptimale Wachstumsbedingungen für die Astrozyten vorlagen, war die Zahl apoptotischer bzw. nekrotischer Astrozyten deutlich höher als bei der Anzucht in der Zellkulturflasche bzw. einer 24-well-Platte. Aus diesem Grund wurden jeweils 5 Vertiefungen eines Multitest-Objektträgers mit Astrozyten beimpft, die gleichartig behandelt wurden (Behandlung mit TNF- α , IL-4, LPS/IFN- γ oder keine Behandlung, d.h. Überschichtung mit DMEM-Medium). Aus diesen 5 Vertiefungen wurden 5 Gesichtsfelder in der 200fachen Vergrößerung mit intakten, konfluent gewachsenen und vitalen Astrozyten ausgewählt und ausgewertet.

Detektiertes Antigen	Farbe	Lokalisation	Ziel
DNA (DAPI-Färbung)	blau	Nukleus	Kernfärbung
GFAP	violett	intrazytoplasmatisch (dif- fus)	Identifikation der Ast- rozyten
Lcn2	grün	intrazytoplasmatisch (peri- nukleär, granulär)	Quantifizierung der Lcn2-Expression
BoDV-1-N	rot	intrazytoplasmatisch und – nukleär (granulär)	Quantifizierung der BoDV-1-Infektion

Tabelle 27: Parameter der Immunfluoreszenz-Auswertung

BoDV-1: Borna disease virus 1, BoDV-N: Nukleoprotein von BoDV-1; DNA: Desoxynukleinsäure, GFAP: glial fibrillary acidic protein, Lcn2: Lipocalin-2

4.5.3 Statistische Auswertung der In-vitro-Untersuchungen

Die Datensätze dieser Untersuchung wurden mit Microsoft[®] Office Excel 2013 (Microsoft Corporation) verwaltet. Die statistische Bearbeitung mit Durchführung der nachfolgend genannten Rechenläufe erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm BMDP1D des Statistikprogrammpaketes BMDP / Dynamic, Release 8.1 (1993, BDMP Statistical Software, Inc.) für die einfache Datenbeschreibung verwendet. Für die statistische Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz zum Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 wurde das generalisierte, lineare, multiple, gemischte Modell (glmm analysis) unter Verwendung der negativen Binomialverteilung (Lcn2) bzw. der Poissonverteilung (BoDV-1) als Basisverteilung für die Zählergebnisse angewandt. Die Anpassung des Modells an die vorliegenden Daten erfolgte mit dem R-Paket "Ime 4", Funktion "Imer" unter Verwendung der Maximum-Likelihood-Technik. Daran schloss sich zur Prüfung der statistischen Signifikanz der Versuchseffekte (Mauslinie, Infektionsstatus und Untersuchungszeitpunkt für Lcn2 bzw. Mauslinie und Untersuchungszeitpunkt für BoDV-1) und möglicher Wechselwirkungen der Wald-Test an.

Die statistische Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz zum Nachweis von Lcn2 nach TNF- α Behandlung erfolgte entsprechend des oben beschriebenen Verfahrens für Lcn2, jedoch wurden die statistische Signifikanz folgender Versuchseffekte (Mauslinie, Infektionsstatus, Behandlungsdauer und TNF- α) und deren mögliche Wechselwirkungen untersucht. Die statistische Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz zum Nachweis von Lcn2 nach IL-4- bzw. IFN- γ /LPS-Behandlung erfolgte entsprechend des oben beschriebenen Verfahrens für Lcn2, jedoch wurden die statistische Signifikanz folgender Versuchseffekte (Mauslinie, Infektionsstatus und das jeweilige Zytokin) und deren mögliche Wechselwirkungen untersucht.

5 ERGEBNISSE

5.1 Ergebnisse der In-vivo-Untersuchungen

5.1.1 Immunhistologische Untersuchungen

5.1.1.1 Immunhistologischer Nachweis der Lipocalin-2-Expression

Sämtliche Mausgruppen sowie die vorzeitig euthanasierten bzw. verstorbenen Mäuse wurden hinsichtlich ihrer intrazerebralen Lcn2-Expression in den unter 4.4.1.1 beschriebenen Gehirnarealen untersucht. Aufgrund unterschiedlicher Lcn2-Expressionsmuster werden diese im Folgenden separat behandelt.

Die Lcn2-Expression zeigte sich zum einen als braunes, granuläres intrazytoplasmatisches Signal mit überwiegend perinukleärer Lokalisation; zum anderen als braunes, granuläres Signal, welches keinem Zellkörper zuzuordnen war und insbesondere in der Nähe zahlreicher Lcn2-positiver Zellen detektierbar war. In der Literatur wird dieses Lcn2-Signal auch als "sezerniertes Lcn2" beschrieben (NOCON et al., 2014)

Als Hauptquelle der Lipocalin-2-Expression konnten Astrozyten identifiziert werden, deren Anteil an den gezählten Lcn2-exprimierenden Zellen – unabhängig vom untersuchten Gehirnareal – immer über 75 % betrug. Häufig handelte es sich zudem um Astrozyten, die Merkmale einer bereits in den Arbeiten von SCHAUDIEN (2007) und HIRZ (2017) beschriebenen abnormen Hypertrophie mit blasig erscheinendem Nukleus und deutlich vergrößertem Zelldurchmesser zeigten. Neben Astrozyten waren auch einzelne Mikrogliazellen positiv, bei einzelnen Tieren auch Ependymzellen, meningeale und Endothelzellen. Kein Lcn2 konnte in Neuronen dargestellt werden.

Lcn2-positive Zellen waren in erster Linie in der Nähe von Gefäßen mit einer Akkumulation von mononukleären Entzündungszellen im Virchow-Robinschen Raum (*perivascular cuffing*) zu finden. Abbildung 14 zeigt verschiedene Lipocalin-2-Expressionsmuster.



Abbildung 14: Lcn2-Nachweis in verschiedenen Gehirnarealen eines BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Tieres

Verschiedene Gehirnareale eines BoDV-1-infizierten, TNF-α-transgenen (tg/tg) Tieres (42 dpi; V72/13) **a**: Kaudaler Anteil des Striatums mit umgebendem Cortex cerebri: Multifokale perivaskuläre Infiltration (Pfeilspitzen) mit aktivierten Lcn2-positiven Astrozyten (Pfeile) im umgebenden Parenchym, das durch vermutlich sezerniertes Lcn2 eine deutliche diffuse Braunfärbung zeigt; 40fache Vergrößerung. **b**: Hippocampus mit einzelnen Lcn2-positiven Astrozyten (Pfeil) und geringgradiger diffuser Braunfär-

bung durch vermutlich sezerniertes Lcn2; 200fache Vergrößerung.

c: Kaudales Striatum: Gefäß mit perivaskulären Infiltraten (Pfeilspitzen), im angrenzenden Parenchym ist eine große Zahl aktivierter Astrozyten mit blasigem Zellkern (Pfeile) sichtbar, zudem deutliches parenchymales Lcn2-Signal in diesem Bereich (diffuse Braunfärbung); 200fache Vergrößerung.

d: Kraniales Striatum: Lcn2-positive Astrozyten (Pfeil) und geringes Maß an sezernierten Lipocalin-2 (erkennbar als "diffuse" Braunfärbung des Parenchyms), perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate (Pfeilspitze); 200fache Vergrößerung.

Die Lcn2-Expression war nur bei wenigen Mausgruppen detektierbar. Zum einen in der Gruppe BoDV-1-infizierter Mäuse mit vermehrter zerebraler TNF-α-Expression (tg/tg und tg/wt), zum anderen bei vorzeitig verstorbenen oder euthanasierten BoDV-1-infizierten TNFR1- oder TNFR2-k.o.-Tieren, bei denen ein präfinales Krampfgeschehen vermutet oder beobachtet wurde (HIRZ, 2017). Im Folgenden wird zunächst auf die Lcn2-Expression der TNF-α-transgenen Tiere und im Anschluss auf die genannten TNFR1- bzw. TNFR2-k.o.-Tiere eingegangen.

Grundsätzlich war die immunhistologische Detektion von Lcn2 erst bei den TNF-α-transgenen

Mäusen möglich, welche im Alter von 42 dpi bzw. 49 dpi untersucht wurden, während bei 21 dpi alten Mäuse derselben Gruppen noch kein Lcn2 nachweisbar war. In der Gruppe der heterozygoten TNF-α-transgenen Tiere (tg/wt) zeigte ein Tier (V98/13) keine Lcn2-Expression. Nicht- bzw. mock-infizierte Tiere egal welcher Mauslinie wiesen grundsätzlich keine zerebrale Lcn2-Expression auf. Eine Übersicht über den Nachweis von Lcn2 bei BoDV-1-infizierten Tieren findet sich in Tabelle 28.

	Zeitpunkt		
Mauslinie	21 dpi	42 dpi	49 dpi
tg/tg	0/5	5/5	2/2
tg/wt	0/5	4/5	-
wt/wt	0/5	0/5	0/2
TNFR1-k.o.	0/5	0/5	-
TNFR2-k.o.	0/5	0/5	-

Tabelle 28: Tiere mit zerebraler Lcn2-Expression nach BoDV-1- Infektion

dpi: days post infection; tg/tg: homozygot TNF-α-transgen; tg/wt: heterozygot TNF-α-transgen; TNFR1k.o.: TNFR1-knockout; TNFR2-k.o.: TNFR2-knockout; wt/wt: homozygot C57BL/6 (Wildtyp); -: nicht vorhanden

Vorzeitig verstorbene oder von den aufgeführten Zeitpunkten abweichend euthanasierte Tiere wurden in dieser Aufstellung nicht berücksichtigt.

Zwischen den beiden TNF- α -transgenen Mauslinien (tg/tg und tg/wt) wurde hinsichtlich des immunhistologischen Nachweises von Lipocalin-2 kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt. Dahingegen hatte das Gehirnareal einen hochsignifikanten Effekt (p < 0,00001) auf die Lipocalin-2-Expression. Die Ergebnisse der Untersuchung der Haupteffekte von Mauslinie und Gehirnareal auf die Lcn2-Expression sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie und	Gehirnareal
auf den immunhistologischen Nachweis von Lcn2 in Gliazellen	

Haupteffek	tte (p-Wert)	Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)
Mauslinie	Gehirnareal	Mauslinie / Gehirnareal
0,64	< 0,00001	0,41

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer zeroinflated generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkung.

Der Faktor "Mauslinie" umfasst lediglich die homo- und heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse, da die anderen Mauslinien das Merkmal Lipocalin-2-positiver Zellen nicht zeigten. Entsprechendes gilt auch für den Faktor "Gehirnareal", welcher nur die Areale vom kranialen und kaudalem Striatum, Frontalcortex und Hippocampus einschließt.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte bzw. Wechselwirkungen sind grau hinterlegt.

Die Lcn2-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen wurde für die homo- und heterozyqot TNF-α-transgenen BoDV-1-infizierten Tiere (42 und ggf. 49 dpi) gemeinsam betrachtet und statistisch ausgewertet.

Die Regionen des kranialen Striatums (durchschnittlich 48 (tg/tg) bzw. 86 (tg/wt; exkl. V98/13) Lcn2-positive Zellen in 5 Hauptgesichtsfeldern) und insbesondere des weiter kaudal gelegenen Striatums (durchschnittlich 105 (tg/tg) bzw. 111 (tg/wt; exkl. V98/13) Lcn2-positive Zellen in 5 Hauptgesichtsfeldern) zeigten die höchsten Zahlen Lcn2-positiver Zellen. Der laterale frontale Cortex (durchschnittlich 15 (tg/tg) bzw. 14 (tg/wt; exkl. V98/13) Lcn2-positive Zellen in 5 Hauptgesichtsfeldern) sowie die Region des Hippocampus (durchschnittlich 18 (tg/tg) bzw. 15 (tg/wt; exkl. V98/13) Lcn2-positive Zellen in 5 Hauptgesichtsfeldern) wiesen ebenfalls Lcn2positive Zellen auf, jedoch in wesentlich geringeren Zahlen als im Striatum. In den Anschnitten von Kleinhim, Rhombenzephalon und Thalamus war kein Lcn2 nachweisbar. Diese quantitativen Unterschiede von Lcn2-positive Zellen zwischen den verschiedenen Gehirnarealen waren für die Gruppen der tg/tg- und tg/wt-Tiere weitgehend ähnlich. Die folgende Abbildung 15 zeigt die Verteilung von Lcn2 in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten homo- und heterozygoten TNF-α-transgenen Mäuse 42 bzw. 49 dpi.



Abbildung 15: Lcn2 in verschiedenen Gehirnarealen der homo- und heterozygot TNF- α -transgenen Mäuse

Striatum I = kraniales Striatum, Striatum II = kaudales Striatum, Lcn2 = Lipocalin-2; p-Wert: Signifikanzwert (propability) Immunhistologischer Lcn2-Nachweis in BoDV-1-infizierten TNF- α -tg/tg-und -tg/wt-Mäusen (42 bzw. 49 dpi) mit Darstellung der statistisch signifikanten Haupteffekte (*: p < 0.05; ****: p < 0.0001). Die Klammern symbolisieren die jeweils gegenüber gestellten Gehirnareale. Ein heterozygot TNF- α -transgenes Tier (V98/13), das keine Lcn2-Expression zeigte, wird nicht dargestellt. Es werden ausschließlich die Gehirnareale dargestellt, in denen Lcn2-positive Zellen zählbar waren. Die Regionen von Thalamus, Kleinhirn und Rhombenzephalon wurden ebenfalls untersucht.

Zur statistischen Bewertung der verschiedenen Gehirnareale der homo- und heterozygot TNF- α -transgenen BoDV-1-infizierten Tiere (42 und 49 dpi) hinsichtlich der Lcn2-Expression wurden diese jeweils gegenübergestellt (wechselndes Referenz-Gehirnareal). Das kaudale Striatum zeigte statistisch signifikant höhere Zahlen Lcn2-positiver Gliazellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Gehirnarealen: p < 0,05 bei Vergleich kraniales vs. kaudales Striatum, p < 0,0001 bei Vergleich kaudales Striatum mit Hippocampus bzw. Frontalkortex. Das kraniale Striatum wies ebenfalls statistisch signifikant mehr Lcn2-positive Zellen als der Frontalkortex (p < 0,0001) und der Hippocampus (p < 0,0001), welche sich untereinander nicht statistisch signifikant unterschieden. Weitere, detaillierte Angaben sind in Tabelle 30 zu finden.

Haupteffekte (p-Wert)				
Gehirnareal	Kraniales Stria- tum	Kaudales Stria- tum	Frontalcortex	Hippocampus
Kraniales Stria- tum	-	< 0,05	< 0,0001	< 0,0001
Kaudales Stria- tum	< 0,05	-	< 0,0001	< 0,0001
Frontalcortex	< 0,0001	< 0,0001	-	0,85
Hippocampus	< 0,0001	< 0,0001	0,85	-

Tabelle 30: Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen der homo- und heterozygoten TNF-α-transgenen Mäuse

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest und wechselndem Referenz-Gehirnareal hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte in der Gruppe der BoDV-1-infizierten, hetero- und homozygot TNF-αtransgenen Mäuse.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte sind grau hinterlegt.

Das extrazellulär im Gehirnparenchym lokalisierte Lipocalin-2, welches sich als diffuse Braunfärbung darstellte, wird – entsprechend der Literatur – als sezerniertes Lipocalin-2 eingeordnet. Die Prozessierung sämtlicher immunhistologischer Schnitte erfolgte in einer immunhistologischen Färbung, so dass von die verschieden starken Intensitäten der immunhistologischen Färbung mit unterschiedlichen Mengen von Lcn2-Protein korrelieren sollten. Die verschiedenen Stufen der Farbintensität des sezernierten Lcn2 konnten daher den in Abbildung 16 gezeigten Kategorien (*Scores*) zugeordnet werden.



Abbildung 16: Scoring-System zur Auswertung von sezerniertem Lcn2

a: Geringgradiges extrazelluläres Lcn2-Signal (Score 1) im Bereich des Hippocampus von V72/13 (BoDV-1-infiziert, TNF-α-transgen (tg/tg), 42 dpi); 200fache Vergrößerung. b: Mittelgradiges extrazelluläres Lcn2-Signal (Score 2) im kranialen Striatum von V130/13; (BoDV-1-

b: Mittelgradiges extrazelluläres Lcn2-Signal (Score 2) im kranialen Striatum von V130/13; (BoDV-1infiziert, TNF-α-transgen (tg/tg), 49 dpi); 200fache Vergrößerung.

c: Hochgradiges extrazelluläres Lcn2-Signal (Score 3) im kaudalen Striatum von V84/13 (BoDV-1-infiziert, TNF-α-transgen (tg/tg), 42 dpi); 200fache Vergrößerung.

d: Insbesondere aktivierte Astrozyten (Pfeile), aber auch aktivierte Mikrogliazellen mit deutlicher Lcn2-Synthese könnten die Quelle des zerebralen extrazellulären Lcn2 darstellen. Kaudales Striatum von V72/13 (BoDV-1-infiziert, TNF-α-transgen (tg/tg), 42 dpi); 400fache Vergrößerung.

Es konnte ein statistisch signifikanter Einfluss (P < 0,01) des Gehirnareals auf den *Score* des immunhistologisch dargestellten sezernierten Lcn2 im Gehirnparenchym gezeigt werden. Ein Vergleich der beiden TNF- α -transgenen Mauslinien ergab jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des *Scores* des sezernierten Lcn2. Abbildung 17 zeigt daher die Häufigkeit der verschiedenen *Scores* in den verschiedenen Gehirnarealen sämtlicher untersuchter BoDV-1-infizierter TNF- α -transgener (tg/tg und tg/wt) der Tage 42 und 49 pi. Die Ergebnisse der statistischen Untersuchung der Haupteffekte von der Mauslinie und des Gehirnareals auf den *Score* der Lcn2-Sekretion zeigt Tabelle 31.





Häufigkeiten der verschiedenen scores des sezernierten Lcn2 in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten TNF-α-tg/wt- und –tg/tg-Mäuse 42 bzw. 49 dpi mit Darstellung der statistisch signifikanten Haupteffekte (*: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001). Die Klammern symbolisieren die jeweils gegenüber gestellten Gehirnareale (durchgehende Linie: ausgehend von Striatum I, gestrichelte Linie: ausgehend von Striatum II). Die Regionen von Thalamus, Kleinhirn und Rhombenzephalon wurden ebenfalls untersucht, da in diesen in keinem Fall sezerniertes Lcn2 nachweisbar war. Das Tier, bei welchem kein Lcn2 detektierbar war, wurde nicht in dieses Diagramm integriert.

Striatum I = kraniales Striatum, Striatum II = kaudales Striatum, Lcn2 = Lipocalin-2; Score 0: kein extrazelluläres Lcn2 nachweisbar, Score I: geringgradiges extrazelluläres Lcn2-Signal; Score II: mittelgradiges extrazelluläres Lcn2-Signal; Score III: hochgradiges extrazelluläres Lcn2-Signal (Scores – siehe auch Abbildung 16)

Haupteffek	te (p-Wert)	Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)	
Mauslinie	Gehirnareal	Mauslinie / Gehirnareal	
0,87	< 0,01	0,97	

Tabelle 31: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie und Gehirnareal auf die Menge von sezerniertem Lipocalin-2

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer zeroinflated generalized mixed model analysis mit Poissonverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkung.

Der Faktor "Mauslinie" umfasst lediglich die homo- und heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse, da die anderen Mauslinien das Merkmal Lipocalin-2-positiver Zellen nicht zeigten. Entsprechendes gilt auch für den Faktor "Gehirnareal", welcher nur die Areale vom kranialen und kaudalem Striatum, Frontalcortex und Hippocampus einschließt.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte bzw. Wechselwirkungen sind grau hinterlegt.

Aufgrund der auch in Abbildung 17 dargestellten Gehirnareal-abhängigen Unterschiede wurden die Häufigkeiten der verschiedenen Scores der Lcn2-Sekretion in den verschiedenen Gehirnarealen gegenübergestellt und verglichen (wechselndes Referenz-Gehirnareal; siehe Tabelle 32). Entsprechend der Ergebnisse der Untersuchungen zur Häufigkeit von zellulärem Lcn2 zeigte sich auch bei dieser Untersuchung hinsichtlich des extrazellulären Lcn2 ein deutlicher und statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Striatum (kranial und kaudal) und dem Frontalcortex sowie Hippocampus, welche deutlich geringere Mengen an extrazellulärem Lcn2 aufwiesen.

Tabelle 32: Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-Sekre-
tion in den verschiedenen Gehirnarealen der TNF-α-transgenen Mäuse

Haupteffekte (p-Wert)				
Gehirnareal	Kraniales Stria- tum	Kaudales Stria- tum	Frontalcortex	Hippocampus
Kraniales Stria- tum	-	0,20	< 0,05	< 0,01
Kaudales Stria- tum	0,20	-	< 0,01	<0,001
Frontalcortex	< 0,05	< 0,01	-	0,1
Hippocampus	< 0,01	<0,001	0,1	-

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer zeroinflated generalized mixed model analysis mit Poissonverteilung und anschließendem Waldtest und wechselndem Referenz-Gehirnareal hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte in der Gruppe der BoDV-1-infizierten, hetero- und homozygot TNF-αtransgenen Mäuse.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte sind grau hinterlegt.

Zur Klärung einer möglichen Kausalität zwischen der Expression bzw. Sekretion von Lipocalin-2 und der histopathologischen Läsionen wurde die histopathologische Auswertung der untersuchten Tiere bzw. Gehirnanschnitte, welche bereits im Rahmen der Arbeit von HIRZ (2017) erfolgte, mit einbezogen. So zeigten die BoDV-1-infizierten homozygot TNF-α-transgenen Mäuse entzündliche Veränderungen in Form geringgradiger (21 dpi) bzw. mittelgradiger (42 dpi) mononukleärer perivaskulärer Entzündungsinfiltrate insbesondere in der Region des frontalen Cortex, Striatums und Thalamus. In diesen Arealen war 21 dpi eine geringgradige, 42 dpi eine mittel- bis hochgradige Astrozytenaktivierung nachweisbar, welche eine ungewöhnliche Hypertrophie der Astrozyten aufwiesen.

Das histopathologische Bild der BoDV-1-infizierten heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse glich weitgehend dem der homozygot TNF-α-transgenen Tiere. Das Tier (V98/13), welches keine Lcn2-Expression zeigte, wies auch keine perivaskulären mononukleären Entzündungszellinfiltrate und lediglich einzelne meningeale Infiltrate auf sowie lediglich eine Aktivierung einzelner Astrozyten (persönliche Kommunikation von M. Hirz).

BoDV-1-infizierte Wildtyptiere zeigten ebenso wie alle nicht- und mock-infizierten Tiere zu keinem Zeitpunkt entzündliche Veränderungen. Die BoDV-1-infizierten TNFR1-k.o.-Tiere zeigten 21 dpi keine, nach 42 dpi bei einzelnen Tieren dezente meningeale mononukleäre Entzündungszellinfiltrate. Unter den TNFR2-k.o.-Mäusen wurden bei einzelnen Tieren 21 dpi geringgradige perivaskuläre mononukleäre Infiltrate nachgewiesen, bei den 42 dpi untersuchten Tieren waren derartige Veränderungen jedoch nicht detektierbar. Keine der zum geplanten Versuchszeitpunkt euthanasierten BoDV-1-infizierten TNFR1- und TNFR2-k.o.-Mausgruppen zeigten typische morphologische Veränderungen von Astrozyten, die zu einer Aktivierung dieser Zellen passen würden.

Die im Tierversuch verstorbenen (V67/14 (TNFR2-k.o.), V63/14 (TNFR2-k.o.), V306/14 (TNFR2-k.o.)) bzw. euthanasierten (V316/14 (TNFR1-k.o.)) Tiere, bei denen Hinweise auf einen Krampfanfall beobachtet worden waren, bzw. in einem Fall ein konkretes Krampfgeschehen gefilmt werden konnte (V67/14) (siehe auch HIRZ (2017)), zeigten ebenfalls eine intrazerebrale Lipocalin-2-Expression. Diese unterschied sich von dem Bild der Lipocalin-2-Expression der oben genannten TNF- α -transgenen Tiere (tg/tg und tg/wt). So fiel bei diesen Tieren auf, dass häufig Endothelzellen in allen Gehirnanschnitten eine Lcn2-Expression zeigten. Lediglich 2 der 4 Tiere zeigten auch positive Astrozyten und Mikrogliazellen in den untersuchten Anteilen des Striatums, frontalen Cortex, des Hippocampus und Thalamus (V67/14) bzw. im Falle von V316/14 lediglich in Hippocampus und Thalamus.

Die nachweislich an einem generalisierten epileptiformen Anfall verstorbene TNFR2-k.o.-Maus (V67/14) wies Lipocalin-2 in den Arealen des kranialen (49 Lcn2-positive Zellen in 5 HPF) und kaudalen Striatums (46 Lcn2-positive Zellen in 5 HPF), Frontalcortex (50 Lcn2-positive Zellen in 5 HPF), Hippocampus und Thalamus auf (jeweils 53 Lcn2-positive Zellen in 5 HPF). Im Gegensatz zu den Lcn2-positiven TNF-α-transgenen Mausgruppen, die vornehmlich eine astrozytäre Lcn2-Expression zeigten, entsprach der Anteil von Lcn2-exprimierenden Mikrogliazellen schätzungsweise dem Anteil der Lcn2-exprimierenden Astrozyten. Zudem war Lcn2 auch in ventrikulären Ependymzellen, meningealen Zellen und Endothelzellen feststellbar.

Wie bei den BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Tieren war die Lipocalin-2-Expression eng mit neuroinflammatorischen Läsionen verbunden. So wurden perivaskuläre mononukleäre Infiltrate im Bereich von Striatum, Frontalcortex und Thalamus und eine begleitende Astrozytenaktivierung beschrieben sowie eine geringgradige mononukleäre Meningitis diagnostiziert. Abbildung 18 zeigt immunhistologisch nachgewiesenes Lcn2 im Gehirn des verstorbenen TNFR2-k.o.-Tieres (V67/14).





a: Lcn2-positive Astrozyten (Pfeile) und längliche Zellen, die morphologisch zu Mikrogliazellen passen (Pfeilspitzen) in der Nähe eines Gefäßes mit deutlichen perivaskulären Infiltraten (Stern) im kranialen Striatum. 400fache Vergrößerung.

b: Nachweis von Lcn2 in ventrikulären Ependymzellen (Pfeil). 200fache Vergrößerung.

Bei beiden vorzeitig verstorbenen TNFR2-k.o.-Mäusen wurden histopathologisch keine (V63/14) bzw. nur dezente Entzündungszellinfiltrate (V306/14) in der Leptomeninx identifiziert. Entsprechend zeigte auch keines der Tiere Lcn2-positive Astrozyten oder Mikrogliazellen. Ausschließlich die zerebralen Endothelzellen wiesen Lcn2 auf; diese waren in sämtlichen Gehirnarealen zu finden (siehe auch Abbildung 19).



Abbildung 19: Endotheliales Lcn2 im Gehirn von einem vorzeitig verstorbenen BoDV-1infiziertem TNFR2-k.o.-Tier (V63/14)

Lcn2-positive Endothelzellen (Pfeile) im Thalamus von V63/14. 200fache Vergrößerung.

Das euthanasierte TNFR1-k.o.-Tier (V316/14) wies eine intrazerebrale Lcn2-Expression auf, die sich in diesem Fall aber wieder größtenteils (> 75 %) auf Astrozyten beschränkte und wesentlich dezenter als bei V67/14 ausfiel. Lcn2-positive Gliazellen und einzelne positive Endothelzellen konnten lediglich in den Arealen des Hippocampus (6 Lcn2-positive Zellen in 5 HPF) und Thalamus (1 Lcn2-positive Zelle in 5 HPF) beobachtet werden. Das histopathologische Bild ähnelte jedoch dem nach einem Krampfanfall verstorbenen Tier (V67/14). So beschrieb HIRZ (2017) die perivaskulären mononukleären Infiltrate in Frontalcortex, Striatum, Thalamus, Hippocampus und Kleinhirn als mittelgradig und erkannte darüber hinaus eine Astrozytenaktivierung in Frontalcortex, Thalamus und Hippocampus und mittelgradige mononukleären TNFR1-k.o.-Tieres (V316/14).



Abbildung 20: Lcn2 im Gehirn eines euthanasierten TNFR1-k.o.-Tieres (V316/14)

a: Lcn2-positive Astrozyten (Pfeil) sowie Endothelzellen (Pfeilspitzen) im Thalamus. 200fache Vergrößerung.

b: Lcn2-positive Astrozyten (Pfeile) sowie Endothelzellen (Pfeilspitzen) im Kleinhirn. 200fache Vergrößerung.

c: Meninx (Stern) mit einzelnen Lcn2-positiven Endothelzellen (Pfeilspitze) in meningealen Gefäßen mit perivaskulären Infiltraten. Zudem einzelne Lcn2-positive Astrozyten (Pfeil). 200fache Vergrößerung.

d: Einzelner Lcn2-positiver Astrozyt (Pfeil) im Hippocampus. 400fache Vergrößerung.

5.1.1.2 Immunhistologische Doppelmarkierung zum Nachweis von Lipocalin-2 und GFAP

Die immunhistologische Doppelmarkierung wurde exemplarisch an einem BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen (tg/wt) 49 dpi untersuchten Tier durchgeführt, um die Astrozyten sicher als die Lcn2-positiven Zellen identifizieren zu können. Die Abbildung 21 zeigt die Kolokalisation von GFAP (grün) als Astrozytenmarker und Lipocalin-2 (braun) in einzelnen sternförmigen Zellen.

Abbildung 21: Immunhistologische Doppelmarkierung zum Nachweis von Lcn2 und $\ensuremath{\mathsf{GFAP}}$



a: Hypertropher, GFAP- und Lcn2-positiver Astrozyt (Pfeil). 400fache Vergrößerung.
 b: Schlanke, GFAP-negative, Lcn2-positive Zelle. Die Morphologie passt zu einer Mikrogliazelle (Pfeil). 400fache Vergrößerung.

5.1.2 In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von Lipocalin-2-mRNA

Die ISH diente dem Nachweis Lcn2-mRNA-synthetisierender Zellen, so dass der Nachweis von Lcn2 auf Protein- bzw. RNA-Ebene differenziert werden konnte. Sollten Zellen sezerniertes Lcn2 lediglich aufnehmen, nicht aber selbst synthetisieren, wäre somit nur ein Nachweis von Lcn2 auf der Proteinebene möglich.

Die Untersuchungen wurden an Gehirnmaterial von BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen 21, 42 bzw. 49 dpi Mäusen, BoDV-1-infizierten heterozygoten TNF-α-transgenen 42 dpi Mäusen, BoDV-1 infizierten 21 bzw. 42 dpi infizierten Wildtyp-Mäusen sowie von den vorzeitig euthanasierten oder verstorbenen TNFR1- und TNFR2-k.o.-Tieren durchgeführt.

Ein positives Signal war als dunkelblau-violetter Farbniederschlag erkennbar, welcher sich intrazytoplasmatisch in der Nähe des Zellkernes befand.

Lcn2mRNA war nur in Zellen nachweisbar, deren Morphologie zu Astrozyten passte. Häufig waren auch deutliche Anzeichen der Hypertrophie, wie ein großer Nukleus sowie eine Vergrößerung des Zelldurchmessers, erkennbar. Dies steht im Kontrast zur immunhistologischen Untersuchung, bei der auch Lcn2 in Mikrogliazellen nachgewiesen wurde. In Abbildung 22 wird eine vergleichende Übersicht eines Gehirnareals mit Nachweis von zahlreichen Lcn2-mRNA-produzierenden Zellen bzw. der entsprechend fehlende Nachweis nach Inkubation mit *sense*-Sonde. Abbildung 23 zeigt aktivierte Astrozyten mit Lcn2-mRNA-Nachweis.

Abbildung 22: Nachweis von Lcn2-mRNA



a: Nachweis von Lcn2-spezifischer mRNA mittels ISH. Zahlreiche Zellen mit dunkelblau-violettem Farbniederschlag im Striatum eines BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Tieres 42 dpi (V72/13). 40fache Vergrößerung;

Insert: Astrozyt mit Nachweis von Lcn2-mRNA aus der Nähe, 400fache Vergrößerung b: Kein Nachweis eines Farbniederschlages in Zellen nach Auftragen der sense-Sonde im gleichen Hirnareal und Tier. 40fache Vergrößerung.



Abbildung 23: Lcn2-mRNA-positive Astrozyten

a: Lcn2-positive Astrozyten (Pfeile) im Striatum eines BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen (tg/wt) Tieres. Der Architekturverlust des Gewebes ist eine Folge der hochtemperierten Prozesse während der Insitu-Hybridisterung. 100fache Vergrößerung.

b: Einzelansicht von Lcn2-positiven Astrozyten (Pfeil) mit hypertropher Morphologie – erkennbar an dem blasig vergrößerten Zellkern (Pfeilspitze). 400fache Vergrößerung.

Lediglich bei BoDV-1-infizierten TNF- α -transgenen (tg/tg und tg/wt) Tieren war Lcn2-mRNA nachweisbar. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Lcn2-mRNA-Expression konnte in der Gruppe der BoDV-1-infizierten TNF- α -tg/tg Mäuse gezeigt werden, dass zu dem Zeitpunkt 21 dpi noch keine Lcn2-mRNA nachweisbar war, wohl aber 42 dpi und 49 dpi. Die statistische Auswertung der Lcn2-mRNA-positiven Zellen in den untersuchten Gehirnarealen der TNF- α -transgenen Mauslinien ergab einen statistisch signifikanten Effekt der Mauslinie und des Gehirnareals, zeigte darüber hinaus aber auch eine statistisch signifikante Wechselwirkung dieser beiden Faktoren (siehe auch Tabelle 33). Die statistisch signifikante Wechselwirkung deutet darauf hin, dass die Lcn2-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen Unterschiede zwischen den homo- und heterozygoten TNF- α -transgenen Mauslinien zeigte. Im Weiteren wird die Lcn2-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen Mauslinien beschrieben.

Tabelle 33: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie und des Gehirnareals auf die Zahl von Gliazellen mit Nachweis von Lcn2-mRNA

Haupteffek	te (p-Wert)	Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)	
Mauslinie	Gehirnareal	Mauslinie / Gehirnareal	
0.007	< 0.00001	0.03	

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit Poissonverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkung.

Der Faktor "Mauslinie" umfasst lediglich die homo- und heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse, da die anderen Mauslinien das Merkmal Lipocalin-2-positiver Zellen nicht zeigten. Entsprechendes gilt auch für den Faktor "Gehirnareal", welcher nur die Areale vom kranialen und kaudalem Striatum, Frontalcortex und Hippocampus einschließt.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte bzw. Wechselwirkungen sind grau hinterlegt.

Bei den untersuchten BoDV-1-infizierten homozygot TNF-α-transgenen Mäusen waren in den beiden Anteilen des Striatums die meisten Lcn2-mRNA-positiven Zellen auffindbar: Im Anschnitt des kranialen Striatums fanden sich durchschnittlich 7 positive Zellen in 5 HPF; der kaudal gelegene Anschnitt des Striatums übertraf diese Zahl mit 35 Lcn2-positiven Zellen. Mäßige Mengen waren auch im Frontalcortex (5 Zellen mit Lcn2-mRNA in 5 HPF) und Hippocampus (2 Zellen mit Lcn2-mRNA in 5 HPF) zu beobachten, während die Regionen von Thalamus und Klein- sowie Stammhirn keine positiven Zellen aufwiesen. In Abbildung 24 wird das Verteilungsmuster der Lcn2-mRNA in den verschiedenen Hirnarealen von allen untersuchten BoDV-1-infizierten homozygot TNF-α-transgenen Tieren (42 dpi und 49 dpi) dargestellt.



Abbildung 24: Lcn2-mRNA der BoDV-1-infizierten homozygot TNF-α-transgenen Mäuse

Dieses Boxplot-Diagramm zeigt die Anzahl von Zellen, in denen Lcn2-mRNA in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten homozygot TNF- α -transgenen Mäuse (42 dpi und 49 dpi) nachgewiesen werden konnte, mit Darstellung der statistisch signifikanten Haupteffekte (*: p < 0,05; ****: p < 0,0001). Die Klammern symbolisieren die jeweils gegenüber gestellten Gehirnareale. Es werden lediglich die Hirnareale dargestellt, in denen Lcn2 nachweisbar war.

Striatum I = kraniales Striatum, Striatum II = kaudales Striatum, Lcn2 = Lipocalin-2

Von den heterozygot TNF-α-transgenen Mäusen konnten lediglich 2 Tiere mittels ISH untersucht werden, von denen ein Tier keine Lcn2-mRNA in den untersuchten Hirnarealen aufwies. Es handelte sich dabei um das Tier (V98/13), welches auch immunhistologisch negativ für Lcn2 war. Das weitere heterozygot TNF-α-transgene Tier wies 31 Lcn2-positive Zellen in 5 HPF des kranialen Striatums, 30 Lcn2-positive Zellen im kaudalen Striatum sowie 7 bzw. 4 Lcn2-positive Zellen in den untersuchten Arealen von Frontalcortex und Hippocampus auf. Im Gegensatz zu den homozygot TNF-α-transgenen Tieren wiesen die beiden untersuchten Striatumsareale somit vergleichbare Zahlen Lcn2-positiver Zellen auf. Abbildung 25 zeigt eine Übersicht über die Verteilung der nachgewiesenen Lcn2mRNA im Gehirn der BoDV-1-infizierten heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse 42 Tage *post infectionem*.





Dieses Boxplot-Diagramm veranschaulicht die Anzahl von Zellen, in denen Lcn2-mRNA in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten heterozygot TNF-transgenen Mäuse (42 dpi) nachgewiesen werden konnte, mit Darstellung der statistisch signifikanten Haupteffekte (***: p < 0,001). Die Klammern symbolisieren die jeweils gegenüber gestellten Gehirnareale (durchgehende Linie: ausgehend von Striatum I, gestrichelte Linie: ausgehend von Striatum II).

Striatum I = kraniales Striatum, Striatum II = kaudales Striatum, Lcn2 = Lipocalin-2

Während bei den BoDV-1-infizierten homozygot TNF- α -transgenen Tieren statistisch signifikant (p < 0,0001) mehr Lcn2-mRNA-positive Zellen im kaudalen Striatum im Vergleich zu den Arealen des kranialen Striatums, Hippocampus und Thalamus beobachtet werden konnten (siehe auch Tabelle 34), zeigten die heterozygot TNF- α -transgene Maus zwar einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Striatumsarealen im Vergleich zu den Arealen des Hippocampus und Thalamus (siehe auch Tabelle 35). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem kranialen und kaudalen Striatum war nicht feststellbar.

Tabelle 34: Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-mRNA-
Expression in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten homozygot
TNF-α-transgenen Mäuse

Haupteffekte (p-Wert)				
Gehirnareal	Kraniales Stria- tum	Kaudales Stria- tum	Frontalcortex	Hippocampus
Kraniales Stria- tum	-	< 0,0001	0,06	0,36
Kaudales Stria- tum	< 0,0001	-	< 0,0001	< 0,0001
Frontalcortex	0,06	< 0,0001	-	0,57
Hippocampus	0,36	< 0,0001	0,57	-

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest und wechselndem Referenz-Gehirnareal hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte in der Gruppe der BoDV-1-infizierten, homozygot TNF-α-transgenen Mäuse (42 dpi und 49 dpi).

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte sind grau hinterlegt.

Tabelle 35: Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-mRNA-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse (tg/wt)

Haupteffekte (p-Wert)				
Gehirnareal	Kraniales Stria- tum	Kaudales Stria- tum	Frontalcortex	Hippocampus
Kraniales Stria- tum	-	0,90	< 0,001	< 0,001
Kaudales Stria- tum	0,90	-	< 0,001	< 0,001
Frontalcortex	< 0,001	< 0,001	-	0,37
Hippocampus	< 0,001	< 0,001	0,37	-

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest und wechselndem Referenz-Gehirnareal hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte in der Gruppe der BoDV-1-infizierten, heterozygot TNF-α-transgenen (tg/wt) Mäuse (42 dpi).

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte sind grau hinterlegt.

Grundsätzlich stimmte das Muster des Lcn2-mRNA Nachweises durch die ISH mit dem Nachweis von Lcn2 auf Proteinebene hinsichtlich der betroffenen Mausgruppen und Gehirnareale überein. Die Hypothese, dass die Astrozyten – insbesondere wenn diese morphologische Hinweise auf eine Aktivierung aufweisen – die Hauptquelle des intrazerebral synthetisierten Lcn2 darstellen, wurde durch die Ergebnisse der ISH weiter unterstützt. Jedoch war bei keinem der verstorbenen oder unplanmäßig euthanasierten Tiere durch die In-situ-Hybridisierung Lcn2mRNA darstellbar. Lcn2-mRNA in Endothelzellen, Mikrogliazellen und Ependymzellen war nicht nachweisbar.

5.2 Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen

5.2.1 Lcn2-Expression primärer muriner Astrozytenkulturen

Die primären Astrozytenkulturen der verschiedenen Mauslinien (Wildtyp, TNF- α -transgen (tgtg), TNFR1-k.o., TNFR2-k.o.) wurden hinsichtlich ihrer Lcn2-Expression zu verschiedenen Zeitunkten (7, 14, 21, 28 dpi) untersucht. Darüber hinaus wurden parallel GFAP als Astrozyten-Marker und das BoDV-1-Nukleoprotein zur Ermittlung der Infektionsrate durch eine Tripelmarkierung nachgewiesen. Nicht- und BoDV-1-infizierte Astrozytenkulturen wurden parallel untersucht. Die Untersuchungen dienten dazu, die Lipocalin-2-Expression der Astrozyten bei verändertem TNF- α -System (durch den Einsatz der verschiedenen Mauslinien) und der BoDV-1-Infektion zu ermitteln.

Die Zellkulturen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht. Waren in der DAPI-Kernfärbung Hinweise auf einen Zelluntergang (zum Beispiel pyknotischer Nukleus, Karyorrhexis) erkennbar oder zeigte die GFAP-Färbung deutliche Schäden des Zellkörpers, so wurden diese Zellen von der Untersuchung ausgeschlossen.

Grundsätzlich zeigte sich die GFAP-Expression als diffuses violettes zvtoplasmatisches Signal. Ausschließlich GFAP-positive Zellen wurden in die Auswertung einbezogen. In einer vorhergehenden Arbeit (HIRZ, 2017), in welcher die gleichen Mauslinien und Präparationsmethoden verwendet wurden, machte der Anteil der Astrozyten 96 - 98 % aus. Die Lipocalin-2-Expression war als leuchtend-grünes, leicht granuläres, perinukleär lokalisiertes Immunfluoreszenz-Signal erkennbar, welches eine Assoziation mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum nahe legt. Extrazellulär sezerniertes Lipocalin-2, welches zuvor im Paraffinschnitt immunhistologisch dargestellt werden konnte, war mit dieser Methode nicht nachweisbar. Das BoDV-1-Nukleoprotein war als leuchtend rotes, meist rundliches und deutlich abgegrenztes Signal erkennbar, welches sich meistens intranukleär befand und in der Regel mit einer zusätzlichen diffusen Rotfärbung des Zellkernes einherging bzw. in selteneren Fällen auch intrazytoplasmatisch als ebenfalls leuchtend rotes, gut abgegrenztes, rundliches Signal, meist in den astrozytären Fortsätzen, vorgefunden werden konnte. Astrozyten, welche sowohl Lipocalin-2-Antigen als auch BoDV-1-Nukleoprotein-Antigen aufwiesen, wurden gesondert gezählt, um eine direkte Assoziation von BoDV-1-Infektion und Lcn2-Expression in den einzelnen Zellen zu zeigen. Grundsätzlich wurden von jeder Mauslinie 2 Präparationen durchgeführt. Für die verschiedenen Parameter (Lcn2, BoDV-1) wurde dann jeweils der Mittelwert der jeweiligen Zählergebnisse berechnet.

Abbildung 26 zeigt den Nachweis von Lcn2, GFAP und BoDV-1 nach einer Immunfluoreszenz-Tripelmarkierung.


Abbildung 26: Nachweis von Lipocalin-2 und BoDV-1 in einer primären murinen Astro-zyten-Kultur von TNF- α -transgenen Mäusen

a: Deutliches intrazytoplasmatisches, perinukleäres granuläres Lcn2-Signal (grün, Pfeil) in einem Astrozyten 7 d nach BoDV-1-Infektion. Direkt benachbart liegt ein Astrozyt mit BoDV-1-Viruspartikeln (rot, Nachweis von BoDV-N) im Kern und Zytoplasma (Pfeilspitze), weitere BoDV-1-positive Viruspartikel werden ebenfalls durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Kerne der Zellen sind mit Hilfe von DAPI blau angefärbt. Das violette zytoplasmatische Signal dient der Identifizierung der Zellen als Astrozyten (violett, GFAP: glial acidic fibrillary protein). 200fache Vergrößerung.

b: Lcn2- und BoDV-1-N-Nachweis (Lcn2: Pfeil, BoDV-1-N: Pfeilspitze) in der Astrozytenkultur 21 d nach BoDV-1-Infektion. 200fache Vergrößerung.

c: Nachweis der BoDV-1-Infektion anhand rot fluoreszierender Antikörper, die das BoDV-1-Nukleoprotein nachweisen (Pfeilspitzen, hier: 2 gut abgegrenzte rote Signale), intranukleäre Lokalisation, 1000fache Vergrößerung

Die Zahlen von Astrozyten, in denen Lcn2 nachweisbar waren, waren vergleichbar zwischen den verschiedenen Mauslinien, so dass kein statistisch signifikanter Effekt der Mauslinie auf die Lipocalin-2-Expression beobachtet werden konnte. Die Untersuchungszeitpunkte (p < 0,00001) und der Infektionsstatus (p = 0,019) zeigten hingegen jeweils einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zahl Lcn2-positiver Zellen. Der Effekt der Untersuchungszeit-

punkte wurde jedoch überlagert durch statistisch signifikante Wechselwirkungen mit der Mauslinie (p = 0,005) und dem Infektionsstatus (p = 0,013). Dadurch ergibt sich ein unterschiedlich verlaufender Effekt der Untersuchungszeitpunkte zwischen den verschiedenen Mauslinien und infizierten bzw. nicht-infizierten Zellen. Im Folgenden werden die Astrozytenkulturen der verschiedenen Mauslinien daher einzeln beschrieben. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Einflüsse der Mauslinie, einer BoDV-1-Infektion und der Zeit in Kultur bzw. *post infectionem* auf die Zahl Lcn2-positiver Astrozyten sind in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und Zeit auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten *in vitro*

На	upteffekte (p-W	ert)	Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)			
Mauslinie	Infektion	Zeit	Mauslinie / Infektion	Mauslinie / Zeit	Infektion / Zeit	
0,14	0,019	< 0,00001	0,28	0,005	0,013	

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkungen.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte bzw. Wechselwirkungen sind grau hinterlegt.

Es zeigte sich kein signifikanter Effekt der Mauslinie oder des Untersuchungszeitpunktes auf

die BoDV-1-Infektionsrate der Astrozyten (siehe auch Tabelle 37).

Tabelle 37: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und Zeit auf die BoDV-1-Infektionsrate von Astrozyten bzw. auf die Zahl BoDV-1-infizierter Lcn2-positiver Astrozyten *in vitro*

Haupteffekte (p-Wert) für BoDV-1		Haupteffek für BoDV	te (p-Wert) /-1 + Lcn2	Zweifachwechselwirkungen (p-Wert) für BoDV-1 + Lcn2		
Mauslinie	Zeit	Mauslinie	Zeit	Mauslinie / Zeit		
0,46	0,31	0,06	0,29	0,10		

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit Poissonverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkungen (im Falle von BoDV-1 +Lcn2).

Im linksseitigen Teil der Tabelle werden die Haupteffekte für die Zahl BoDV-1-infizierter Zellen (Infektionsrate) beschrieben, im rechten Teil der Tabelle werden die Haupteffekte und Zweifachwechselwirkungen für die Zahl von Astrozyten dargestellt, welche sowohl BoDV-1-infiziert als auch Lcn2-positiv waren.

BoDV-1: Borna Disease Virus 1; Lcn2: Lipocalin-2; p-Wert: Signifikanzwert (propability)

5.2.1.1 Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten der Wildtyp-Mäuse (wt/wt)

Sowohl BoDV-1- als auch nicht-infizierte Astrozytenkulturen der Wildtypmäuse zeigten eine Lipocalin-2-Expression. Der Anteil nicht-infizierter Wildtyp-Astrozyten, in denen Lcn2 nachweisbar war, betrug von 0 (Präparation 1; 7 dpi) bis zu 15 Zellen (Präparation 1; 28 dpi) der

gezählten Astrozyten. BoDV-1-infizierte Wildtyp-Astrozytenkulturen wiesen Lcn2 in 0 (Präparation 1; 7 dpi) bis 45 (Präparation 2; 28 dpi) der gezählten Astrozyten auf. Die Zellen zeigten die grundsätzliche Tendenz einer über den Untersuchungszeitraum ansteigenden Lipocalin-2-Expression, welche in Abbildung 27 dargestellt ist. Zudem war ab dem 21. Tag eine leicht stärkere Lipocalin-2-Expression der BoDV-1-infizierten Astrozyten im Vergleich zu den nichtinfizierten Zellen erkennbar.





Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in nicht- bzw. BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen C57BL/6-Mäusen (Wildtyp) aus 2 Präparationen über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen pi.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; dpi = Tage nach Infektion (days post infectionem); BoDV-1: Borna Disease Virus 1

Die BoDV-1-Infektionsrate der Astrozyten war über den gesamten Untersuchungszeitraum gering und betrug zwischen 1 (Präparation 1: 7, 14 und 21 dpi; Präparation 2: 14 dpi) und bis zu 5 kultivierten Wildtyp-Astrozyten (Präparation 2; 28 dpi). In einzelnen BoDV-1-infizierten Astrozyten war ebenfalls Lcn2 nachweisbar, iedoch konnte

keine strikte Assoziation zwischen BoDV-1-Infektion und Lcn2-Expression festgestellt werden.

5.2.1.2 Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten TNF-α-transgener (tg/tg) Mäuse

Grundsätzlich sollte anhand der TNF-α-transgenen Mauslinie der Einfluss eines erhöhten

TNF- α -Spiegels auf die Lcn2-Expression untersucht werden. Da die in dieser Mauslinie erhöhte TNF- α -Expression jedoch neuronalen Ursprungs ist, kann in der astrozytären Zellkultur nicht mehr von einer TNF- α -Überexpression ausgegangen werden; die Zellen waren jedoch bereits in der Embryonal-/Fetalperiode erhöhten TNF- α -Werten ausgesetzt.

Sowohl die nicht-infizierten als auch die BoDV-1-infizierten Astrozyten wiesen einen deutlich Anstieg der Lcn2-Expression von Tag 7 pi im Vergleich zu den folgenden Zeitpunkten auf. Der Anteil Lcn2-positiver Zellen betrug zwischen 14 dpi und 28 dpi von 14 (1. Präparation; 14 dpi) bis zu 68 Zellen (1. Präparation; 21 dpi) bei den nicht-infizierten Astrozyten der TNF- α -transgenen Mäuse und zeigte damit eine ansteigende Tendenz. Bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten schwankte der Anteil Lcn2-positiver Astrozyten zwischen 49 (2. Präparation; 14 dpi) und 85 Zellen (1. Präparation; 21 dpi). Die BoDV-1-infizierten Kulturen wiesen im Mittel eine höhere Rate Lcn2-positiver Astrozyten auf als die nicht-infizierten Kulturen. Der Unterschied zwischen BoDV-1- und nicht-infizierten Kulturen war 14 dpi am größten. Eine Übersicht über den Verlauf der Lcn2-Expression bei den Astrozyten der TNF- α -transgenen Mäuse findet sich in Abbildung 28.





Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen homozygot TNF-α-transgenen Mäusen aus 2 Präparationen über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen post infectionem.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; dpi = Tage nach Infektion (days post infectionem); BoDV-1: Borna Disease Virus 1

Auch bei den Astrozyten der TNF-α-transgenen Mäuse war die Infektionsrate gering und betrug zwischen 0 (2. Präparation; 28 dpi) und 6 infizierte Zellen (1. Präparation; 14 dpi). Die Rate der Astrozyten, die BoDV-1-infiziert waren und zugleich Lcn2 aufwiesen betrug 3 bis 4 Zellen (1. Präparation; 14 dpi bzw. 21 dpi). Zu den Zeitpunkten 7 dpi und 28 dpi konnten keine Astrozyten beobachtet werden, die BoDV-1-infiziert waren und zugleich Lcn2 aufwiesen. Ein Einfluss des zeitlichen Verlaufs auf die Infektionsrate war nicht erkennbar.

5.2.1.3 Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten von TNFR1-k.o.-Mäusen

Die aus TNFR1-k.o.-Mäusen kultivierten Astrozyten zeigten zunächst eine geringe Zahl Lcn2positiver Zellen. So waren zum Zeitpunkt 7 dpi keine Lcn2-positiven Astrozyten in nicht-infizierten Astrozyten und lediglich ein Anteil von bis zu 4 Lcn2-positiven Astrozyten (Präparation 2; 7 dpi) in BoDV-1-infizierten Kulturen zu beobachten. An Tag 14 pi war ein Anstieg auf 14 Zellen bei den BoDV-1-infizierten Kulturen, jedoch nur 2 Lcn2-positive Zellen in den nichtinfizierten Kulturen zu finden. An Tag 21 und Tag 28 pi (war der Anteil Lcn2-positiver Astrozyten weiterhin moderat. Ein positiver Effekt der Zeit auf die Rate Lcn2-positiver Zellen (insbesondere zwischen Tag 7 und Tag 21) war erkennbar. Zudem zeigte sich eine Tendenz der höheren Lcn2-Expression bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten im Vergleich zu den nichtinfizierten Zellen. Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf und die Lipocalin-2-Expression zeigt Abbildung 29.



Abbildung 29: Lcn2-Nachweis mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Astrozyten der TNFR1-k.o.- Mäuse

Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen homozygot TNFR1-k.o-Mäusen aus 2 Präparationen über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen post infectionem.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; dpi = Tage nach Infektion (days post infectionem); BoDV-1: Borna Disease Virus 1

Die BoDV-1-Infektionsrate befand sich auch bei dieser Astrozytenkultur auf einem niedrigen Level zwischen 1 (Präparation 1; 14, 21 und 28 dpi) und 7 Zellen (Präparation 1; 7 dpi) und zeigte keine ansteigende Tendenz im Laufe des Untersuchungszeitraumes. Auch eine Assoziation mit einer verstärkten Lcn2-Expression der BoDV-1-infizierten Zellen konnte nicht festgestellt werden. Lediglich an Tag 14 der 1. Präparation war eine Zelle mit BoDV-1-Infektion und Lcn2-Expression nachweisbar.

5.2.1.4 Nachweis von Lcn2 und BoDV-1 bei nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten von TNFR2-k.o.-Mäusen

Die Astrozyten der TNFR2-k.o.-Mäuse zeigten an Tag 7 pi nur einen geringe Anteil Lcn2-positiver Astrozyten, nach 14 dpi war ein leichter Anstieg auf bis zu 5 Lcn2-positive Zellen bei den nicht-infizierten Astrozytenkulturen und 11 BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen erkennbar. Die Zahl Lcn2-positiver Zellen blieb dann an Tag 21 und 28 pi auf einem recht konstanten Level. Insgesamt ließ sich somit ein eine Zunahme der Lcn2-Expression der untersuchten Astrozyten über den Untersuchungszeitraum feststellen. Die BoDV-1-infizierten Kulturen zeigten eine leicht höhere Gesamtzahl Lcn2-exprimierender Astrozyten im Vergleich zu den nicht-infizierten Kulturen. Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf und das Ausmaß der Lipocalin-2Expression in den Astrozytenkulturen der TNFR2-k.o.-Mäuse zeigt Abbildung 30.





Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in nicht bzw. BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen homozygot TNFR2-k.o-Mäusen aus 2 Präparationen über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen post infectionem.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; dpi = Tage nach Infektion (days post infectionem); BoDV-1: Borna Disease Virus 1

Die BoDV-1-Inkubation der aus TNFR2-k.o.-Mäusen gewonnenen Astrozyten führte – wie auch bei den anderen Mauslinien – nur zu einer relativ geringen Infektionsrate von 0 (Präparation 1; 21 dpi) bis 4 Astrozyten (Präparation 2; 21 dpi), die sich über den Untersuchungszeitraum nicht bedeutend änderte. Ein Zusammenhang zwischen BoDV-1-Infektion und vermehrter Lcn2-Expression auf der Ebene der einzelnen Zelle war nicht darstellbar. Lediglich 21 dpi (Präparation 2) waren 2 BoDV-1-infizierte Lcn2-positive Zellen nachzuweisen.

5.2.1.5 Vergleich der Lcn2-Expression und BoDV-1-Infektion der verschiedenen Mauslinien

Bei vergleichender Betrachtung der Mauslinien fiel trotz fehlender statistischer Signifikanz (p = 0,14) ein insgesamt größerer Anteil Lcn2-positiver Astrozyten in den Kulturen TNF- α -transgener Mäuse im Vergleich zu den Kulturen der Wildtyp-Mäuse und denen der TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Mäuse auf.

Die BoDV-1-infizierten Kulturen der verschiedenen Mauslinien wiesen grundsätzlich eine höhere Zahl Lcn2-exprimierender Astrozyten auf als die entsprechenden nicht-infizierten Kulturen. Diese Beobachtung spiegelte auch der statistisch signifikante Effekt des Infektionsstatus auf die Lcn2-Expression (p = 0,019) wider. Dass der Effekt der BoDV-1-Infektion oftmals zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten schwankte, wird durch die statistisch signifikante Wechselwirkung (p = 0,013) zwischen dem Infektionsstatus und der Zeit hervorgehoben. Der statistisch signifikante Effekt des Untersuchungszeitpunktes auf die Rate Lcn2-positiver Zellen variierte zwischen den verschiedenen Mauslinien etwas und schlug sich als statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen Mauslinie und Zeit (p = 0,005) nieder. Grundsätzlich war eine ansteigende Tendenz der Lcn2-Expression über den Untersuchungszeitraum erkennbar.

Einen vergleichenden Überblick über die Zahlen Lcn2-positiver Zellen in den Astrozytenkulturen der verschiedenen Mauslinien bietet Abbildung 31.





Vergleichende Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in nicht oder BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen homozygot C57BL/6-Mäusen (Wildtyp), TNF-α-transgenen Mäusen, TNFR1k.o.- und TNFR2-k.o-Mäusen aus 2 Präparationen über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen post infectionem.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; dpi = Tage nach Infektion (days post infectionem)

Die Zahl BoDV-1-infizierter Zellen war in sämtlichen untersuchten Mauslinien gering. Es war weder ein zeitlicher Trend zu einer möglicherweise ansteigenden Infektionsrate erkennbar, noch unterschieden sich die aus den verschiedenen Mauslinien gewonnenen Astrozytenkulturen untereinander hinsichtlich ihrer BoDV-1-Infektionsrate. Einen Überblick über die BoDV-1-Infektionsrate der verschiedenen Astrozytenkulturen zeigt die folgende Abbildung 32.



Abbildung 32: BoDV-1-Infektionsrate der verschiedenen Astrozytenkulturen

Vergleichende Darstellung der Anzahl BoDV-1-infizierter Zellen in Astrozytenkulturen aus neonatalen homozygot C57BL/6-Mäusen (Wildtyp), TNF-a-transgenen Mäusen (tg/tg), TNFR1-k.o.- und TNFR2k.o-Mäusen aus 2 Präparationenüber einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen post infectionem. I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Bo18: Bezeichnung des Antikörpers, der das BoDV-1-Nukleoprotein detektiert; BoDV-1: Borna Disease Virus 1; dpi = Tage nach Infektion (days post infectionem); Lcn2 = Lipocalin-2

5.2.2 Lcn2-Expression der primären murinen Astrozytenkulturen nach TNFα-Behandlung

Das Ziel der Behandlung der primären murinen Astrozytenkulturen mit TNF- α war die Untersuchung des akuten Effekts von TNF- α auf die astrozytäre Lipocalin-2-bei verschiedenen Ausgangssituationen des TNF- α -Systems. Insbesondere sollten hierbei mögliche Unterschiede zwischen den Mauslinien (TNF-tg, wt, TNFR1-k.o. und TNFR2-k.o.), der Einfluss der BoDV-1-Infektion und der TNF- α -Konzentration (0, 10 oder 100 ng/ml TNF- α) sowie der zeitliche Verlauf des Lcn2-Expressionsmusters (24, 48 oder 72 h nach Beginn der Inkubation) evaluiert werden.

5.2.2.1 Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der Wildtyp-Mäuse

Die Behandlung mit TNF- α führte in den Kulturen der Wildtyp-Astrozyten zu einer deutlichen Aufregulation von Lcn2. Es konnte kein Unterschied zwischen den TNF- α -Konzentrationen von 10 bzw. 100 ng/ml beobachtet werden. Die Lcn2-Expression der Wildtyp-Astrozyten zeigte keine auffälligen Differenzen zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Ein 16stündiger TNF- α -Stimulus reichte demnach in der Astrozytenkultur der Wildtyp-Mäuse aus, um die Lcn2-Expression zu steigern und aufrechtzuerhalten. Auch die BoDV-1-Infektion zeigte keinen Einfluss auf die Lcn2-Expression dieser TNF- α -behandelten Astrozyten.

Einen Überblick über die Lcn2-Expression der TNF-α-behandelten Astrozyten ohne bzw. mit BoDV-1-Infektion findet sich in Abbildung 33.

Abbildung 34 zeigt beispielhaft die Lcn2-Expression in unbehandelten und TNF-α-behandelten Astrozyten.



Abbildung 33: Lcn2-Expression der TNF-α-behandelten Astrozyten von Wildtyp-Mäusen

Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen bei unbehandelten bzw. mit TNF-α inkubierten BoDV-1bzw. nicht-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen C57BL/6-Mäusen (Wildtyp) aus 2Präparationen , die zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h oder 72 h fixiert wurden.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; n. inf: nicht infiziert; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α (tumor necrosis factor-α); unbeh.: unbehandelt



Abbildung 34: Lcn2-Nachweis in primären murinen Astrozyten nach TNF-α-Behandlung

a: Lcn2-Nachweis in BoDV-1-infizierten Wildtyp-Astrozyten 24 h nach Behandlung mit 10 ng/ml TNF-α; 200fache Vergrößerung.

b: Zum Vergleich: Lcn2-Nachweis in unbehandelten BoDV-1-infizierten Wildtyp-Astrozyten; 200fache Vergrößerung.

Lcn2 erkennbar als grünes Floureszenzsignal.

5.2.2.2 Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der TNF-α-transgenen Mäuse

Im Vergleich zu den unbehandelten Astrozyten der TNF-transgenen Mäuse stieg die Lcn2-Expression nach TNF- α -Behandlung deutlich an. Die verschiedenen TNF- α -Konzentrationen führten nicht zu Unterschieden der Lcn2-Expression. Nach 24 h war die Zahl Lcn2-positiver Astrozyten in den BoDV-1-infizierten Kulturen TNF- α -transgener Mäuse geringer als zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h. In den nicht-infizierten Kulturen war die Lcn2-Expression zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten hingegen weitgehend vergleichbar. Ein Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die Lcn2-Expression der TNF- α -behandelten Astrozyten der TNF- α transgenen Mäuse (tg/tg) war nicht feststellbar.

Die Lcn2-Expression der TNF- α -behandelten nicht- oder BoDV-1-infizierten Astrozyten von TNF- α -transgenen Mäusen zeigt Abbildung 35.



Abbildung 35: Lcn2-Expression der un- bzw. TNF- $\!\alpha$ -behandelten Astrozyten TNF- $\!\alpha$ -transgener Mäuse

Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen (Mittelwerte aus den 2 Präparationen) in unbehandelten bzw. mit TNF- α inkubierten BoDV-1- bzw. nicht-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen TNF- α -transgenen Mäusen, die zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h oder 72 h fixiert wurden.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; n. inf: nicht infiziert; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α (tumor necrosis factor-α); unbeh.: unbehandelt

5.2.2.3 Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der TNFR1-k.o.-Mäuse

Die Behandlung der TNFR1-k.o.-Astrozyten führte zu keiner Aufregulation von Lcn2. Es waren auch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen TNF-α-Konzentrationen von 10 und 100 ng/ml zu beobachten. Die Lcn2-Expression der TNFR1-k.o.-Astrozyten war zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten vergleichbar niedrig. In den BoDV-1-infizierten Kulturen wurden grundsätzlich mehr Lcn2-positive Astrozyten detektiert als in nicht-infizierten Kulturen.

Eine Übersicht über die Anzahl Lcn2-positiver Zellen in der TNFR1-k.o.-Astrozyten-Kultur ohne bzw. mit TNF-α-Behandlung zeigt Abbildung 36.





Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in unbehandelten bzw. mit TNF-α inkubierten BoDV-1bzw. nicht-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen TNFR1-k.o.-Mäusen aus 2 Präparationen, die zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h oder 72 h fixiert wurden.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; n. inf: nicht infiziert; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α (tumor necrosis factor-α); unbeh.: unbehandelt

5.2.2.4 Lcn2-Expression von TNF-α-behandelten Astrozyten der TNFR2-k.o.-Mäuse

Die Behandlung mit TNF-α führte in den Kulturen der TNFR2-k.o.-Astrozyten zu einer geringfügigen Aufregulation von Lcn2. Unterschiede zwischen den TNF-α-Konzentrationen von 10 bzw. 100 ng/ml fanden sich nicht. Zum Untersuchungszeitpunkt 72 h war eine geringfügig höhere Zahl Lcn2-exprimierender Astrozyten nach TNF-α-Behandlung im Vergleich zu den vorangegangenen Zeitpunkten festzustellen. Insgesamt waren in den BoDV-1-infizierten Kulturen mehr Lcn2-positive Astrozyten als in den nicht-infizierten Kulturen nachweisbar. Eine Übersicht der Zahlen Lcn2-positiver Astrozyten der TNFR2-k.o.-Mäuse zeigt Abbildung 37.

Abbildung 37: Lcn2-Expression der un- bzw. TNF- α -behandelten TNFR2-k.o.-Astrozyten



Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in unbehandelten bzw. mit TNF-α inkubierten BoDV-1bzw. nicht-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen TNFR2-k.o.-Mäusen aus 2 Präparationen, die zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h oder 72 h fixiert wurden.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; Lcn2 = Lipocalin-2; n. inf: nicht infiziert; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α (tumor necrosis factor-α); unbeh.: unbehandelt

5.2.2.5 Vergleich der Lcn2-Expression der Astrozyten verschiedener Mauslinien nach TNF-α-Behandlung

Die TNF-α-Behandlung zeigte grundsätzlich einen hochsignifikanten Effekt auf die Lcn2-Expression der Astrozyten. Hierbei waren deutliche Diskrepanzen zwischen den Kulturen der verschiedenen Mauslinien erkennbar: Während die TNF-α-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der Zahlen Lcn2-positiver Astrozyten in den Kulturen der TNF-a-transgenen und Wildtyp-Mäuse führte, war kein deutlicher bzw. deutlich schwächerer TNF-α-assoziierter Effekt in den Kulturen der Kulturen beider TNFR-k.o.-Mauslinien erkennbar. Im Falle der TNFR1-k.o-Mauslinie zeigte sich dieser Effekt durch die statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen dem Faktor Mauslinie und TNF-α, welche auf eine Divergenz hinsichtlich der Lcn2-Expression nach TNF-α-Behandlung zwischen den Mauslinien hinweist: Im Falle der TNFR2-k.o.-Mauslinie war keine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen TNF-α-Behandlung und Mauslinie beim Vergleich mit der TNF-α-transgenen Mauslinie feststellbar. Tatsächlich zeigten die Astrozyten der TNFR2-k.o.-Mauslinie eine höhere Lcn2-Expression nach TNF-α-Behandlung als die unbehandelten Astrozyten. Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-Expression durch die verschiedenen TNF-α-Konzentrationen (10 bzw. 100 ng/ml) waren nicht erkennbar. Die statistische Gegenüberstellung der Astrozyten der verschiedenen Mauslinien im Hinblick auf die Lcn2-Expression nach TNF-α-Behandlung ergab einen statistisch hochsignifikanten Unterschied zwischen den Astrozyten der TNF-α-transgenen Mäuse im Vergleich zu den Astrozyten der TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Mäuse. Diese wiesen eine deutlich niedrigere Lcn2-Expression auf (siehe auch Tabelle 38). Der Vergleich der Lcn2-Expression von Astrozyten der Wildtyp- und TNF-α-transgenen Mäuse zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. Die Zahlen Lcn2-positiver Astrozyten waren vergleichbar hoch in den Kulturen beider Mauslinien. Eine grundsätzliche Gegenüberstellung der Lcn2-Expression nach TNF-α-Behandlung in den verschiedenen Astrozytenkulturen findet sich in Abbildung 38.

Der Untersuchungszeitpunkt zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Lcn2-Expression nach TNF-α-Behandlung bei vergleichender Betrachtung der TNF-α-transgenen und Wildtyp-Mauslinie. Der Vergleich der astrozytären Lcn2-Expression der TNF-α-transgenen Mauslinie zur TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Mauslinie zeigte einen statistisch signifikanten Effekt der Zeit auf die Lcn2-Expression. Die ebenfalls statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Infektionsstatus wies jedoch darauf hin, dass der zeitliche Verlauf der Lcn2-Expression zwischen den nicht- und BoDV-1-infizierten Astrozyten variierte. Bei Betrachtung der Lcn2-Expression der Astrozyten über die verschiedenen Mauslinien hinweg war kein gerichteter Effekt der Zeit erkennbar, das heißt, zum Teil wurde eine ansteigende zum Teil eine abfallende Tendenz der Lcn2 über die Zeit festgestellt (siehe auch Abbildung 32 und Tabelle 38).

Der Effekt des Infektionsstatus auf die Zahl Lcn2-positiver Astrozyten war bei den Vergleichen zwischen den verschiedenen Mauslinien statistisch signifikant (siehe Tabelle 38). Dennoch war das Bild heterogen. Die Astrozyten der Wildtyp-Mäuse zeigten nach BoDV-1-Infektion eine höhere Zahl Lcn2-positiver Astrozyten. Bei den Astrozyten der TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Mäuse waren ebenfalls mehr Lcn2-positive Zellen nach BoDV-1-Infektion zu finden, allerdings waren dennoch nur wenige Astrozyten mit Lcn2-Expression zu beobachten. Ausnahme waren die Kulturen der TNF- α -transgenen Mäuse, die eine höhere Zahl Lcn2-exprimierender Zellen in den nicht-infizierten Kulturen aufwiesen. Insgesamt ließ sich eine Tendenz zu vermehrter Lcn2-Expression nach TNF- α -Behandlung bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten feststellen (siehe auch Abbildung 38).

Der statistische Vergleich von Astrozyten der TNF-α-transgenen Mauslinie mit Astrozyten der anderen Mauslinien (Wildtyp-, TNFR1-k.o.- oder TNFR2-k.o.) wird in Tabelle 38 beschrieben.





118

Tabelle 38: Vergleich zwischen den Astrozytenkulturen der TNF-α-transgenen Mäuse im Vergleich zu den Astrozyten der Wildtyp-, TNFR1-k.o.- sowie TNFR2-k.o.-Mäuse: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion, Zeit und TNF-α auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten *in vitro*

Vergleich	Haupteffekte (p-Wert)				Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)					
	Maus- linie	Infek- tion	Zeit	TNF-α	Maus- linie / In- fektion	Maus- linie / Zeit	Maus- linie / TNF-α	Infek- tion / Zeit	Infek- tion / TNF-α	Zeit / TNF- α
tg/tg: wt/wt	0,7	0,03	0,5	< 0,0001	0,08	0,001	0,03	0,003	0,9	0,3
tg/tg: TNFR1-k.o.	0,00001	0,00084	0,004	< 0,00001	0,02	0,8	< 0,00001	0,00005	0,9	0,9
tg/tg: TNFR2-k.o.	0,0001	0,002	0,003	< 0,00001	0,06	0,3	0,3	0,00003	0,9	0,7

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkungen. Es wurden jeweils nur die Kulturen der TNF-α-transgenen Mäuse gegen die der Wildtyp-Mäuse oder einer der TNFR-k.o.-Mäuse gegeneinander gerechnet.

tg/tg: homozygot TNF-α-transgen, wt/wt: homozygot Wildtyp

p-Wert: Signifikanzwert (propability); signifikante Effekte bzw. Wechselwirkungen sind grau hinterlegt.

5.2.3 Lcn2-Expression der primären murinen Astrozytenkulturen nach IFNγ/LPS-Behandlung

Die verschiedenen Astrozytenkulturen wurden mit IFN-γ und LPS behandelt, die als typische Induktoren einer klassischen proinflammatorischen Aktivierung von Astrozyten gelten. Ziel der Untersuchung war es, die Lcn2-Expression nach diesem Stimulus bei den Astrozytenkulturen der verschiedenen Mauslinien vergleichend zu betrachten. Da Lipocalin-2 auch als Marker der klassischen Aktivierung von Astrozyten bezeichnet wird, war eine Zunahme der Lcn2-Expression zu erwarten.

In sämtlichen Astrozytenkulturen konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation mit LPS/IFN- γ die Zahl Lcn2-positiver Astrozyten statistisch signifikant (p < 0,00001, siehe auch Tabelle 39) anstieg. Tabelle 39 zeigt die Ergebnisse der statistischen Untersuchung im Hinblick auf die Lcn2-Expression nach LPS/IFN- γ -Behandlung der verschiedenen Mauslinien.

Die untersuchten Astrozyten der Wildtyp- und TNF- α -transgenen Mauslinien zeigten fast gänzlich eine Lcn2-Expression nach dem LPS/IFN- γ -Stimulus. Die TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o.-Astrozytenkulturen wiesen eine vergleichsweise geringere Rate Lcn2-positiver Astrozyten auf als die Astrozyten der Wildtyp- und TNF- α -transgenen Tiere. Dieser Effekt wird auch durch die statistisch signifikante Wechselwirkung der Mauslinie mit der Behandlung durch LPS/IFN- γ (p < 0,001; siehe auch Tabelle 39) beschrieben. Abbildung 39 zeigt beispielhaft die Lcn2-Expression von unbehandelten bzw. LPS/IFN- γ -behandelten Wildtyp-Astrozyten.

Ein Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die Zahl Lcn2-positiver Astrozyten war in keiner der untersuchten Astrozytenkulturen darstellbar und auch nicht statistisch signifikant. Einen Überblick über die durchschnittlichen Zahlen Lcn2-positiver Astrozyten der verschiedenen Mauslinien nach Behandlung mit LPS/IFN-γ bietet Abbildung 40. Abbildung 39: Lcn2-Expression in primären murinen Astrozytenkulturen nach IFN-γ-/LPS-Behandlung



a: Astrozytäre Lcn2-Expression nach IFN-γ-/LPS-Behandlung: Deutliches perinukleäres, granuläres Lcn2-Signal (grün) in der Mehrheit von Astrozyten (blau: Kernfärbung, zytoplasmatisches violettes Signal: GFAP als Astrozytenmarker), die aus Wildtyp-Mäusen (wt/wt) kultiviert und nicht infiziert wurden; 200fache Vergrößerung.

b: Nicht-behandelte Astrozyten ohne Lcn2-Nachweis; 400fache Vergrößerung





Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in nicht-infizierten bzw. BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen homozygot C57BL/6-Mäusen (Wildtyp), TNF-α-transgenen Mäusen (tg/tg), TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o-Mäusen aus 2 Präparationen ohne bzw. nach LPS/IFN-γ-Behandlung über 16 h.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; BoDV-1: Borna Disease Virus 1; Lcn2 = Lipocalin-2; IFN-y: Interferon-gamma; LPS: Lipopolysaccharid.

Tabelle 39: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und LPS/IFN-γ auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten *in vitro*

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)			
Mauslinie	Infektion	LPS+IFN-y	Mauslinie / Infektion	Mauslinie / LPS+IFN-γ	Infektion / LPS+IFN-γ	
0,7	0,7	< 0,00001	0,9	< 0,001	0,3	

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkungen.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); IFN-y: Interferon-gamma; LPS: Lipopolysaccharid; signifikante Effekte bzw. Wechselwirkungen sind grau hinterlegt.

5.2.4 Lcn2-Expression der primären murinen Astrozytenkulturen nach IL-4-Behandlung

Das Ziel der Inkubation der murinen Astrozyten mit IL-4 war, den Einfluss dieses Zytokins, welches eine antiinflammatorische Polarisierung von Astrozyten induzieren soll, auf die Lipocalin-2-Expression, die ja eher mit proinflammatorischen Prozessen assoziiert sein soll, zu untersuchen. Dabei war insbesondere von Interesse, ob die Astrozyten der verschiedenen Mauslinien möglicherweise aufgrund ihrer Unterschiede im TNF-System verschieden auf die Behandlung reagierten. Darüber hinaus sollte der mögliche Einfluss der BoDV-1-Infektion auf das Verhalten der Astrozyten untersucht werden.

Die Behandlung mit IL-4 führte zu keinem signifikanten Effekt auf die astrozytäre Lcn2-Expression (siehe auch Tabelle 40). In den Astrozytenkulturen der TNF-α-transgenen und Wildtyp-Mäuse war jedoch eine Tendenz zu einer verminderten Lcn2-Expression erkennbar. Die TNFR1- und TNFR2-k.o.-Astrozyten zeigten keine Tendenz einer abnehmenden Lcn2-Expression nach IL-4-Behandlung. Ein statistisch signifikanter Einfluss der Mauslinie auf die Lcn2-Expression war nicht nachweisbar (siehe auch Tabelle 40). Dass die Astrozyten der verschiedenen Mauslinien nach IL-4-Behandlung unterschiedlich reagierten beschreibt die statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen Mauslinie und IL-4 (siehe auch Tabelle 40). Abbildung 41 zeigt die Lcn2-Expression ohne bzw. nach IL-4-Behandlung in den Astrozytenkulturen der verschiedenen Mauslinien.

Ein Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die Zahl Lcn2-positiver Zellen war nicht ersichtlich. Die statistischen Ergebnisse sind in Tabelle 40 dargestellt.



Abbildung 41: Anzahl Lcn2-positiver Astrozyten in den verschiedenen Astrozytenkulturen mit bzw. ohne IL-4-Behandlung

Vergleichende Darstellung der Anzahl Lcn2-positiver Zellen in nicht-infizierten bzw. BoDV-1-infizierten Astrozytenkulturen aus neonatalen homozygot C57BL/6-Mäusen (Wildtyp), TNF-α-transgenen Mäusen (tg/tg), TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o-Mäusen aus 2 Präparationen ohne bzw. nach IL-4-Behandlung über 16 h.

I: Konfidenzintervall (95 %); #1 bzw. #2: 1. bzw. 2. Präparation; BoDV-1: Borna Disease Virus 1; Lcn2: Lipocalin-2; IL-4: Interleukin 4.

Tabelle 40: Vergleich der: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und IL-4 auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten *in vitro*

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)			
Mauslinie	Infektion	IL-4	Mauslinie Infek- tion	Mauslinie IL-4	Infektion LPS/IFN-γ	
0,2	0,8	0,09	0,2	< 0,001	0,3	

Die statistische Untersuchung erfolgte mittels einer generalized mixed model analysis mit negativer Binomialverteilung und anschließendem Waldtest hinsichtlich der entsprechenden Haupteffekte und Zweifachwechselwirkungen.

p-Wert: Signifikanzwert (propability); IL-4: Interleukin-4; signifikante Effekte bzw. Wechselwirkungen sind grau hinterlegt.

6 DISKUSSION

Diese Arbeit verfolgte durch die In-vivo-Untersuchung das Ziel, das zelluläre und regionale Expressionsmuster von Lipocalin-2 im Gehirn bei neuroinflammatorischen und prokonvulsiven Prozessen nach BoDV-1-Infektion von Mäusen zu evaluieren. Die Untersuchung von Mauslinien mit Unterschieden hinsichtlich ihrer zerebralen TNF-α-Expression (Wildtyp, TNF-α-transgen, TNFR1-k.o. und TNFR2-k.o.) und damit einhergehenden Differenzen hinsichtlich des zerebralen Zytokinmilieus, verschiedenen Ausprägungen neuroinflammatorischer Läsionen sowie einer unterschiedlich starken Empfänglichkeit für die Induktion epileptiformer Krämpfe infolge der BoDV-1-Infektion sollte mögliche Einflüsse auf die Lcn2-Expression aufzeigen. In der Literatur ist die Assoziation zwischen einer vermehrten zerebralen Lcn2-Expression und neuroinflammatorischen Veränderungen bereits in vielen Fällen beschrieben (CHAKRABORTY et al., 2012; JHA et al., 2015). Zahlreiche Autoren propagieren eine zentrale Rolle von Lipocalin-2 im Entzündungsgeschehen als proinflammatorisches Agens (NAM et al., 2014; NI et al., 2015; RATHORE et al., 2011; SUK, 2016). TNF-α kann über einen TNFR1-vermittelten Signalweg die Expression von Lipocalin-2 in kultivierten Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen induzieren (NAUDE et al., 2012). Mit Hilfe der untersuchten Mauslinien sollte in dieser Arbeit die TNF-α-induzierte und TNFR1-mediierte Lipocalin-2-Expression in vivo überprüft werden.

Die In-vitro-Untersuchungen fokussierten sich auf die Lipocalin-2-Expression von primären Astrozytenkulturen verschiedener Mauslinien mit genetischen Veränderungen des TNF-g-Systems ohne bzw. nach BoDV-1-Infektion sowie nach zusätzlicher pro- bzw. antiinflammatorischer Stimulation. Astrozyten wurden bereits als Hauptquelle der zerebralen Lipocalin-2-Synthese beschrieben (BI et al., 2013; LEE et al., 2009). Zudem beruhte die Wahl dieses Zelltyps auf Erkenntnissen, dass Astrozyten – ähnlich der Mikrogliazellen – im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse entgegen gerichtete funktionelle Zustände annehmen können. Dieser Prozess wird auch als "funktionelle Polarisierung" bezeichnet und geht mit einem pro- bzw. antiinflammatorischen Verhalten der Gliazelle einher, bei dem Lcn2 eine regulatorische Funktion im Sinne eines proinflammatorischen Zytokins zukommen soll (JANG et al., 2013a; JHA et al., 2015). Die Beobachtung in vorausgegangenen Arbeiten von SCHAUDIEN (2007) und HIRZ (2017), dass die TNF-α-transgenen Mäuse nach experimenteller BoDV-1-Infektion neben den typischen perivaskulären mononukleären Infiltraten häufig abnorm hypertrophe Astrozyten mit einem blasig erscheinenden Nukleus zeigten, warf die Frage nach dem zugrundeliegenden Phänotyp bzw. funktionellen Zustand dieser Astrozyten infolge der BoDV-1-Infektion auf. Nachdem Untersuchungen zum Zelluntergang dieser Astrozyten als mögliche Ursache dieses Phänotyps negativ verliefen (HIRZ, 2017), könnten Untersuchungen zur Lipocalin-2Expression neue Schlüsse über den Funktionszustand der Zellen erlauben. Durch die Behandlung der Astrozytenkulturen mit pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokinen sollte darüber hinaus die Reaktion der Lcn2-Synthese untersucht und dabei Unterschiede zwischen BoDV-1infizierten und nicht infizierten Astrozyten abgeglichen werden sowie mögliche Einflüsse durch die Unterschiede des TNF-α-Systems der jeweiligen Mauslinien bestimmt werden.

6.1 In-vivo-Untersuchungen

6.1.1 Immunhistologischer Nachweis von Lipocalin-2

Selektive Lcn2-Expression in einzelnen BoDV-1-infizierten Mausgruppen

Die vermehrte zerebrale Synthese von Lipocalin-2 infolge der Infektion mit einem neurotropen Virus wurde bereits von NOCON et al. (2014) beschrieben: Die Infektion mit dem West-Nil-Virus resultierte innerhalb weniger Tage in einer deutlichen Lcn2-Aufregulation begleitet von einer ausgeprägten Entzündungszellinfiltration. Im Falle von BoDV-1 reichte die alleinige Virusinfektion nicht aus, um eine vermehrte zerebrale Lcn2-Synthese zu induzieren. So war die Lcn2-Expression auf die BoDV-1-infizierten Mäuse mit neuronaler TNF-α-Überexpression (TNF-α-transgen: tg/tg und tg/wt) beschränkt, welche zudem deutliche neuroinflammatorische Reaktionen (ab 42 dpi) aufwiesen. Das vollständige Fehlen von Lipocalin-2 in den Mausgruppen, welche keine bzw. nur geringgradige entzündliche Läsionen im Gehirn aufwiesen, stimmte mit der Beobachtung verschiedener Autoren überein, die keine Lcn2-mRNA bzw. - proteine in physiologischem, das heißt nicht inflammatorisch verändertem Gehirngewebe nachweisen konnten (GARAY-ROJAS et al., 1996; IP et al., 2011; ZAMANIAN et al., 2012). NAUDE et al. (2012) und CHIA et al. (2011) berichten hingegen von basalen Lcn2-mRNA- und –proteinspiegeln auch im normalen Hirngewebe von Mensch bzw. Ratte und wiesen geringe Mengen Lcn2 in pyramidalen Neuronen bzw. Astrozyten nach.

Die starke Aufregulation der zerebralen Lcn2-Expression und -sekretion unter neuroinflammatorischen Bedingungen unterschiedlichster Ätiologien ist weitreichend in der Literatur beschrieben (AL NIMER et al., 2016; CHIA et al., 2015; IP et al., 2011; JIN et al., 2014a; JIN et al., 2014b; MARQUES et al., 2012; NAUDE et al., 2012; NOCON et al., 2014; XING et al., 2014). Proinflammatorische Zytokine, insbesondere das über den TNFR1 wirkende TNF- α , sind grundsätzlich potente Induktoren einer vermehrten Lipocalin-2-Expression (NAUDE et al., 2012). Es ist daher ein kausaler Zusammenhang zwischen den erhöhten zerebralen TNF- α -Spiegeln der TNF- α -transgenen Mäuse dieser Studie, der damit einhergehenden Neuroinflammation und der Lcn2-Expression zu sehen.

SCHAUDIEN (2007) und KRAMER et al. (2012) untersuchten die gleichen TNF-α-transgenen Mauslinien nach intrazerebraler BoDV-1-Infektion, zeigten jedoch, dass bei den TNF-α-transgenen Tieren zwar eine 100-fach höhere totale zerebrale TNF-α-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu verzeichnen war, die TNF-α-Spiegel der TNF-α-transgenen Mäuse jedoch nach der BoDV-1-Infektion nicht signifikant anstiegen. Die hohen intrazerebralen TNF-α-Spiegel können daher nicht den alleinigen Stimulus der Lcn2-Expression darstellen. Die weitere vergleichende Betrachtung von BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen und nicht-infizierten TNF-α-transgenen Tieren zeigte immunhistologisch und durch eine quantitative RT-PCR eine

deutliche Aufregulation der TNF-Rezeptoren im Gehirn (SCHAUDIEN, 2007). Die TNF- α -induzierte Lipocalin-2-Expression kann über einen TNFR-1-vermittelten Signalweg induziert werden (NAUDE et al., 2012). Einflüsse auf die Lcn2-Synthese durch die BoDV-1-Infektion allein durch Änderung bzw. eine Steigerung der TNFR1-Verfügbarkeit sind daher anzunehmen. Darüber hinaus konnte bereits eine verstärkte Expression anderer proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-12 und IFN- γ , im Zuge der BoDV-1-Infektion festgestellt werden (HATALSKI et al., 1998; KRAMER et al., 2012; SCHAUDIEN, 2007; SHANKAR et al., 1992). Die TNF- α -transgenen BoDV-1-infizierten Mäuse wiesen höhere Zytokinspiegel (zum Beispiel von IL-1 α) auf als ebenfalls BoDV-1-infizierte nicht-transgene Mäuse (SCHAUDIEN, 2007). Die Aufregulation der Lipocalin-2-Expression durch andere Zytokine als TNF- α wurde in der Literatur bei verschiedenen Zelltypen beschrieben: So exprimieren Astrozyten und Keratinozyten Lcn2 infolge eines IL-1 α -Stimulus (BANDO et al., 2007; LIDDELOW et al., 2017). Adipozyten reagieren unter anderem auf TNF- α , IFN- γ und IL-6 mit einer verstärkten Lcn2-Expression (ZHANG et al., 2014; ZHAO und STEPHENS, 2013).

Die Lcn2-Expression trat bei den BoDV-1-infizierten TNF- α -transgenen Mäusen erst ab dem 42. dpi auf. In der vorigen Arbeit von Schaudien (2007) wurde eine deutliche Aufregulation von TNFR1 bei BoDV-1-infizierten homo-und heterozygot TNF- α -transgenen Mäusen zwischen Tag 21 und Tag 42 pi beschrieben. Der Zeitpunkt der Lcn2-Expression bei TNF- α -transgenen Mäusen nach BoDV-1-Infektion könnte demnach durch die Verfügbarkeit bzw. den Mangel des TNFR1 bedingt sein.

Die "verzögerte" Lcn2-Expression nach BoDV-1-Infektion steht im Kontrast zu verschiedenen Publikationen, in denen Lipocalin-2 als schnell aufreguliertes "akute Phase-Protein" bezeichnet wird (FLO et al., 2004; LIU und NILSEN-HAMILTON, 1995; NILSEN-HAMILTON et al., 2003). Nach systemischer LPS-Stimulation erreichte die zerebrale Lcn2-Expression bereits nach 4 h ihren peak und zeigte zum nachfolgenden Zeitpunkt von 24 h schon wieder gesunkene mRNA-Spiegel, während sich die Proteinspiegel auch nach 24 h gleichbleibend hoch darstellten (IP et al., 2011). Nach 72 h erreichen die Lcn2-mRNA-Spiegel bereits wieder basale Werte (MARQUES et al., 2008). Die experimentelle intranasale Infektion mit dem West-Nile-Virus induzierte ab dem 5. Tag pi eine Expressionssteigerung von Lipocalin-2, begleitet von einer Aufregulation proinflammatorischer Zytokine und Entzündungszellinfiltraten (NOCON et al., 2014). Die zeitliche Diskrepanz zwischen der unmittelbaren Lcn2-Aufregulation in den geschilderten Modellen und der späten Lcn2-Expression nach BoDV-1-Infektion von TNF-atransgenen Mäusen könnte auf das jeweilige Zytokinmilieu und die angesprochenen Signalwege zurückzuführen sein. LPS kann die Lcn2-Expression unmittelbar über den toll like receptor 4 (TLR4) induzieren (FLO et al., 2004; IP et al., 2011; XIAO et al., 2017). Die Lcn2-Expression nach WNV-Infektion folgte auf die frühe Aufregulation verschiedener PRRs (u.a. TLRs,

128

RIG-I) und wurde daher als *downstream*-Signal betrachtet (NOCON et al., 2014). Die Aufregulation von TNFR1 sowie höhere Spiegel verschiedener proinflammatorischer Faktoren (u.a. IFN-γ, IL-6, IL-1ß) könnten Schlüsselfaktoren für die vergleichsweise späte Lcn2-Expression bei TNF-α-transgenen Mäusen nach BoDV-1-Infektion darstellen. Zur weiteren Abklärung des zeitlichen Verlaufs der Lcn2-Expression nach BoDV-1-Infektion sollte diese auch wenige Stunden nach Infektion untersucht werden.

Bei vielen neuroinflammatorischen Prozessen des ZNS kann eine Korrelation der Lipocalin-2-Expression mit dem Verlauf der Entzündungsreaktion beobachtet werden und wird daher häufig als potentieller diagnostischer bzw. prognostischer Marker diskutiert (CHIA et al., 2011; CHUN et al., 2015; MARQUES et al., 2012; NAUDE et al., 2012). Im Falle der BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Mäuse war Lcn2 hingegen erst später im Laufe der Infektion nachweisbar und folgte somit verzögert auf das erste Auftreten entzündlicher Veränderungen (21 dpi). Frühe Zeitpunkte (wenige Stunden nach BoDV-1-Infektion) wurden in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht. So zeigten die untersuchten TNF-q-transgenen. BoDV-1-infizierten Mäuse histologisch einen ausgeprägten Anstieg der Entzündungsreaktion und Astrozytenaktivierung, aber auch der BoDV-N-positiven Zellen zwischen dem 21. und 42. Tag post infectionem (HIRZ, 2017), welcher auch in vorausgegangenen Arbeiten festgestellt worden war (HERDEN, 2009; KRAMER, 2006; KRAMER et al., 2012; SCHAUDIEN, 2007). In der Literatur wird der Nachweis von Lipocalin-2 im Gehirn in der Regel im Zusammenhang mit ausgeprägten entzündlichen Veränderungen beschrieben - unter anderem nach traumatischer Noxe (RATHORE et al., 2011), infektiösem Stimulus (IP et al., 2011; NOCON et al., 2014), sowie Autoimmunerkrankungen (AL NIMER et al., 2016). Im Falle der EAE konnte eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Lipocalin-2-Expression und der Schwere der klinischen Symptomatik gezeigt werden (MARQUES et al., 2012). Für extrazerebrale inflammatorische Prozesse wird Lipocalin-2 bereits häufig als Biomarker genannt, mit Hilfe dessen die Stärke einer Entzündungsreaktion abgeschätzt werden kann (AXELSSON et al., 1995; BOLIGNANO et al., 2010). Ein 42 Tage post infectionem untersuchtes BoDV-1-infiziertes heterozygot TNF-α-transgenes Tier wies wie die 21 dpi untersuchten Tiere - keine zerebrale Lcn2-Expression auf. Im Gegensatz zu den restlichen Tieren der Gruppe wies es lediglich vereinzelte meningeale Entzündungszellinfiltrate auf, während keine perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate oder aktivierte Astrozyten detektierbar waren. Ausgehend von einer Korrelation zwischen Entzündungsreaktion und der zerebralen Aufrequlation von Lipocalin-2 kann vermutet werden, dass bei den 21 dpi TNF-αtransgenen BoDV-1-infizierten Tieren sowie dem einzelnen 42 dpi untersuchtem Tier die beobachteten geringgradigen entzündlichen Veränderungen nicht ausgereicht haben, um eine detektierbare Lcn2-Synthese zu induzieren. Eine engmaschigere histopathologische und immunhistologische Untersuchung zum Nachweis von Lcn2 der BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Tiere zwischen Tag 21 und 42 pi könnte helfen, den Verlauf der Neuroinflammation feiner und ganz früh zu charakterisieren und möglicherweise die Schwelle der Lcn2-Expression zu beschreiben. Ferner wäre eine weitere Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich des Zytokinmilieus und im Entzündungsgeschehen wichtiger Rezeptoren (z. B. TNFRs, PRRs) zwischen den Lcn2-exprimierenden TNF-α-transgenen Tieren und den nicht-Lcn2-exprimierenden Tieren (BoDV-1-infizierte TNF-α-transgene Tiere 21 dpi und das Einzeltier 42 dpi (heterozygot TNF-α-transgen, BoDV-1-infiziert)) hilfreich.

Die strikte Assoziation der Lcn2-Expression mit neuroinflammatorischen Prozessen führt zu der Frage, ob es sich bei Lcn2 lediglich um einen diagnostisch hilfreichen Marker oder um ein die Entzündungsprozesse förderndes Zytokin handelt. Frühere Untersuchungen mit Lipocalin-2-k.o.-Mäusen erbrachten teils widersprüchliche Ergebnisse: BERARD et al. (2012) postulierten durch den knock out von Lcn2 einen gravierenderen Krankheitsverlauf nach Induktion einer EAE im Vergleich zu wt-Mäusen. Tatsächlich zeigte sich bei einem statistisch signifikant größeren Anteil der Lcn2-k.o.-Tiere ein chronischer Krankheitsverlauf, hinsichtlich der Todesfälle bzw. der aufgrund von schwerwiegender klinischer Symptomatik vorzeitig euthanasierten Tiere zeichnete sich hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Lcn2-k.o.und Wildtyp-Mäusen ab. Die EAE in Wildtyp- und Lcn2-k.o.-Mäusen wurde von NAM et al. (2014) ebenfalls vergleichend betrachtet, zeigte aber einen milderen Krankheitsverlauf, eine weniger stark ausgeprägte Demyelinisierung sowie geringere Neuroinflammation in der Gruppe der Lcn2-k.o.-Tiere. Grundsätzlich erfolgte die Induktion der EAE in beiden Studien auf vergleichbare Weise. Während BERARD et al. (2012) jedoch nur Lcn2-k.o.-Mäuse, die eine chronische Form der EAE aufwiesen, histologisch untersuchten, blieb der Zeitpunkt der Sektion bei Nam et al. (2014) unerwähnt. Durch die häufig schwankende Symptomatik der EAE (GLATIGNY und BETTELLI, 2018) können sich alleine aufgrund dieser möglichen zeitlichen Abweichungen Unterschiede hinsichtlich des Schweregrads der entzündlichen Veränderungen ergeben. IP et al. (2011) konnten nach peripherer LPS-Stimulation, die bei wt-Mäusen zu einer deutlichen zerebralen Lcn2-Expression führt, keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Zytokin- und Chemokinexpression zwischen Lcn2-k.o.- und wt-Tieren zeigen. JANG et al. (2013a) wiesen nach, dass sich bei Lcn2-k.o-Mäusen die Expression proinflammatorischer Zytokine im ZNS infolge eines LPS-Stimulus reduziert und propagieren daher Lipocalin-2 als einen zentralen proinflammatorischen Mediator. Diese Hypothese wird von verschiedenen Studien gestützt, in denen an Lipocalin-2-k.o.-Tieren nach unterschiedlichen Noxen (intrazerebrale Gefäßverschlüssen, peripherer LPS-Injektion, spinale Traumata und intrakraniale Blutungen) ein milderes Krankheitsbild und eine Reduktion entzündlicher Veränderungen beobachtet wurden (JIN et al., 2014a; JIN et al., 2014b; NI et al., 2015; RATHORE et al., 2011).

Ein Einfluss des untersuchten Modells auf die Folgen einer Lcn2-Defizienz ist nicht auszuschließen. Das in dieser Arbeit verwendete Modell der BoDV-1-Infektion TNF- α -transgener Mäuse war insbesondere auf die proinflammatorische und prokonvulsive Wirkung von TNF- α ausgerichtet (KRAMER et al., 2012). Unter Berücksichtigung der Lcn2-induzierten Inhibition der TNFR2-vermittelten neuroprotektiven und antikonvulsiven Effekte von TNF- α (NAUDE et al., 2012), ist ein proinflammatorischer Stimulus durch Lcn2 bei erhöhten TNF- α -Spiegeln sehr wahrscheinlich. Zur Klärung eines möglichen proinflammatorischen Einflusses durch Lcn2 nach BoDV-1-Infektion TNF- α -transgener Mäuse könnten TNF- α -transgene Tiere infiziert werden, die ein knock out von Lcn2 aufweisen. Ausführliche Untersuchungen der Zytokinspiegel und der TNF-Rezeptoren, insbesondere des TNFR1, könnten die Rolle von Lcn2 näher beleuchten.

Die vorzeitig verstorbenen BoDV-1-infizierten TNFR2-k.o.-Mäuse sowie das euthanasierte TNFR1-k.o.-Tier wiesen ebenfalls eine zerebrale Lipocalin-2-Expression auf. HIRZ (2017) beobachtete im Rahmen der histopathologischen Untersuchungen bei diesen Tieren neuroinflammatorische Prozesse und auch vereinzelte Neuronennekrosen. Die bereits bei KRAMER (2006) beschriebene typische gestreckte Haltung von im Krampfanfall verendeten Mäusen konnte auch bei den verendeten TNFR2-k.o.-Tieren festgestellt werden und bei einem verstorbenem TNFR2-k.o.-Tier sogar das präfinale Krampfgeschehen mittels Videoaufzeichnung dokumentiert werden (HIRZ, 2017).

Grundsätzlich können epileptische Anfälle durch neuroinflammatorische Prozesse getriggert werden (VEZZANI et al., 2011). Lipocalin-2-vermittelte proinflammatorische Effekte könnten somit indirekt als begünstigender Faktor in der Epileptogenese wirken.

Neben der proinflammatorischen Effekte von Lcn2, wird auch ein direkter Effekt auf die Funktionen und Morphologie von Neuronen propagiert (FERREIRA et al., 2013; JHA et al., 2015). Lipocalin-2 kann die Dichte sowie Morphologie neuronaler Dendriten und daher die synaptische Plastizität von Neuronen beeinflussen. Dieser regulative Effekt auf die neuronale Exzitabilität und Architektur von Hippocampus und Amygdala wurde bisher bei einer stress-induzierten Lipocalin-2-Expression untersucht (MUCHA et al., 2011; SKRZYPIEC et al., 2013). Morphologische Untersuchungen der TNF-α-transgenen Tiere hinsichtlich Neuronendichte und der Ausprägung neuronaler Dendriten könnten weitere Erkenntnisse zu möglichen prokonvulsivem Effekten im Zuge einer verstärkten Lcn2-Expression erbringen.

In vitro zeigten NAUDE et al. (2012), dass Lcn2 die TNFR2-k.o.-mediierten antikonvulsiven Effekte von TNF-α eliminieren und damit die neuronale Empfindlichkeit gegenüber exzitotoxischen Reizen erhöhen kann. Des Weiteren ist ein indirekter prokonvulsiver Effekt von Lipocalin-2 durch die proinflammatorische Stimulation von Astrozyten denkbar. Eine Aktivierung von Astrozyten ist ein häufig beobachteter Befund im Zusammenhang mit Epilepsie, erkennbar an

der verstärkten astrozytären GFAP-Expression (HUBBARD et al., 2016; LUKASIUK und PITKÄNEN, 2004). Als Basis der verminderten Neuroprotektion bzw. prokonvulsiven Wirkung von reaktiven Astrozyten werden unter anderem Störungen des Glutamatmetabolismus durch Herunterregulation wichtiger Glutamat-Transporter oder einer verminderten Glutaminsynthese vermutet (CLASADONTE und HAYDON, 2012; HOWLAND et al., 2002; TANAKA et al., 1997). Störungen der astrozytären Glutamat-Homöostase im Zusammenhang mit einer astrozytären Hypertrophie konnten an neonatalen Ratten sowie Katzen nach einer BoDV-1-Infektion bereits nachgewiesen werden (BILLAUD et al., 2000; OVANESOV et al., 2007). In der Arbeit von HIRZ (2017) wurde zudem eine verminderte Expression des Glutamat-Transporter 1 (GLT-1) und des Glutamat-Aspartat-Transporters (GLAST) im Neuroparenchym angrenzend an die perivaskulären Entzündungszellinfiltrate der BoDV-1-infizierten Mäuse festgestellt. Die Lcn2-Expression trat insbesondere in der Nähe der perivaskulären Infiltrate auf. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Lcn2 und der Glutamattransporter-Expression von Astrozyten sollte daher weiter untersucht werden.

Das vermutete Krampfgeschehen sowie die entzündlichen Gehirnläsionen der BoDV-1-infizierten TNFR1-k.o.-Maus stehen im Kontrast zu der Hypothese, dass durch ein Fehlen des TNFR1, welcher für die Vermittlung prokonvulsiver und proinflammatorischer Effekte von TNFa verantwortlich sein soll, ein neuroprotektives und antikonvulsives Milieu gefördert würde (BALOSSO et al., 2013; BALOSSO et al., 2005; MARCHETTI et al., 2004). Auch die durch Lipocalin-2 induzierten Effekte auf die TNF-α-abhängigen Signalwege werden mit Hilfe des TNFR1 vermittelt und haben so eine prokonvulsive und proinflammatorische Wirkung (NAUDE et al., 2012). Die Stimulation der Lcn2-Synthese durch TNF- α erfolgt ebenfalls ausschließlich über den TNFR1 (NAUDE et al., 2012). Die bei dem TNFR1-k.o.-beobachtete verstärkte Lcn2-Expression müsste demnach auf einen TNF-α-unabhängigen Stimulus zurückzuführen sein. Eine verstärkte Lcn2-Synthese kann auch durch zahlreiche andere proinflammatorische Zytokine hervorgerufen werden, zum Beispiel IL-1α, IL-1ß und IFN-y (BANDO et al., 2007; CHAKRABORTY et al., 2012; LIDDELOW et al., 2017; ZHANG et al., 2014; ZHAO und STEPHENS, 2013), welche grundsätzlich auch im Rahmen einer BoDV-1-Infektion induziert werden können (HATALSKI et al., 1998; KRAMER et al., 2012; MORIMOTO et al., 1996; SAUDER und DE LA TORRE, 1999). Eine weitere Bestimmung dieser Zytokine im Gehirn der TNFR1-k.o.-Maus wäre hilfreich, um die Pathogenese der Lcn2-Expression und damit womöglich auch des Krampfgeschehens besser einordnen zu können.

Verteilungsmuster und zelluläre Lokalisation des Lipocalin-2

Die Lipocalin-2-Expression war bei den TNF-α-transgenen BoDV-1-infizierten Tieren auf bestimmte Gehirnareale beschränkt. Das Striatum zeigte die größte Anzahl Lcn2-positiver Zellen, gefolgt vom frontalen Cortex cerebri und dem Hippocampus. In Kleinhirn und Stammhirn war grundsätzlich kein Lcn2 nachweisbar. Dieses Verteilungsmuster stimmte weitgehend mit den Regionen der stärksten transgenen TNF-a-Expression sowie der stärksten Expression von TNFR1 und TNFR2 – frontaler Cortex cerebri, Striatum und Ammonshorn – überein (KRAMER et al., 2012; MARCHETTI et al., 2004; MONYER et al., 1994; SCHAUDIEN, 2007). Die entzündlichen Veränderungen waren ebenfalls in erster Linie in Striatum und frontalem Cortex cerebri, daneben aber auch im Thalamus zu finden, während die Zahl virus-positiver Zellen am 42. Tag post infectionem in allen untersuchten Hirnarealen ähnlich hoch war (HIRZ, 2017). SCHAUDIEN (2007) beobachtete bei TNF-q-transgenen BoDV-1-infizierten Mäusen zudem wesentlich höhere Mengen proinflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-1α und IFN-y, in Cortex cerebri, Striatum und Ammonshorn im Vergleich zum Kleinhirn. Die strikte Assoziation von Lipocalin-2-Expression und Neuroinflammation, insbesondere aber auch mit der TNFR-Expression, betrifft daher nicht nur das zeitliche Auftreten, sondern auch die jeweils betroffenen Gehirnareale der entzündlichen Veränderungen. Die enge räumliche Nähe von Lcn2 und dem jeweiligen Entzündungsherd wurde bereits im Zusammenhang mit traumatischen Insulten (DONG et al., 2013; EGASHIRA et al., 2014; NI et al., 2015; RATHORE et al., 2011), ischämischen Noxen (JIN et al., 2014b), exzitotoxischen Stimuli (CHIA et al., 2015), neurodegenerativen Erkrankungen (KIM et al., 2016) und Autoimmunerkrankungen wie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (BERARD et al., 2012) sowie der experimentellen autoimmunen Neuritis des Nervus opticus (CHUN et al., 2015) beschrieben. Im Falle der experimentellen West-Nile-Virus-Infektion von Mäusen war Lcn2 dagegen auch in Hirnarealen detektierbar, in denen kein Virus nachweisbar war, jedoch ist von einer großflächigen Zytokininduktion durch das West-Nile- Virus auszugehen (NOCON et al., 2014).

Hinsichtlich der zellulären Lokalisation des Lipocalin-2 waren Astrozyten die dominierend Lcn2-exprimierende Zellpopulation. Insbesondere konnte Lcn2 in den bereits in den Arbeiten von SCHAUDIEN (2007) und HIRZ (2017) beschriebenen Astrozyten mit ausgeprägt hypertropher Morphologie detektiert werden. Untersuchungen zu einer dieser abnormen Morphologie möglicherweise zugrundeliegenden alternativen Zelluntergangsform verliefen negativ (HIRZ, 2017). Eine weitere mögliche Ursache für einen derartigen Phänotyp wäre eine ungewöhnliche Aktivierung dieser Gliazellen. Astrozyten gelten im Zusammenhang mit neuroinflammatorischen und –degenerativen Prozessen als Hauptquelle der Lipocalin-2-Synthese (KIM et al., 2016; LEE et al., 2009; RANJBAR TAKLIMIE et al., 2019; SUK, 2016). Zugleich gilt das Zytokin als ein potenter Induktor einer reaktiven Astrozytose (LEE et al., 2009). Astrozyten können – in Abhängigkeit von dem aktivierenden Stimulus – verschiedene so genannte "Phänotypen" bzw. Aktivitätszustände annehmen, die sich im Folgenden durch die von ihnen produzierten Zyto- und Chemokine unterscheiden: Im Falle der klassischen Aktivierung sind diese proinflammatorischer Natur, im Falle der alternativen Aktivierung antiinflammatorisch

ausgerichtet (JANG et al., 2013a; JHA et al., 2015; JHA et al., 2016). Lipocalin-2 wird im Rahmen der "phänotypischen Polarisierung" eine zentrale regulatorische Rolle zugesprochen. So soll es die klassische Aktivierung von Astrozyten fördern bzw. induzieren, den Weg der alternativen Aktivierung hingegen unterbinden (JANG et al., 2013a). Der Nachweis von Lipocalin-2 in eben diesen hypertrophen Astrozyten, welche grundsätzlich in den Gehirnarealen mit neuroinflammatorischen Prozessen lokalisiert waren, weist auf eine proinflammatorische Aktivierung dieser Zellen hin. Das Spektrum der immunologischen Funktionen von Astrozyten bei entzündlichen Prozessen im ZNS wurde in den letzten Jahren kontinuierlich erweitert. Neben der Detektion von Fremdantigenen, der Zytokin-vermittelten Induktion einer Immunreaktion konnten sogar phagozytotische Aktivitäten beobachtet werden (FARINA et al., 2007; MORIZAWA et al., 2017; ROTHHAMMER und QUINTANA, 2015). Bisher konnte im Zuge einer BoDV-1-Infektion eine vermehrte proinflammatorische astrozytäre Zytokin-Synthese dargestellt werden (HERDEN et al., 2005; SAUDER und DE LA TORRE, 1999). Weitere Nachweise von typischen Markern der klassischen Aktivierung, zum Beispiel IL-1β. TNF-α, iNos. und CXCL-10 (JANG et al., 2013a), könnten Aufschluss über den tatsächlichen Phänotyp der Astrozyten bringen. Weiterhin wären guantitative Untersuchungen zur TNFR1-Rezeptorendichte dieser Zellen hilfreich, um die These einer TNF-α-induzierten und TNFR1-mediierten Lcn2-Expression näher zu untersuchen. Eine immunhistologische Untersuchung, bei der zugleich die Astrozyten identifiziert (zum Beispiel durch den Nachweis von GFAP) und die TNFR1-Expression dargestellt wird, könnte hierbei helfen.

Das Muster des intrazellulären Lipocalins zeigte in den Astrozyten ein granuläres Erscheinungsbild und stimmte daher mit den Beobachtungen von CHIA et al. (2015) überein, die aus diesem Grund die Bildung sekretorischer Vesikel vermuteten. Extrazelluläres Lipocalin-2 war in erster Linie in den Arealen mit zahlreichen hypertrophen Astrozyten und ausgeprägter inflammatorischer Infiltration zu finden. Es handelt sich dabei am wahrscheinlichsten um sezerniertes Lcn2, welches von Gliazellen abgegeben wird und auto- bzw. parakrin auf benachbarte Zellen wirken kann (IP et al., 2011). Insbesondere Astrozyten und Mikrogliazellen können sich auf diese Weise selbst bzw. gegenseitig in einen proinflammatorischen Phänotyp versetzen (JANG et al., 2013b; LEE et al., 2009). Bei den hier untersuchten TNF-α-transgenen BoDV-1infizierten Tieren war Lcn2 ebenfalls in Gliazellen nachweisbar, die aufgrund ihrer Morphologie den Mikrogliazellen zuzuordnen waren. Dies passte zu einer klassischen Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen in den beschriebenen Hirnarealen. Eine Aktivierung von Astrozyten bzw. Mikrogliazellen ist typisch für Virusinfektionen und wird zum Beispiel durch das Virus der Theilerschen Murinen Enzephalomyelitis (GERHAUSER et al., 2012; HERDER et al., 2015) oder das Virus der Newcastle Disease induziert (LIEBERMAN et al., 1989). In der Nähe der perivaskulären Entzündungszellinfiltrate lokalisierte Astrozyten und Mikrogliazellen der

134

TNF-q-transgenen Tiere wiesen 42 und 49 Tage nach BoDV-1-Infektion vermehrt die NFKB-Untereinheit p50 im Zytoplasma auf, was auf eine vermehrte p50-Synthese hinweist und damit eine verstärkte NFKB-Aktivierung unterstützt (SCHAUDIEN, 2007). Dies passt zu der Aufregulation von Lcn2 in diesen Zellen nach BoDV-1-Infektion, da die Expression von Lcn2 an eine NFKB-Aktivierung gebunden ist (IANNETTI et al., 2008; KIM et al., 2013; ZHAO und STEPHENS, 2013), Astrozyten gehören neben Neuronen auch zu den Zielzellen des BoDV-1 (CARBONE et al., 1991; CARBONE et al., 1989; HERDEN et al., 2005), XING et al. (2014) beschrieben, dass Lipocalin-2 auch als "Hilferuf" von geschädigten Neuronen exprimiert wird. um eine Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen zu induzieren. In einer früheren Arbeit konnte keine vermehrte neuronale p50-Synthese bzw. NFKB-Aktivierung bei den BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Tieren nachgewiesen werden (SCHAUDIEN, 2007). Dies passt zu dem fehlenden Nachweis der neuronalen Lcn2-Expression bei den TNF-α-transgenen Tieren. BoDV-1 wirkt inhibitorisch auf die Aktivierung von NFkB in Neuronen durch eine Interaktion des viralen Nukleoproteins mit einer NFkB-Untereinheit mit dem Ziel der Evasion der wirtseigenen antiviralen Immunantwort (BOURTEELE et al., 2005; MAKINO et al., 2015). Der Transkriptionsfaktor NFkB scheint daher eine mögliche Schnittstelle der Signalwege von BoDV-1 und Lipocalin-2 darzustellen.

Die vorzeitig verstorbenen BoDV-1-infizierten TNFR2-k.o.- bzw. das euthanasierte TNFR1k.o.-Tier zeigten ein zum Teil mit den BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Mäusen vergleichbares Lipocalin-2-Expressionsmuster.

Endotheliales Lipocalin-2 war ausschließlich bei den vorzeitig verstorbenen bzw. getöteten Mäusen, nicht aber bei den 42 bzw. 49 dpi untersuchten TNF-α-transgenen Mäusen detektierbar. Als mögliche Ursache hierfür könnten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Lcn2 durch die Endothelzellen im Rahmen des neuroinflammatorischen Geschehens in Frage kommen. Nach peripherer LPS-Injektion war zerebrales Lcn2 als erstes in den Gefäßendothelien zu erkennen (IP et al., 2011). Auch infolge einer intrazerebral lokalisierten Noxe (experimentelle transiente Okklusion der Arteria cerebri media) wies das Endothel als erster und zunächst einziger Zelltyp bereits nach 6 h Lipocalin-2 auf, während die residenten Zellen des ZNS später folgten (JIN et al., 2014b). Im Gegensatz zur experimentellen BoDV-1-Infektion handelt es sich sowohl bei der Hypoxie durch einen Gefäßverschluss als auch bei der Sepsis-Induktion durch LPS-Injektion um Noxen, die eine unmittelbare und in der Regel fulminante Entzündungsreaktion hervorrufen. Direkte Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf der Lcn2-Expression nach BoDV-1-Infektion zu ziehen, erlauben diese Modelle daher nicht. Dass sich das zelluläre Muster der Lcn2-Expression ändern kann, zeigt jedoch auf, dass weitere Untersuchungszeitpunkte – insbesondere zu früheren Zeitpunkten – der BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Mäuse neue Erkenntnisse zum Lcn2-Expressionsmuster ergeben könnten. Vor dem Hintergrund, dass die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke durch Lcn2 bei entzündlichen Prozessen gesteigert werden soll (EGASHIRA et al., 2016), könnten derartige Untersuchungen die Rolle von Lcn2 in der BoDV-1-Infektion näher klären.

Lediglich bei zwei der verstorbenen bzw. euthanasierten TNFR1 bzw. TNFR2-k.o.-Mäuse war ein ähnliches neuroparenchymales Verteilungsmuster von Lcn2 im Gehirn erkennbar wie bei den \geq 42 dpi untersuchten BoDV-1-infizierten TNF-q-transgenen Mäusen. In dieser Gruppe war auch nur bei diesen Tieren eine Aktivierung von Astrozyten erkennbar, zudem wiesen sie die stärkste neuroinflammatorische Reaktion auf (HIRZ, 2017). Die beiden verstorbenen TNFR1-k.o.-Tiere wiesen kein Lcn2 in Gliazellen auf und zeigten histologisch keine oder nur vereinzelte Entzündungszellinfiltrate ausschließlich in der Meninx (HIRZ, 2017). Die scheinbar strikte Korrelation zwischen histopathologisch darstellbaren neuroinflammatorischen Prozessen und dem immunhistologisch nachweisbaren Lipocalin-2 wird somit weiter untermauert. Das Verhältnis von Lcn2-exprimierenden Astrozyten zu Mikrogliazellen, welches bei den TNFα-transgenen Mäusen durch die Astrozyten dominiert wurde, erschien bei dem nach einem Krampfanfall verstorbenem TNFR2-k.o.-Tier ausgeglichen. Der Anteil Lcn2-positiver Mikrogliazellen war größer und dem der Astrozyten ebenbürtig. JANG et al. (2013b) stellten fest, dass die Lipocalin-2-Expression auf M1-polarisierte Mikrogliazellen beschränkt ist und Lipocalin-2 die Polarisierung von Mikroglia in Richtung des M1-Phänotyps fördert, die Ausbildung des M2-Phänotyps jedoch unterdrückt. Das von Mikrogliazellen sezernierte Lcn2 induziert darüber hinaus – ebenso wie im umgekehrten Fall – eine entsprechende Polarisierung der Astrozyten (JHA et al., 2015). In-vitro-Versuche deuten darauf hin, dass eine proinflammatorische Reaktion durch die Interaktion von Astrozyten und Mikrogliazellen potenziert wird (BARBIERATO et al., 2013). Das im Vergleich zu den TNF-α-transgenen Mäusen andere Verhältnis Lcn2positiver Astrozyten zu Mikrogliazellen könnte darauf hinweisen, dass sich dieses TNFR2-k.o.-Tier in einem anderen Stadium der Neuroinflammation nach BoDV-1-Infektion befunden haben könnte. Im Rahmen der BoDV-1-Infektion scheint die Astrozytenaktivierung die Voraussetzung für die nachfolgende Mikrogliaaktivierung zu sein, da das Virus selbst weder Mikrogliazellen infizieren noch direkt aktivieren kann (HERDEN et al., 2005; OVANESOV et al., 2008a; OVANESOV et al., 2006). Insofern könnte die Untersuchung der Lcn2-Expression an BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Tieren zu weiteren, insbesondere späteren Zeitpunkten Aufschluss über den zeitlichen Ablauf der Lcn2-Expression der verschiedenen Gliazellen geben. Ferner könnten vergleichende immunhistologische Untersuchungen an diesem TNFR2k.o.-Tier und den TNF-α-transgenen Tieren helfen, den funktionellen Status der Mikrogliazellen zu charakterisieren und somit deren Bedeutung an der Epileptogenese besser einzuschätzen. Alternativ sollten diese Untersuchungen auch in vitro an einer entsprechenden Mischkultur erfolgen.

6.1.2 Nachweis von Lipocalin-2-mRNA mittels In-situ-Hybridisierung

Die In-Situ-Hybridisierung diente dem Nachweis von Lcn2-mRNA zur Detektion von Zellen, die sowohl eine Transkription als auch Translation von Lcn2 aufweisen und so von Zellen differenziert werden können, bei denen nur Protein nachweisbar war. Letzteres kann dann eine Aufnahme von Lcn2 durch diese Zellen darstellen. Dies wurde bereits in einzelnen Publikationen dargestellt, welche Unterschiede hinsichtlich der Präsenz von Lcn2 und Lcn2-mRNA in einzelnen Zelltypen fanden, und die Hypothese aufwarfen, ob einzelne Zellen, insbesondere Neuronen gegebenenfalls nur sezerniertes Lcn2 aus der Umgebung aufnehmen, ohne dieses selbst zu exprimieren bzw. zu synthetisieren (NOCON et al., 2014).

Der Nachweis von Lcn2-mRNA war – entsprechend der immunhistologischen Ergebnisse – nur in BoDV-1-infizierten Mäusen mit TNF- α -Überexpression (TNF- α -transgen: tg/tg und tg/wt) ab dem 42. Tag pi möglich. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen den Mauslinien (tg/tg und tg/wt) sowie die Wechselwirkung zwischen Mauslinie und Hirnareal müssen jedoch angesichts der geringen Zahl (n=2) der untersuchten heterozygoten TNF-α-transgenen Tiere und deren starke Schwankungsbreite hinsichtlich der Lcn2-Expression mit Vorsicht interpretiert werden. In Bezug auf die Hirnareale zeigten auch die mittels ISH untersuchten homozygot TNF- α -transgenen BoDV-1-infizierten Mäuse deutliche Unterschiede bezüglich der Hirnareale. So war eine ähnliche Verteilung der Lcn2-mRNA wie auch des immunhistologisch nachgewiesenen Antigens in den verschiedenen Gehirnregionen und damit auch der räumliche Bezug zu den entzündlich veränderten Foci ersichtlich. Ferner zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der Zahl von Zellen mit positivem Signal zwischen den homozygot TNF-α-transgenen Mäusen zu den Zeitpunkten 42 dpi und 49 dpi. Der gleichbleibende Nachweis von Lcn2mRNA steht im Kontrast zu dem beschriebenen kurzfristigen Expressions-peak mit schnellem Abfall zum Basalwert nach einem inflammatorischen Stimulus (IP et al., 2011), sondern passt eher zu der das Entzündungsgeschehen begleitenden Expression, wie sie im Rahmen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis beobachtet wurde (MARQUES et al., 2012). Die Lcn2-Expression war bei den TNF-α-transgenen Tieren noch stärker auf die Astrozyten, insbesondere auf die abnorm hypertrophen Astrozyten, beschränkt und lediglich einzelne vermeintlich positive Mikrogliazellen erkennbar. Insbesondere aktivierte Mikrogliazellen, die sich durch einen schlanken, streifenförmigen Zellkörper auszeichnen, sind mittels In-Situ-Hybridisierung schwer zu identifizieren. Somit kann der Nachweis einer geringeren Anzahl von Mikrogliazellen, in denen Lcn2-mRNA detektiert werden konnte, im Vergleich zu der Zahl von Mikrogliazellen, in denen Lcn2 gefunden wurde, auch mit der methodisch bedingten erschwerten Erkennbarkeit zusammenhängen. Der Nachweis von Lcn2-mRNA in Gliazellen variiert zum Teil in Abhängigkeit vom eingesetzten Stimulus. Nach der Infektion mit dem West Nile Virus war Lcn2-mRNA in Astrozyten und Mikrogliazellen, nach peripherer LPS-Stimulation lediglich
in Mikrogliazellen nachweisbar (IP et al., 2011; NOCON et al., 2014). Dass die hypertrophen Astrozyten die Hauptquelle der Lipocalin-2-mRNA darstellen, stimmt mit den immunhistologischen Ergebnissen überein. Die in vorherigen Arbeiten von HIRZ (2017) und SCHAUDIEN (2007) untersuchte Hypothese, dass es sich bei der ungewöhnlichen Hypertrophie dieser Zellen möglicherweise um eine abnorme Zelluntergangsform handelt, wurde weitgehend ausgeschlossen. Vielmehr weisen die ausgeprägte GFAP-Expression und die blasig-aufgetriebenen Nuklei dieser Astrozyten (HIRZ, 2017) auf eine ungewöhnliche Aktivierung hin. Die Korrelation der aktivierten Astrozyten mit der Synthese von Lipocalin-2, das in der Literatur auch als Marker reaktiver Astrozyten bezeichnet wird, unterstreicht die potentiell einflussreiche Rolle der hypertrophen Zellen im Entzündungsgeschehen.

Neuronen, welche durch ihre recht großen Perikarya sicher zu identifizieren waren, wiesen keine Lcn2-mRNA auf. Damit entsprach der mRNA-Nachweis durch die ISH dem Antigen-Nachweis durch die IHC und es ist davon auszugehen, dass diese Zellen im Rahmen der experimentellen BoDV-1-Infektion Lcn2 weder exprimieren noch synthetisieren. In einigen vorherigen Studien konnte Lcn2-mRNA bzw. Lcn2 in Neuronen nachgewiesen werden. Diese unterschieden sich durch die Verwendung verschiedener Insulte, zum Beispiel die Induktion intrazerebraler Blutungen, und untersuchten die Lcn2-Expression in der Regel kurzzeitig danach, das heißt innerhalb von Stunden bis zu wenigen Tagen. Häufig konnte auch eine schnelle Aufregulation von Lcn2 und die Rückkehr zu basalen Werten innerhalb weniger Tage festgestellt werden (DONG et al., 2013; IP et al., 2011; JEON et al., 2013; NAUDE et al., 2012; NOCON et al., 2014; RATHORE et al., 2011; XING et al., 2014). Andere Modelle, zum Beispiel zur Untersuchung der Kainat-induzierten Exzitotoxizität, konnten 14 Tage nach der Noxe kein Lcn2 in Neuronen nachweisen (CHIA et al., 2011). Eine Untersuchung der Gehirne der BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Tiere zu weiteren, insbesondere zu früheren Zeitpunkten, könnte der Abklärung dienen, ob die neuronale Lcn2-Expression nach BoDV-1-Infektion nicht oder nur zeitlich begrenzt auftritt.

In verschiedenen Studien wurden infiltrierende Entzündungszellen als wichtige Quelle der Lipocalin-2-Expression bei neuroinflammatorischen Prozessen genannt: Insbesondere neutrophile Granulozyten zeigten eine verstärkte Lcn2-Synthese (FLO et al., 2004; MARQUES et al., 2012). Die BoDV-1-Infektion ging bei den TNF- α -transgenen Tieren, die eine Lcn2-Expression aufwiesen, auch mit Entzündungszellinfiltraten einher, jedoch bestanden diese – wie es für dieses neurotrope Virusinfektionen charakteristisch ist – aus mononukleären Infiltraten, in denen kein Lcn2 nachgewiesen wurde. Die Lcn2-Expression im Gehirn nach der experimentellen BoDV-1-Infektion von TNF- α -transgenen Mäusen war also auf die residenten Zellen des ZNS beschränkt.

Grundsätzlich wäre es sicherlich sinnvoll, weitere Untersuchungen anzuschließen, in denen

138

durch eine Kombination von einer In-situ-Hybridisierung zum Nachweis der Lcn2-mRNA und einer immunhistologischen Untersuchung zur Identifizierung der verschiedenen Zelltypen die Lcn2-mRNA mit einer höheren Genauigkeit den synthetisierenden Zellen zugeordnet werden kann. Zusätzlich böten sich *In-vitro*-Untersuchungen mit neuroglialen Mischkulturen oder *slice*-Kulturen von entsprechenden Gehirnarealen an.

In der Gruppe der BoDV-1-infizierten TNFR1 bzw. TNFR2-k.o.-Tiere, die vorzeitig verstarben oder euthanasiert wurden, war Lcn2-mRNA bei keinem der untersuchten Tiere darstellbar. Die nicht unmittelbare Fixierung der Gewebe dieser Tiere und teilweise auch histologisch erkennbare Autolyse könnten das fehlende Signal in der ISH erklären; da sie auf eine gute Gewebserhaltung durch schnelle Fixierung aufgrund der schnellen Degradation der Zielstruktur (RNA) angewiesen ist (SRINIVASAN et al., 2002). Eine Untersuchung des Gehirngewebes mittels RT-PCR könnte zeigen, ob intrazerebrale Lcn2-mRNA vorhanden wäre, würde jedoch den zellulären Ursprung nicht klären.

Alternativ kann auch die Hypothese aufgestellt werden, dass bei den TNFR-k.o.-Tieren der immunhistologische Nachweis von Lcn2 und der zugleich fehlende Nachweis von Lcn2-mRNA auf eine Aufnahme von sezerniertem Lcn2 aus dem extrazellulären Raum durch diese Zellen hinweisen könnte. So wurden in der Literatur für Neuronen und Endothelzellen gleichartige Beobachtungen beschrieben (IP et al., 2011; NOCON et al., 2014). Allerdings waren in den beschriebenen Fällen stets benachbarte Zellen mit deutlicher Synthese und auch sezerniertes Lipocalin-2 im Neuroparenchym vorhanden, welches die Hypothese der Aufnahme durch die Endothelzellen bzw. Neuronen nachvollziehbar werden lässt. Bisher wird Lipocalin-2 als autobzw. parakriner Mediator der Gliazellen bzw. Neuronen, welcher in einem Areal, das von einer inflammatorischen Noxe betroffen ist, der Koordination bzw. Kommunikation von diesen Zellen untereinander bzw. mit den infiltrierenden Entzündungszellen dienen soll (JHA et al., 2015). Das daher auch als "Gliocalin" bezeichnete Molekül ist räumlich eng an den inflammatorischen Prozess gebunden, was auch bei den TNF- α -transgenen BoDV-1-infizierten Mäusen in diesem Versuch ersichtlich wird.

6.2 In-vitro-Untersuchungen

6.2.1 Lipocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen Astrozytenkulturen

Astrozyten sind sowohl aufgrund ihrer Rolle als eine der Zielzellen des BoDV-1 sowie auf der Basis ihrer möglichen immunmodulatorischen Rolle von Bedeutung im BoDV-1-induzierten Krankheitsgeschehen (Neuroinflammation, epileptiforme Krämpfe). Insbesondere die nach BoDV-1-Infektion TNF-α-transgener Mäuse zu beobachtenden abnorm hypertrophen Astrozyten sollten näher charakterisiert werden.

Die Zellkulturen wurden aus den 4 bereits beschriebenen Mauslinien (Wildtyp, TNF- α -transgen, TNFR1-k.o., TNFR2-k.o.) gewonnen. In diesem Zusammenhang ist grundsätzlich zu beachten, dass die TNF- α -Überexpression der TNF- α -transgenen Mäuse an die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors gekoppelt ist, welcher nur in Neuronen exprimiert wird (MARCHETTI et al., 2004). Die kultivierten primären murinen Astrozyten wiesen daher keine eigene transgene TNF- α -Überexpression auf, stammten aber aus einem TNF- α -überexprimierenden und demnach pro-inflammatorischen Milieu, was auch in der Arbeit von HIRZ (2017) bereits verdeutlicht wurde.

Eigenschaften primärer astrozytärer Zellkulturen und ihre mögliche Bedeutung für die Interpretation von In-vitro-Untersuchungen

Die primäre murine Astrozytenkultur stellt ein gut etabliertes System dar, welches Aufschlüsse über astrozytäre Funktionen generieren kann (KIMELBERG, 1983). Die ausgeprägte Heterogenität astrozytärer Zellen zieht jedoch die Entstehung unterschiedlicher eventuell auch widersprüchlicher Ergebnisse nach sich und muss daher bei der Interpretation der In-vitro-Untersuchungen bedacht werden (LANGE et al., 2012; ZHANG und BARRES, 2010). Bei den aus neonatalen Mäusen oder Ratten gewonnenen Astrozyten handelt es sich um immature Zellen, welche sich hinsichtlich ihrer Genexpressionsprofile teilweise deutlich von adulten Astrozyten unterscheiden (AHLEMEYER et al., 2013; BRAMANTI et al., 2010; MANZANO et al., 2007). Veraleichende Untersuchungen astrozytärer Kulturen, die aus verschiedenen Hirnregionen stammen, zeigen nicht nur Unterschiede hinsichtlich der enthaltenen Astrozyten-Subpopulationen, sondern auch bezüglich des Zellstoffwechsels auf (AHLEMEYER et al., 2013; DREJER et al., 1982; HÖFT et al., 2014; KEHR, 2016a; MILLER und RAFF, 1984; PERRAUD et al., 1990; SCHOUSBOE und DIVAC, 1979; WESTERGAARD et al., 1994). AHLEMEYER et al. (2013) untersuchten aus neonatalen Ratten und Mäusen präparierte Astrozyten im Hinblick auf den Maturationsprozess sowie funktionell wichtiger Strukturen (u. a. Glutamattransporter) und konnten zeigen, dass Ratten-Astrozyten eine stärkere Maturation und Differenzierung als die Astrozyten der Mäuse aufwiesen, beide Astrozytenkulturen waren jedoch auch nach 42

Tagen in Kultur nicht ausgereift. PUSCHMANN et al. (2010) beobachteten ebenfalls eine höhere Reaktivität von Ratten-Astrozyten im Vergleich zu Maus-Astrozyten in vitro. Astrozyten, die aus neonatalen Nagern kultiviert wurden, ähneln per se hinsichtlich morphologischer und molekularer Eigenschaften reaktiven Astrozyten (LANGE et al., 2012; PUSCHMANN et al., 2010; WU et al., 1998). Darüber divergiert das Transkriptom der aus neonatalen Tieren gewonnenen Astrozyten beträchtlich von dem älterer Tiere sowie den maturen Astrozyten in vivo (CAHOY et al., 2008: DOYLE et al., 2008: FOO et al., 2011). Neben den zell-bedingten Faktoren muss auch der Einfluss des kulturellen Milieus überdacht werden: Ein hoher Glukosesowie Salzgehalt des Zellkulturmediums induzierten die Aktivierung von Astrozyten, erkennbar durch die Expression proinflammatorischer Zytokine, und können Untersuchungen hinsichtlich des inflammatorischen Verhaltens dieser Zellen verfälschen (DENG et al., 2017; WANG et al., 2012). Generalisierte Aussagen auf der Basis primärer astrozytärer Zellkulturen sind demnach grundsätzlich unter Berücksichtigung der Kulturbedingungen zu treffen (LANGE et al., 2012). Auch das Extrapolieren von Erkenntnissen, die mit Hilfe von kultivierten Astrozyten gewonnen wurden, auf in-vivo-Astrozyten ist nur in geringem Maße möglich. In ihrer Arbeit stellte KEHR (2016b) kultivierte und gleichaltrige in-vivo-Astrozyten hinsichtlich der Expression von Zellreifungsmarker gegenüber und konnte eine deutliche Immaturität der kultivierten Astrozyten im Vergleich zu den intrazerebralen Zellen entdecken. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der berücksichtigt werden sollte, ist die fehlende Verbindung der kultivierten Astrozyten zu anderen Zelltypen. Insbesondere im Zuge neuroinflammatorischer Prozesse kommt es zu komplexen Interaktionen zwischen Astrozyten, Neuronen, Mikrogliazellen und oft auch den infiltrierenden Entzündungszellen (COLOMBO und FARINA, 2016; RANSOM et al., 2003). Lipocalin-2 wird von diesen Zellen im Rahmen einer Entzündung synthetisiert und dient als proinflammatorischer Mediator (SUK, 2016). Somit ist davon auszugehen, dass die Lcn2-Expression isolierter Astrozyten nicht unbedingt die in-vivo-Verhältnisse reflektieren muss, aber das Verhalten der Astrozyten isoliert untersucht werden kann.

Lipocalin-2-Synthese von kultivierten murinen Astrozyten

Der positive Lcn2-Nachweis in den Astrozyten entsprach dem Signal, das auch im Gehirn TNF-α-transgener Tiere beobachtet worden war. Lipocalin-2 war als deutliches granuläres, zum Teil auch fast streifiges perinukleäres Signal erkennbar. Am Beispiel der neutrophilen Leukozyten wurde bereits gezeigt, dass Lcn2 zunächst in intrazellulären Granula gespeichert und auf Stimuli hin durch Exozytose abgegeben wird (KJELDSEN et al., 1993a; KJELDSEN et al., 1994; KJELDSEN et al., 1993b). Sezerniertes Lipocalin-2 kann aufgrund der Prozessierung im Rahmen der Immunfluoreszenzuntersuchung (Waschungen) nicht nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit das sezernierte Lcn2 auch *in vitro* nachzuweisen, wäre die Proteinmessung mittels Western Blot an dem Zellkulturüberstand.

Während der Lcn2-Nachweis in den Gewebeschnitten nur bei den Mäusen möglich war, die auch entzündliche Läsionen zeigten, war in den Kulturen der Astrozyten sämtlicher Mauslinien eine basale Lipocalin-2-Expression zu verzeichnen. Diese präsentierte sich durch einen gewissen Anteil von Astrozyten mit deutlichem Lipocalin-2-Signal. Dieses Phänomen könnte – wie oben bereits diskutiert – auf den reaktiven Phänotyp kultivierter Astrozyten neonataler Nager bzw. auf die Kultivierung von verschiedenen Astrozytensubpopulationen unterschiedlicher Reaktivität zurückzuführen sein (LANGE et al., 2012). Eine Optimierung der Untersuchungsbedingungen durch die Verwendung adulter Nager als Quelle der Astrozytenkultur ist jedoch fraglich. Während WU und SCHWARTZ (1998) einen nicht bzw. weniger reaktiven Phänotyp der aus adulten Nagern gewonnenen Astrozyten beschreiben, stellten NORTON und FAROOQ (1989) fest, dass die aus adulten Nagern kultivierten Astrozyten aus glialen Vorläuferzellen heranwachsen, die in einer gewissen Anzahl auch im adulten Gehirn vorkommen. Somit muss auch bei diesen von Immaturität ausgegangen werden.

Andere Gliazellen und Neuronen sind häufig in der frühen Phase der Kultivierung noch zu einem geringen Prozentsatz in der Astrozytenkultur vorhanden. Über den in dieser Arbeit vorliegenden sehr lange Kultivierungszeitraum von 4 Wochen inklusive mehrerer Passagen der Zellen dürften diese Zellen nicht mehr bzw. nur noch in vernachlässigbaren Mengen vorhanden sein (LANGE et al., 2012). Dies zeigt, dass Astrozyten auch selbstständig, ohne Stimulation durch andere Zellen, in der Lage sind, eine vermehrte Lcn2-Synthese zu initiieren. Diese Beobachtung stimmt mit vorigen Ergebnissen von NAUDE et al. (2012) und JANG et al. (2013a) überein, die ebenfalls Astrozytenkulturen hinsichtlich ihrer Lipocalin-2-Expression untersuchten.

142

Einfluss der Mauslinien auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression in vitro

Die Astrozyten TNF-α-transgener Mäuse (tg/tg) wiesen im Vergleich zu den Wildtyp- und TNFR1- bzw. TNFR2-k.o.-Astrozyten insgesamt mehr Lcn2-positive Zellen auf. Dennoch war insgesamt kein statistisch signifikanter Effekt der Mauslinie auf die Zahl Lcn2-Expression darstellbar.

Die Veränderung des TNF-Systems der Astrozytenkulturen hatte somit einen Einfluss auf die Lipocalin-2-Expression der Zellen. Die TNF-q-Überexpression der hier verwendeten transgenen Tiere basierte jedoch ausschließlich auf einer vermehrten neuronalen Synthese (HIRZ, 2017; MARCHETTI et al., 2004). Wäre zu Beginn der Kultivierung noch eine geringe TNF-α-Synthese durch einzelne kontaminierende Neuronen zu erklären, wird diese mit steigender Passagenzahl unwahrscheinlicher. Unter dem hier verwendeten Kultivierungsverfahren der Astrozyten ist von einem Anteil der Astrozyten von > 96 % auszugehen (HIRZ, 2017). In der Literatur wird eine Halbwertszeit von TNF- α angegeben, die in einem Bereich von ca. 30 min liegt (BEUTLER et al., 1985; OLIVER et al., 1993; WAAGE, 1987). Zudem dienten die regelmäßigen Waschungen während der Astrozytenpräparation auch dazu, die Zellen aus dem natürlichen Milieu in das Kulturmedium zu überführen. Dadurch wurden auch die darin enthaltenen Faktoren, wie Zyto- und Chemokine, herausgewaschen, so dass ein direkter Einfluss des transgenen TNF-α weitgehend ausgeschlossen werden kann. Vielmehr ist von einer fetalen Präkonditionierung der Astrozyten durch die erhöhten zerebralen TNF-α-Spiegel auszugehen. Astrozyten können durch TNF-a in einen proinflammatorischen Zustand im Sinne einer klassischen Aktivierung (A1-Phänotyp) und damit einhergehender gesteigerter Lcn2-Produktion versetzt werden (CHAKRABORTY et al., 2012; JHA et al., 2015; LEE et al., 2009; LIDDELOW und BARRES, 2017; LIDDELOW et al., 2017; SUK, 2016). So könnten die Astrozyten der TNFα-transgenen Mäuse durch das TNF-α-getriggerte proinflammatorische Umfeld einen dauerhaften bzw. länger andauernden reaktiven Zustand angenommen haben. LIDDELOW et al. (2017) transformierten Astrozyten mit Hilfe von TNF-a, IL1-a und Komplement-Komponente 1q (C1q) zu einem reaktiven A1-Phänotyp, inhibierten dann die genannten Faktoren durch die Zugabe entsprechender Antikörper und stellten nach 7 Tagen fest, dass die Astrozyten trotz fehlender aktivierender Faktoren weiter den genannten Phänotyp aufwiesen. Die dauerhafte ausgeprägte Lipocalin-2-Expression als Signal der reaktiven Astrozytose (BI et al., 2013; ZAMANIAN et al., 2012), welche bei den kultivierten Astrozyten TNF-α-transgener Mäuse infolge der fetalen TNF-α-Überexpression beobachtet werden konnte, weist auf eine Beibehaltung dieses Phänotyps über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen hin. Diese Persistenz eines proinflammatorischen Zustandes der Astrozyten infolge eines zeitlich begrenzten TNFa-Stimulus ist insbesondere im Hinblick auf chronische neuroinflammatorische und neurodegenerative Erkrankungen, zum Beispiel Alzheimer, Multiple Sklerose und Parkinson, von besonderem Interesse. So finden sich derartig polarisierte Astrozyten häufig im Zentrum der Läsionen und könnten entscheidend zu einem perpetuierenden Entzündungsgeschehen beitragen (LIDDELOW et al., 2017). Wie bereits beschrieben, muss jedoch bei primären murinen Astrozytenkulturen neonataler Tiere stets der grundsätzlich reaktive Phänotyp der Zellen berücksichtigt bzw. bei Untersuchungen zu inflammatorischen Prozessen subtrahiert werden (LANGE et al., 2012; PUSCHMANN et al., 2010; WU et al., 1998). Die ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten primären Astrozytenkulturen, welche aus nicht-transgenen C57BL/6-Mäusen präpariert wurden, können in diesem Zusammenhang genutzt werden, um die "basale", präparationsbedingte Reaktivität der Astrozyten und die daraus resultierende moderate Lipocalin-2-Expression zu erfassen.

Die Lipocalin-2-Expression der TNFR1- und TNFR2-k.o.-Astrozyten lag grundsätzlich in der Nähe des Expressionsniveaus der Wildtyp-Astrozyten bzw. tendenziell eher unterhalb von diesem. Der TNFR1 gilt als zentrales Element in der Induktion proinflammatorischer und prokonvulsiver TNF- α -Effekte sowie der TNF- α -induzierten Lipocalin-2-Synthese (EUGSTER et al., 1999; FONTAINE et al., 2002; NAUDE et al., 2012; NAUDÉ et al., 2011; PFEFFER et al., 1993; VILELA et al., 2010; WANG et al., 2014).

Grundsätzlich sind die via TNFR2 vermittelten TNF-α-Wirkungen in erster Linie neuroprotektiver Natur (ERICKSON et al., 1994; FONTAINE et al., 2002). Eine Induktion der Lipocalin-2-Synthese war auch durch eine Stimulation des TNFR2 nicht zu erwarten (NAUDE et al., 2012). TNFR2-k.o-Mäuse zeigen *per se* keinen pathologischen, das heißt verstärkt proinflammatorischen Phänotyp (AKASSOGLOU et al., 1998; ERICKSON et al., 1994). Aufgrund der fehlenden Stimulation der TNF-Rezeptoren in den Astrozytenkulturen war kein Einfluss durch das *knock out* der TNF-Rezeptoren auf die Lcn2-Synthese zu erwarten. Die basale bzw. geringe Lipocalin-2-Synthese der TNFR1-k.o.- und TNFR2-k.o-Astrozyten passt daher zum Phänotyp der Zellen.

Einfluss der Untersuchungszeitpunkte auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression in vitro

Bei sämtlichen Kulturen der verschiedenen Mauslinien war zum frühesten Untersuchungszeitpunkt (7 Tage *post infectionem*) der geringste Anteil Lcn2-positiver Astrozyten nachweisbar. Der über die verschiedenen Mauslinien hinweg zu beobachtende Trend einer über den Untersuchungszeitraum ansteigenden Lcn2-Expression war auffällig. *In vitro* und *in vivo* wurde in der Regel eine unmittelbar nach verschiedensten Noxen bzw. Stimuli ansteigende Lcn2-Expression gezeigt, die dann schnell (zum Beispiel *in vitro* 48 h nach TNF- α -Stimulus) wieder auf basale Spiegel fiel (IP et al., 2011; JEON et al., 2013; NAUDE et al., 2012). Der reaktive Phänotyp, der häufig für kultivierte Astrozyten beschrieben wird (DU et al., 2010; PUSCHMANN et al., 2010), könnte der konstanten bis progressiven Lcn2-Expression der verschiedenen Kulturen zugrunde liegen. Eine Untersuchung der Astrozyten hinsichtlich der Expression weiterer proinflammatorischer Marker, zum Beispiel mit Hilfe der Immunfluoreszenz oder durch Transkriptom-Analysen, könnte die nähere Charakterisierung des funktionellen Phänotyps dieser Zellen und insbesondere die Unterschiede zwischen den Kulturen der verschiedenen Mauslinien weiter unterstützen.

Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression in vitro

Die statistische Untersuchung konnte insgesamt einen statistisch signifikanten Effekt der BoDV-1-Infektion auf die Anzahl Lcn2-positiver Zellen feststellen. Sowohl die statistisch signifikante Wechselwirkung von Infektion und Untersuchungszeitpunkt als auch die unter 5.2.1 aufgeführten Gegenüberstellungen der verschiedenen Mauslinien zeigen jedoch, dass dieser Effekt großen Schwankungen zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten unterlag. Der Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die Lipocalin-2-Expression der kultivierten Astrozyten war demnach nicht so stark ausgeprägt wie es bei den in-vivo-Untersuchungen der Fall war.

Verschiedene Hypothesen könnten diese Diskrepanz erklären: Die Infektionsrate der kultivierten Astrozyten war um ein Vielfaches geringer als bei den in-vivo infizierten Mäusen. So betrug die durchschnittliche Infektionsrate bis zu 2,5 % der Astrozyten und das BoDV-1-N war, bedingt durch die Zell-zu-Zell-Ausbreitungsweise von BoDV-1 – stets in kleineren Gruppen von Astrozyten zu finden. In der Arbeit von HIRZ (2017) wurde ein ähnliches Verteilungsmuster beschrieben, die Infektionsrate betrug ca. 2,5 bis 5 % und lag damit in einer vergleichbaren Größenordnung vor. Die BoDV-1-Infektion in den murinen Astrozytenkulturen verläuft daher wesentlich langsamer als in vergleichbaren Kulturen von Rattenastrozyten (HIRZ, 2017; KEHR, 2016a). Sicherlich wäre die vergleichende Betrachtung BoDV-1-infizierter Rattenastrozyten interessant, um festzustellen, ob eine höhere BoDV-1-Infektionsrate mit einer weiteren Steigerung der Lcn2-Expression korreliert wäre. HALLENSLEBEN et al. (1998) stellten in vivo an BoDV-1-infizierten MRL-Mäusen ein inverses Verhältnis von zerebraler BoDV-1-RNA sowie der Stärke der inflammatorischen Reaktion und damit einhergehender klinischer Symptomatik fest. Insofern ist die direkte Verbindung zwischen BoDV-1-Infektionsrate und daraus resultierender Lcn2-Expression fraglich. Nur bei einem geringen Anteil der Astrozyten, die BoDV-1-N aufwiesen, war zugleich eine Lcn2-Expression detektierbar, so dass auf der Zellebene keine direkte Assoziation zwischen BoDV-1-Infektion und Lcn2-Synthese erkennbar war

Eine weitere Hypothese, die die Unterschiede der Lcn2-Expression nach BoDV-1-Infektion zwischen kultivierten Astrozyten und *in vivo* erklären könnte, ist die fehlende Interaktion mit anderen Gliazellen bzw. Neuronen. Im Rahmen der BoDV-1-Infektion ist das Zusammenspiel

von Neuronen. Astrozyten und Mikrogliazellen stark ausgeprägt, wobei den Astrozyten eine zentrale vermittelnde Rolle zuzukommen scheint. So sind Astrozyten in der Lage, auf die Signale BoDV-1-infizierter Neurone hin, benachbarte Mikrogliazellen zu aktivieren, welche dann durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine den Entzündungsprozess initiieren bzw. verstärken und gegebenenfalls neuronale Untergänge induzieren (OVANESOV et al., 2008a; OVANESOV et al., 2008b; OVANESOV et al., 2006). Durch die auto- und parakrine Wirkung des von aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten sezernierten Lipocalin-2 ist eine gegenseitige Verstärkung der Lcn2-Synthese dieser Zellen denkbar (JANG et al., 2013b: LEE et al., 2009), welche in einer reinen Astrozytenkultur nicht in dem Maße darstellbar ist. Es fiel darüber hinaus auf, dass auch im Laufe der Kultivierungszeit keine deutliche Tendenz zur weiteren Ausbreitung der BoDV-1-Infektion innerhalb der Astrozytenpopulation zu erkennen war. Sowohl in primären Astrozytenkulturen von neonatalen Ratten als auch in felinen Astrozyten wurde im Gegensatz zu diesem Ergebnis eine deutliche Zunahme der BoDV-N-positiven Zellen beschrieben (BILLAUD et al., 2000; KEHR, 2016a), Die BoDV-1-Infektion einer neuroglialen Mischkultur könnte die Frage bezüglich der Lipocalin-2-Expression von Astrozyten im Zusammenhang mit Neuronen und anderen Gliazellen nach BoDV-1-Infektion weiter klären.

6.2.2 Lipocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen Astrozytenkulturen nach TNF-α-Behandlung

In vivo fiel eine Assoziation zwischen dem Auftreten abnorm hypertropher Lcn2-synthetisierender Astrozyten und chronischer TNF- α -Überexpression in entsprechenden Hirnarealen bei BoDV-1-infizierten TNF- α -transgenen Mäusen nach BoDV-1-Infektion auf. Um diese reaktiven Astrozyten näher charakterisieren zu können und somit eventuell weitere Schlüsse zu ihrer Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen und Krämpfen zu ziehen, wurden die Astrozyten der verschiedenen Mauslinien mit TNF- α stimuliert und anschließend hinsichtlich der Lcn2-Expression untersucht.

Einfluss der Mauslinien auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression nach TNF- α -Behandlung in vitro

Die Astrozyten der TNF- α -transgenen und Wildtyp-Mauslinien zeigten nach TNF- α -Stimulus eine deutliche Aufregulation von Lcn2. Grundsätzlich war ein solcher Anstieg zu erwarten, da TNF- α einen potenten Induktor der Lcn2-Expression darstellt (CHAKRABORTY et al., 2012; NAUDE et al., 2012). Die Astrozyten der TNF- α -transgenen Tiere zeigten ein vergleichbares Maß der Lcn2-Expression wie die Astrozyten der Wildtyp-Tiere nach TNF- α -Inkubation. Die *In-vitro*-Untersuchungen an den Astrozyten TNF- α -transgener Mäusen lassen somit eher auf eine grundsätzlich erhöhte Reaktivität dieser Astrozyten schließen, die sich in einer größeren Fraktion Lcn2-positiver Astrozyten niederschlägt, nicht aber in einer überschießenden Lcn2-Expression infolge weiterer TNF- α -Stimulation.

Die *In-vivo*-Untersuchungen, in denen lediglich TNF-α-transgene Tiere eine Lcn2-Expression zeigten, ließen eine astrozytäre Aufregulation von Lcn2 nach TNF-α-Inkubation vermuten. Doch muss berücksichtigt werden, dass *in vivo* eine chronische Stimulation durch das transgene TNF-α vorlag, während *in vitro* durch kurzfristige Inkubation mit TNF-α ein akuter Stimulus erzeugt wurde, auf welchen die Astrozyten beider Mauslinien gleichartig reagierten. Möglicherweise stellt die Verfügbarkeit der TNF-Rezeptoren den limitierenden Faktor der Lcn2-Expression dar und führt zu der fehlenden Divergenz zwischen den Kulturen der verschiedenen Mauslinien. Die TNF-α-vermittelte Lipocalin-2-Expression erfolgt – laut den Untersuchungen von NAUDE et al. (2012) – über den TNFR1. Während der TNFR2 infolge eines TNF-α-Stimulus aufreguliert wird, soll der TNFR1 auf Astrozyten konstitutiv exprimiert werden (CHOI et al., 2005; LUNG et al., 2001). HIRZ (2017) beschreibt hingegen eine Aufregulation des TNFR1 in Astrozyten der TNF-α-transgenen Mäuse nach TNF-α-Stimulus. Diese müssten demnach eine höhere TNF-α-vermittelten NFκB-Aktivierung von der TNF-Rezeptorendichte bereits dargestellt; eine optimale NFκB-Aktivierung wurde allerdings schon bei ca. 10 –

20 %iger Rezeptorokkupanz erreicht (CHAN und AGGARWAL, 1994). Zur Klärung quantitativer Unterschiede der TNFR1-Verfügbarkeit zwischen den verschiedenen Mauslinien nach TNF-α-Stimulus, sollte diese vergleichend an Wildtyp-Astrozyten und Astrozyten der TNF-α-transgenen Mäuse untersucht werden, zum Beispiel mittels Immunfluoreszenz oder RT-PCR. Weiterhin könnten Untersuchungen mit einer größeren Konzentrationsspanne der TNF-α-Lösung helfen, die Fragestellung einer möglichen Übersättigung der TNF-Rezeptoren zu beantworten. Unterschiede zwischen den hier verwendeten Konzentrationen von TNF-α fanden sich nicht.

Die TNFR1-k.o.-Astrozyten wiesen im Vergleich zu den Astrozyten der TNF- α -transgenen Mauslinie signifikant geringere Zahlen Lcn2-positiver Astrozyten auf und nach der TNF- α -Stimulation war keine vermehrte Lcn2-Synthese zu beobachten. Dies passt zu einer ausschließlich über TNFR1-vermittelten TNF- α -Stimulation der Lcn2-Synthese (NAUDE et al., 2012). STEELAND et al. (2018) beschrieben erst kürzlich am Modell der Alzheimerschen Krankheit, dass die vornehmlich durch TNF- α über den TNFR1 vermittelte Neuroinflammation bei TNFR1-k.o.-Tieren deutlich milder ausgeprägt war und die zerebrale Lcn2-Expression deutlich geringer ausfiel. Die bisherige Literatur unterstützend, sind die Ergebnisse dieser *In-vitro*-Untersuchungen ebenfalls hinweisend auf einen mechanistischen Zusammenhang zwischen dem TNF-Rezeptor 1 und dem Signalweg der Lipocalin-2-Expression.

Die TNFR2-k.o.-Astrozyten zeigten nur einen geringen Anstieg der Lcn2-Expression infolge des TNF-α-Stimulus auf und zugleich signifikant geringere Zahlen Lcn2-positiver Astrozyten im Vergleich zu den Kulturen der TNF-α-transgenen Mäuse. Nach den Untersuchungen von NAUDE et al. (2012) verlaufen die TNF-α-vermittelten Lcn2-Signalwege ausschließlich über den TNFR1. Auf das TNFR2-signaling soll Lcn2 zudem inhibitorisch einwirken. Basierend auf dieser Literatur wäre von einer vermehrten Lcn2-Expression der Astrozyten ähnlich der der Wildtyp-Astrozyten auszugehen. Weitere Untersuchungen könnten helfen, diese unerwartet niedrige Lcn2-Expression zu verifizieren: Das Maß der Lcn2-Expression bzw. - synthese sollte durch weitere Methoden, zum Beispiel eine guantitative RT-PCR oder In-situ-Hybridisierung, überprüft werden. Eine weitere Charakterisierung des funktionellen Phänotyps der Astrozyten mit Hilfe typischer Marker würde Aufschluss bringen, ob sich diese in einem pro- oder antiinflammatorischen Zustand befinden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den gewählten TNF-α-Konzentrationen konnte bei keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Möglicherweise könnte bereits bei der niedrigen TNF-α-Konzentration (10 ng/ml) eine Rezeptorsättigung vorliegen, so dass keine Steigerung der Lcn2-Expression bei höheren TNF-α-Konzentrationen möglich ist.

Einfluss der Untersuchungszeitpunkte auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression nach TNF- α -Behandlung in vitro

Hinsichtlich des Effektes der untersuchten Zeitpunkte von 24. 48 und 72 h nach Beginn der TNF-α-Inkubation fanden sich keine durchgehend signifikanten Unterschiede zwischen den Mauslinien. Es zeigten sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Zeitpunkten, bei vergleichender Betrachtung aller Mauslinien war jedoch kein gerichteter Einfluss im Sinne einer kontinuierlichen Reduktion bzw. eines Anstiegs der Zahl Lcn2-positiver Astrozyten über die Zeitspanne erkennbar. Nach 24 h wurde eine Rate Lcn2-positiver Astrozyten erreicht, die dann grundsätzlich über 48 und 72 h bestehen blieb, ohne dass ein weiterer TNFα-Stimulus nötig war. Die Lipocalin-2-Expression stieg zwar recht unmittelbar auf den proinflammatorischen Stimulus an, sank jedoch nicht unmittelbar nach dessen Nachlassen ab. Im Zusammenhang mit immunpathologischen Prozessen könnte Lcn2 damit eine treibende proinflammatorische Kraft darstellen. Ein ähnliches Bild konnte für astrozytär sezerniertes TNF-α beschrieben werden, dessen Spiegel ebenfalls über einen längeren Zeitraum erhöht blieb, obwohl diesem lediglich ein kurzzeitiger proinflammatorischer Stimulus vorausging (LIDDELOW und BARRES, 2017; LIDDELOW et al., 2017). Im Gegensatz dazu wurde in vivo eine Assoziation zwischen der zerebralen Lipocalin-2-Synthese und dem zeitlichen Verlauf der Neuroinflammation beschrieben und Lcn2 daher auch als Biomarker propagiert (BERARD et al., 2012; MARQUES et al., 2012; RATHORE et al., 2011). Möglicherweise erklärt sich der Unterschied zwischen den In-vitro- und In-vivo-Erkenntnissen durch einen proinflammatorischen Phänotyp der Astrozyten in vitro.

Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression nach TNF- α -Behandlung in vitro

Lediglich zu einzelnen Zeitpunkten und bei einem Vergleich einzelner Mauslinien miteinander wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-Expression zwischen nicht- bzw. BoDV-1-infizierten Astrozyten beobachtet, so dass bei Betrachtung aller Mauslinien nicht von einem proinflammatorischen bzw. die Lcn2-Expression fördernden Effekt der BoDV-1-Infektion nach TNF-α-Stimulus *in vitro* ausgegangen werden kann. Die Zahl BoDV-1-infizierter Astrozyten war in allen Kulturen der verschiedenen Mauslinien gering. Grundsätzlich könnte die Auswertung größerer Zellzahlen oder durchinfizierter Kulturen helfen, den Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die Lcn2-Expression zu bestimmen.

6.2.3 Lipocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen Astrozytenkulturen nach LPS/IFN-γ-Behandlung

LPS und IFN-γ werden als sehr potente Induktoren eines proinflammatorischen "A1"-Phänotyps von Astrozyten beschrieben (JANG et al., 2013a; LIDDELOW und BARRES, 2017; LIDDELOW et al., 2017; SOFRONIEW und VINTERS, 2010). Hinsichtlich der Funktion von Astrozyten bei neuroinflammatorischen Prozessen nach LPS-Stimulus sind heterogene Ergebnisse beschrieben. Kürzlich beobachteten LIDDELOW et al. (2017) durch Untersuchungen an Csf1r-k.o.-Mäusen, welche keine Mikrogliazellen aufweisen, dass auch nach LPS-Stimulation keine proinflammatorische Polarisierung von Astrozyten erfolgte. Auch die sequentielle Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten infolge eines LPS-Stimulus lassen eine funktionelle Abhängigkeit der Astrozyten von den Mikrogliazellen vermuten (NORDEN et al., 2016). Auf der anderen Seite konnten reine Astrozytenkulturen *in vitro* durch LPS oder LPS/IFN-γ zur Expression typischer "A1"-Phänotyp-Marker angeregt werden (JANG et al., 2013a; LI et al., 2016). TARASSISHIN et al. (2014) konnten in murinen Astrozyten, was sie auf eine fehlende *cluster of differentiation 14* (CD14)-Expression humaner Astrozyten zurückführten.

Einfluss der Mauslinien auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression nach LPS/IFN-γ-Behandlung in vitro

Jede der in dieser Arbeit untersuchten Astrozytenkulturen verschiedener Mauslinien reagierte auf die LPS/IFN-y-Stimulation mit einer signifikant gesteigerten Lipocalin-2-Expression, so dass fast die gänzliche ausgewertete Astrozytenpopulation ein positives Lcn2-Signal aufwies. Der Anteil Lcn2-positiver Astrozyten war bei beiden TNFR-k.o.-Kulturen geringer als bei den Kulturen der Wildtyp- und TNF-α-transgenen Mauslinien. Dennoch war auch in diesen Kulturen die Mehrzahl der Astrozyten nach LPS/IFN-y-Behandlung Lcn2-positiv. Der fehlende bzw. geringe Einfluss der Mauslinien könnte durch die LPS- bzw. IFN-γ-vermittelten Signalwege zu erklären sein. So bewirkt die Bindung von LPS an den astrozytären pattern-recognition receptor TLR4 eine NFkB-vermittelte Synthese proinflammatorischer Zytokine und damit eine Aktivierung der Zellen (MARTORANA et al., 2015; POLTORAK et al., 1998; RANNIKKO et al., 2015). Die verstärkte Lcn2-Expression nach einem LPS-Stimulus ist demnach nicht abhängig von TNF-α, so dass die funktionellen Unterschiede der verwendeten Mauslinien, die das TNF-System betreffen, die Lcn2-Synthese nicht bzw. kaum beeinflusst haben. Ausgehend von der Rolle von LPS/IFN-y als Auslöser eines proinflammatorischen Phänotyps wird die Assoziation der Lipocalin-2-Synthese mit einer proinflammatorischen klassischen Aktivierung der Astrozyten bestätigt. Der Nachweis von typischen Markern des A1-Phänotyps der Astrozyten, zum Beispiel iNOS und IL-1, könnte helfen, den Phänotyp eindeutig zu charakterisieren.

Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression nach LPS/IFNγ-Behandlung in vitro

Die BoDV-1-infizierten Astrozyten reagierten grundsätzlich mit einer vergleichbaren Lcn2-Expression nach LPS/IFN-γ-Behandlung wie die nicht infizierten Astrozyten, so dass kein Einfluss der BoDV-1-Infektion deutlich wurde. Aufgrund des zuvor beobachteten dezenten Einflusses der BoDV-1-Infektion auf die Lcn2-Expression (siehe 6.2.1) sollten größere Astrozytenpopulationen und Kulturen mehrerer Präparationen untersucht werden.

6.2.4 Lipocalin-2 in BoDV-1- und nicht infizierten primären murinen Astrozytenkulturen nach IL-4-Behandlung

In vivo ist eine vermehrte Expression von IL-4 bei experimentell BoDV-1-infizierten Lewis-Ratten in der chronischen Krankheitsphase zu beobachten und geht mit einem Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-dominierten Immunantwort sowie einer nachlassenden Neuroinflammation einher (HATALSKI et al., 1998; PLANZ et al., 1995). IL-4 soll eine "alternative Aktivierung" von Astrozyten induzieren. Der sogenannte "A2"-Phänotyp wird mit einem antiinflammatorischen Milieu assoziiert. Für alternativ aktivierte Astrozyten ist keine Expression von Lcn2 beschrieben (JANG et al., 2013a; JANG et al., 2013b).

Einfluss der Mauslinien auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression nach IL-4-Behandlung in vitro

Die Behandlung mit IL-4 führte bei keiner der behandelten Astrozytenkulturen der verschiedenen Mauslinien zu einem signifikanten Effekt auf die Lcn2-Expression. In den Astrozytenkulturen der Wildtyp- und TNF-α-transgenen Mäuse wurde eine tendenziell geringere Zahl Lcn2positiver Zellen nach IL-4-Behandlung festgestellt als bei den unbehandelten Astrozyten der jeweiligen Mauslinie. Die Astrozyten der TNFR-k.o.-Mauslinien zeigten keine Reduktion der Lcn2-Expression nach IL-4-Behandlung. Diese Diskrepanz deutet immerhin auf eine mögliche antiinflammatorische Wirkung von IL-4 hin: Sowohl die Astrozyten der TNF-α-transgenen als auch der Wildtyp-Mäuse zeigten in vorigen Untersuchungen eine deutliche Lcn2-Expression in vitro, die einen reaktiven proinflammatorischen Phänotyp nahelegt. Die tendenzielle Reduktion der Lcn2-Expression nach IL-4-Behandlung weist auf eine Änderung des Phänotyps hin: So wäre eine deutliche Reduktion der Lcn2-Expression im Zuge einer A2-Polarisierung der Astrozyten – entsprechend der Untersuchungen von JANG et al. (2013a) – zu erwarten. Die geringe Lcn2-Expression der Lcn2-Expression der TNFR-k.o.-Astrozyten passt hingegen zu einem antiinflammatorischen Phänotyp dieser, der auch durch die Gabe von IL-4 nicht weiter beeinflusst wurde. Weitere Untersuchungen, zum Beispiel der immunhistologische Nachweis von Markern der pro- oder antiinflammatorischen Polarisierung, könnten die Astrozyten näher charakterisieren und somit diese Hypothese weiter stützen. Weiterhin könnte die Behandlung proinflammatorisch-stimulierter (z.B. durch TNF- α) Astrozyten mit IL-4 sicherlich noch zu einer aufschlussreicheren Untersuchung im Hinblick auf die astrozytäre Lcn2-Expression im Wandel vom proinflammatorischen zum antiinflammatorischen Milieu beitragen.

Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die astrozytäre Lipocalin-2-Expression nach IL-4-Behandlung in vitro

Ein Einfluss der BoDV-1-Infektion auf die Lcn2-Expression nach IL-4-Stimulation war nicht darstellbar. Es gilt jedoch auch hier, dass aufgrund des zuvor beobachteten dezenten Einflus-

ses der BoDV-1-Infektion auf die Lcn2-Expression (siehe 6.2.1) größere Astrozytenpopulationen und Kulturen mehrerer Präparationen untersucht werden müssen, um diese Fragestellung zu klären.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der Rolle von Lipocalin-2 bei immunpathologischen Prozessen nach neurotroper Virusinfektion – in diesem Fall nach BoDV-1-Infektion. Durch die Untersuchung verschiedener Mauslinien mit jeweils spezifischen Veränderungen im TNF-System sollten insbesondere Zusammenhänge zwischen TNF-α und Lcn2 beleuchtet und die mögliche Funktion von Lcn2 in der Entstehung epileptiformer Krämpfe herausgearbeitet werden.

Die Gehirne nicht-, mock- oder neonatal BoDV-1-infizierter Mäuse von Wildtyp-, TNF-α-transgenen, TNFR1-k.o-. und TNFR2-k.o.-Mäusen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mittels immunhistologischer Untersuchung und *In-Situ*-Hybridisierung im Hinblick auf die Lcn2-Expression ausgewertet. Lipocalin-2 war ausschließlich in der Gruppe BoDV-1-infizierter TNF-αtransgener Tiere sowie bei BoDV-1-infizierten vorzeitig verstorbenen bzw. euthanasierten TNFR1- oder TNFR2-k.o.-Tieren nachweisbar, bei denen epileptiforme Krämpfe beobachtet oder vermutet wurden.

Die Lipocalin-2-Expression erfolgte bei BoDV-1-infizierten TNF-α-transgenen Mäusen ab dem 42. Tag *post infectionem* und war auf Gehirnareale mit entzündlichen Veränderungen, insbesondere das Striatum, aber auch den Frontalkortex und Hippocampus beschränkt. Die Expression von Lcn2 war assoziiert mit in vorigen Arbeiten beschriebenen neuroinflammatorischen Prozessen [sowie hohen TNF-α- und insbesondere TNFR1-Spiegeln (HIRZ, 2017; KRAMER et al., 2012; SCHAUDIEN, 2007)]. Lipocalin-2 wurde insbesondere von hypertrophen Astrozyten in der Nähe perivaskulärer Infiltrate exprimiert. Der mRNA-Nachweis für Lcn2-spezifische Sequenzen verifizierte die Astrozyten als Quelle der Lcn2-Synthese. Lipocalin-2 war ferner in aktivierten Mikrogliazellen und extrazellulär im Neuroparenchym nachweisbar. In der Literatur wird dieses parenchymale Lcn2 als sezerniertes Lipocalin-2 bezeichnet (IP et al., 2011; NOCON et al., 2014).

Ein Teil der BoDV-1-infizierten TNFR1- bzw. TNFR2-k.o-Tiere mit vermutetem Krampfgeschehen zeigte ein den TNF-α-transgenen Tieren ähnelndes Bild der Lcn2-Expression, das durch Lcn2-positive Astrozyten in der Nähe perivaskulärer Entzündungszellinfiltrate gekennzeichnet war. Diese Tiere wiesen laut HIRZ (2017) die stärksten entzündlichen Veränderungen in dieser Gruppe auf. Im Gegensatz zu den TNF-α-transgenen Mäusen war Lcn2 bei diesen Tieren neben dem Striatum, Frontalkortex und Hippocampus auch im Thalamus zu finden sowie in einem größeren Anteil aktivierter Mikrogliazellen, Ependymzellen der Hirnventrikel und meningealen Zellen nachweisbar. Sämtliche verstorbene bzw. euthanasierte Tiere wiesen Lcn2-positive Endothelzellen in Blutgefäßen sämtlicher Hirnareale auf. Sezerniertes Lcn2 sowie Lcn2mRNA waren nicht detektierbar. Die Diskrepanz im Lcn2-Expressionsmuster der Tiere mit vermutetem Krampfgeschehen im Vergleich zu den TNF-α-transgenen Tieren kann auf ein anderes Stadium der Neuroinflammation hinweisen.

Die Lcn2-Expression von Astrozyten wurde weiter *in vitro* an Kulturen der verschiedenen Mauslinien untersucht. Diese wurden nicht bzw. BoDV-1-infiziert und anschließend über einen Zeitraum von 28 Tagen wöchentlich passagiert und durch eine Immunfluoreszenz-Tripelmarkierung auf Lcn2, GFAP und BoDV-1-N untersucht. Lipocalin-2 war bei den Astrozytenkulturen aller Mauslinien unabhängig des Infektionsstatus über den gesamten Untersuchungszeitraum nachweisbar. Dies könnte auf den reaktiven Phänotyp kultivierter Astrozyten zurückzuführen sein, der in der Literatur beschrieben ist (AHLEMEYER et al., 2013). Die Kulturen der TNF- α -transgenen Mäuse wiesen die meisten Lcn2-positiven Astrozyten auf. Es ist von einem indirekten Effekt der neuronalen TNF- α -Überexpression auf die Lcn2-Synthese durch eine proinflammatorische Präkonditionierung der Astrozyten auszugehen. Die BoDV-1-Infektion der Astrozyten keinflusste – trotz der insgesamt geringen Infektionsrate – die Zahl Lcn2-positiver Astrozyten ebenfalls positiv.

Die Stimulation der Astrozyten durch TNF- α induzierte in den Kulturen der Wildtyp- und TNF- α -transgenen Mäuse eine deutliche und vergleichbar hohe Aufregulation von Lcn2, nicht jedoch bei den TNFR1-k.o.-und TNFR2-k.o.-Astrozyten. Die TNFR1-Verfügbarkeit könnte für die gesteigerte Lcn2-Expression von entscheidender Bedeutung sein und sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden. Die fehlende Reaktion der TNFR2-k.o.-Astrozyten auf den TNF- α -Stimulus war auf der Hypothese der TNF- α -induzierten, TNFR1-vermittelten Lcn2-Synthese nicht erklärbar. Die BoDV-1-Infektion hatte lediglich einen geringen Einfluss auf die Lcn2-Expression nach TNF- α -Behandlung. Der proinflammatorische Stimulus durch LPS und IFN- γ führte in sämtlichen Astrozytenkulturen – unabhängig vom Infektionsstatus – zu einer fulminanten Lcn2-Expression, die auf TNF- α -unabhängige Signalwege, zum Beispiel über die Aktivierung von PRRs zurückzuführen sein muss. Die antiinflammatorische Wirkung der IL-4-Behandlung war lediglich tendenziell in den Wildtyp- und TNF- α -transgenen Kulturen – unabhängig vom Infektionsstatus – als Reduktion der Zahl Lcn2-positiver Astrozyten erkennbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die enge Verknüpfung von proinflammatorischen und prokonvulsiven Prozessen und der Expression von Lipocalin-2 *in vivo* und *vitro* auf.

Das Expressionsmuster von Lcn2 in den BoDV-1-infizierten TNF- α -transgenen Mäusen weist auf eine TNF- α -induzierte, TNFR1-vermittelte Aufregulation in diesem Modell hin und unterstützt den vermuteten synergistischen Effekt von TNF- α und BoDV-1. *In vitro* stellte sich TNF- α ebenfalls als Trigger der astrozytären TNFR1-abhängigen Aufregulation von Lcn2 dar, die aber auch durch andere proinflammatorische Stimuli, hier LPS und IFN- γ , erreicht wurde. Die starke Lcn2-Expression durch hypertrophe Astrozyten *in vivo* lässt eine regulierende Rolle der Zellen im Entzündungsgeschehen vermuten und lenkt den Fokus auf die weitere Charakterisierung des funktionellen Phänotyps dieser Zellen.

Eine Aufregulation von Lcn2 im Kontext epileptiformer Krämpfe – hier bei den TNFR1- bzw. TNFR2-k.o.-Tieren mit vermutetem oder bestätigtem Krampfgeschehen – konnte gezeigt werden. Grundsätzlich entsprachen die Gehirnareale mit der stärksten Lcn2-Expression den Arealen mit veränderten Expressionsprofilen der Glutamattransporter (HIRZ, 2017). Inwiefern Lcn2 proinflammatorische und prokonvulsive Effekte induzieren kann, sollte, z.B. mit Hilfe von BoDV-1-infizierten TNF- α -transgenen Lcn2-k.o.-Mäusen und/oder Lcn2-Stimuli an kultivierten Astrozyten, weiter untersucht werden.

8 SUMMARY

The objective of this study was the characterization of the role of lipocalin-2 in immunopathological conditions caused by a neurotropic virus infection employing the BoDV-1-infection. For this purpose, different mouse lines harboring specific alterations of the TNF-system were used to investigate Lcn2-production in the brain, to gain some insights into possible interdependencies between TNF- α - and Lcn2-signalling and to clarify the possible function of Lcn2 in the pathogenesis of epileptiformic seizures after neurotropic BoDV-1-virus infection.

The brains of non-infected, mock-infected or BoDV-1-infected wild-type, TNF- α -transgenic, TNFR1-k.o.- and TNFR2-k.o.-mice were examined for the expression of Lcn2 at different time points by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Detection of Lcn2 was only possible in BoDV-1-infected TNF- α -transgenic mice as well as in BoDV-1-infected TNFR1- and TNFR2-k.o. mice that died or were euthanized due to suspected or proven epileptiformic seizures (HIRZ, 2017).

In BoDV-1-infected TNF-α-transgenic mice, Lcn2-immunoreactivity was predominantly found in brain areas with inflammatory changes, especially in the striatum, but also in the frontal cerebral cortex and hippocampus, starting on day 42 pi. Detection of Lcn2-mRNA was used to verify astrocytes as the source of Lcn2-The expression of Lcn2 was associated with neuroin-flammatory processes as well as increased levels of TNF-α and especially TNFR1 as already described in previous studies (HIRZ, 2017; KRAMER, 2006; KRAMER et al., 2012; SCHAUDIEN, 2007). Lcn2 was predominantly expressed by hypertrophic astrocytes adjacent to perivascular inflammatory infiltrates and the detection of Lcn2-mRNA verified them as source of Lcn2. Furthermore, Lcn2 was detected in activated microglia and extracellularly in the neuropil. The neuroparenchymal Lcn2 was referred to as "secreted" Lcn2 according to previous studies (IP et al., 2011; NOCON et al., 2014).

The Lcn2-expression in some of the BoDV-1-infected TNFR1- and TNFR2-k.o. mice showing marked neuroinflammation was similar to that observed in BoDV-1-infected TNF- α -transgenic mice characterized by Lcn2-positive astrocytes around perivascular inflammatory infiltrates. In contrast to the BoDV-1-infected TNF- α -transgenic mice, Lcn2 was additionally detected in the thalamus, in ependymal cells of the brain ventricles, meningeal cells and to a greater extend in activated microglia cells. Moreover, Lcn2-positive endothelial cells were found in all examined brain regions of the BoDV-1-infected TNFR1- or TNFR2-k.o. mice that died or were euthanized. Secreted Lcn2 was not detected in these animals.

The discrepancy regarding the Lcn2-expression pattern between the described TNFR1- or TNFR2-mice and TNF- α -transgenic mice might be due to a different neuroinflammatory stage.

The astrocytic expression of Lcn2 was further examined *in vitro* using cell cultures derived from the different mouse lines as described above. The astrocyte cultures were either non- or BoDV-1-infected, weekly passaged over 28 dpi and examined using indirect immunofluorescence to detect Lcn2- BoDV-1- and GFAP.

Regardless of BoDV-1-infection, Lcn2 was detectable in cultures of all mouse lines. The increased Lcn2-expression might be correlated to the reactive phenotype of the astrocytic culture as already described for cultured astrocytes (AHLEMEYER et al., 2013). Cultures of TNF- α -transgenic mice revealed the highest amounts of Lcn2-positive astrocytes, therefore, an indirect effect of neuronal TNF- α -overexpression on Lcn2-synthesis by a proinflammatory preconditioning of astrocytes is assumed. Despite a low infection rate, BoDV-1-infection further increased the numbers of Lcn2-positive astrocytes.

TNF- α -treatment induced a marked upregulation of Lcn2 in the cultures of wild type and TNF- α -transgenic mice. Contrarily, in the cultures of TNF1- and TNFR2-k.o.-mice Lcn2-expression was not affected by TNF- α . Again, availability of TNFR1 could be crucial for the increase in Lcn2 and remains to be further clarified considering the Lcn2-immunoreactivity in subsequent studies. The lack of response to the TNF- α -treatment observed in the cultures of TNFR2-k.o.-mice remains questionable considering the hypothesis of a TNF- α -induced, TNFR1-mediated upregulation of Lcn2. BoDV-1-infection induced a slight upregulation of Lcn2-expression after treatment with TNF- α .

Proinflammatory stimulation with LPS and IFN- γ resulted in a tremendously increased Lcn2expression in all cultures from the different mouse lines regardless of the infection status, probably independent from TNF- α -signalling, e.g. via PPRs.

Anti-inflammatory stimulation with IL-4 in tendency slightly reduced the rate of Lcn2-positive astrocytes in the cultures of TNF-α-transgenic and wild type mice. Lcn2-expression after IL-4-treatment was not affected by BoDV-1-infection.

The results of the study point out the close relationship between proinflammatory and proconvulsive processes and the expression of Lcn2 *in vitro* and *in vivo*. The expression pattern of Lcn2 in BoDV-1-infected TNF- α -transgenic mice indicates a TNF- α -induced, TNFR1-mediated upregulation of Lcn2 in this model supporting a synergistic effect of TNF- α and Lcn2. *In vitro*, TNF- α was verified as an inducer of the astrocytic TNFR1-dependent upregulation of Lcn2. Additionally, an increased expression of Lcn2 was also induced by further proinflammatory stimuli such as LPS und IFN- γ . The strong Lcn2-expression observed in hypertrophic astrocytes suggests their regulatory function in inflammatory conditions and highlights the need for further characterization of their functional phenotype. An upregulation of Lcn2 was detected in the context of epileptiformic seizures – namely in TNFR1- or TNFR2-k.o.-mice with suggested or proven symptoms of seizures. Additionally, regions showing a strong expression of Lcn2 in principal corresponded to regions with altered expression profiles of glutamate transporters as described by HIRZ (2017).

For clarification if and how Lcn2 is involved in proinflammatory and proconvulsive effects further investigations, e.g. using BoDV-1-infected TNF- α -transgenic versus Lcn2-k.o. mice and/or Lcn2-treatment of cultivated astrocytes should be considered.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBOTT, N. J. (2002). Astrocyte–Endothelial Interactions and Blood–Brain Barrier Permeability. Journal of Anatomy, 200, 629-638.
- ABBOTT, N. J. (2005). Dynamics of CNS Barriers: Evolution, Differentiation, and Modulation. Cellular and Molecular Neurobiology, 25, 5-23.
- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. und HANSSON, E. (2006). Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 41-53.
- ABELLA, V., SCOTECE, M., CONDE, J., GÓMEZ, R., LOIS, A., PINO, J., GÓMEZ-REINO, J. J., LAGO, F., MOBASHERI, A. und GUALILLO, O. (2015). The Potential of Lipocalin-2/NGAL as Biomarker for Inflammatory and Metabolic Diseases. *Biomarkers*, 20, 565-571.
- ADERKA, D., ENGELMANN, H., MAOR, Y., BRAKEBUSCH, C. und WALLACH, D. (1992). Stabilization of the Bioactivity of Tumor Necrosis Factor by its Soluble Receptors. *The Journal* of Experimental Medicine, **175**, 323-329.
- AFONSO, C. L., AMARASINGHE, G. K., BÁNYAI, K., BÀO, Y., BASLER, C. F., BAVARI, S., BEJERMAN, N., BLASDELL, K. R., BRIAND, F.-X., BRIESE, T., BUKREYEV, A., CALISHER, C. H., CHANDRAN, K., CHÉNG, J., CLAWSON, A. N., COLLINS, P. L., DIETZGEN, R. G., DOLNIK, O., DOMIER, L. L., DÜRRWALD, R., DYE, J. M., EASTON, A. J., EBIHARA, H., FARKAS, S. L., FREITAS-ASTÚA, J., FORMENTY, P., FOUCHIER, R. A. M., FÙ, Y., GHEDIN, E., GOODIN, M. M., HEWSON, R., HORIE, M., HYNDMAN, T. H., JIĀNG, D., KITAJIMA, E. W., KOBINGER, G. P., KONDO, H., KURATH, G., LAMB, R. A., LENARDON, S., LEROY, E. M., LI, C.-X., LIN, X.-D., LIÚ, L., LONGDON, B., MARTON, S., MAISNER, A., MÜHLBERGER, E., NETESOV, S. V., NOWOTNY, N., PATTERSON, J. L., PAYNE, S. L., PAWESKA, J. T., RANDALL, R. E., RIMA, B. K., ROTA, P., RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., SHI, M., SMITHER, S. J., STENGLEIN, M. D., STONE, D. M., TAKADA, A., TERREGINO, C., TESH, R. B., TIAN, J.-H., TOMONAGA, K., TORDO, N., TOWNER, J. S., VASILAKIS, N., VERBEEK, M., VOLCHKOV, V. E., WAHL-JENSEN, V., WALSH, J. A., WALKER, P. J., WANG, D., WANG, L.-F., WETZEL, T., WHITFIELD, A. E., XIÈ, J., YUEN, K.-Y., ZHANG, Y.-Z. und KUHN, J. H. (2016). Taxonomy of the Order Mononegavirales: Update 2016. Archives of Virology, 161, 2351-2360.
- AGGARWAL, B. B., GUPTA, S. C. und KIM, J. H. (2012). Historical Perspectives on Tumor Necrosis Factor and its Superfamily: 25 Years Later, a Golden Journey. *Blood*, **119**, 651-665.

- AGGARWAL, B. B., SAMANTA, A. und FELDMANN, M. (2000). TNF Receptors. Cytokine Reference, 1620-1632.
- AGULHON, C., PETRAVICZ, J., MCMULLEN, A. B., SWEGER, E. J., MINTON, S. K., TAVES, S. R., CASPER, K. B., FIACCO, T. A. und MCCARTHY, K. D. (2008). What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology? *Neuron*, **59**, 932-946.
- AHLEMEYER, B., KEHR, K., RICHTER, E., HIRZ, M., BAUMGART-VOGT, E. und HERDEN, C. (2013). Phenotype, Differentiation, and Function Differ in Rat and Mouse Neocortical Astrocytes Cultured under the Same Conditions. *Journal of Neuroscience Methods*, 212, 156-164.
- AIGNER, F., MAIER, H. T., SCHWELBERGER, H. G., WALLNOFER, E. A., AMBERGER, A., OBRIST, P., BERGER, T., MAK, T. W., MAGLIONE, M., MARGREITER, R., SCHNEEBERGER, S. und TROPPMAIR, J. (2007). Lipocalin-2 Regulates the Inflammatory Response during Ischemia and Reperfusion of the Transplanted Heart. *American Journal of Transplantation*, 7, 779-788.
- AKASSOGLOU, K., BAUER, J., KASSIOTIS, G., PASPARAKIS, M., LASSMANN, H., KOLLIAS, G. und PROBERT, L. (1998). Oligodendrocyte Apoptosis and Primary Demyelination Induced by Local TNF/p55TNF Receptor Signaling in the Central Nervous System of Transgenic Mice: Models for Multiple Sclerosis with Primary Oligodendrogliopathy. *The American Journal of Pathology*, **153**, 801-813.
- AL NIMER, F., ELLIOTT, C., BERGMAN, J., KHADEMI, M., DRING, A. M., AEINEHBAND, S., BERGENHEIM, T., ROMME CHRISTENSEN, J., SELLEBJERG, F., SVENNINGSSON, A., LININGTON, C., OLSSON, T. und PIEHL, F. (2016). Lipocalin-2 is Increased in Progressive Multiple Sclerosis and Inhibits Remyelination. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 3, e191.
- ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOV, R. und FLAVELL, R. A. (2001). Recognition of Double-Stranded RNA and Activation of NFkB by Toll-like Receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.
- ALMEIDA-SUHETT, C. P., LI, Z., MARINI, A. M., BRAGA, M. F. und EIDEN, L. E. (2014). Temporal Course of Changes in Gene Expression Suggests a Cytokine-Related Mechanism for Long-Term Hippocampal Alteration after Controlled Cortical Impact. *Journal of Neurotrauma*, **31**, 683-690.

- AMARASINGHE, G. K., ARÉCHIGA CEBALLOS, N. G., BANYARD, A. C., BASLER, C. F., BAVARI, S., BENNETT, A. J., BLASDELL, K. R., BRIESE, T., BUKREYEV, A., CAÌ, Y., CALISHER, C. H., CAMPOS LAWSON, C., CHANDRAN, K., CHAPMAN, C. A., CHIU, C. Y., CHOI, K.-S., COLLINS, P. L., DIETZGEN, R. G., DOLJA, V. V., DOLNIK, O., DOMIER, L. L., DÜRRWALD, R., DYE, J. M., EASTON, A. J., EBIHARA, H., ECHEVARRÍA, J. E., FOOKS, A. R., FORMENTY, P. B. H., FOUCHIER, R. A. M., FREULING, C. M., GHEDIN, E., GOLDBERG, T. L., HEWSON, R., HORIE, M., HYNDMAN, T. H., JIĀNG, D., KITYO, R., KOBINGER, G. P., KONDŌ, H., KOONIN, E. V., KRUPOVIC, M., KURATH, G., LAMB, R. A., LEE, B., LEROY, E. M., MAES, P., MAISNER, A., MARSTON, D. A., MOR, S. K., MÜLLER, T., MÜHLBERGER, E., RAMÍREZ, V. M. N., NETESOV, S. V., NG, T. F. F., NOWOTNY, N., PALACIOS, G., PATTERSON, J. L., PAWĘSKA, J. T., PAYNE, S. L., PRIETO, K., RIMA, B. K., ROTA, P., RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., SIDDELL, S., SMITHER, S. J., SONG, Q., SONG, T., STENGLEIN, M. D., STONE, D. M., TAKADA, A., TESH, R. B., THOMAZELLI, L. M., TOMONAGA, K., TORDO, N., TOWNER, J. S., VASILAKIS, N., VÁZQUEZ-MORÓN, S., VERDUGO. C., VOLCHKOV. V. E., WAHL. V., WALKER, P. J., WANG, D., WANG, L.-F., WELLEHAN, J. F. X., WILEY, M. R., WHITFIELD, A. E., WOLF, Y. I., YÈ, G., ZHĀNG, Y.-Z. und KUHN, J. H. (2018). Taxonomy of the Order Mononegavirales: Update 2018. Archives of Virology, 163, 2283-2294.
- AMARASINGHE, G. K., BÀO, Y., BASLER, C. F., BAVARI, S., BEER, M., BEJERMAN, N., BLASDELL, K. R., BOCHNOWSKI, A., BRIESE, T., BUKREYEV, A., CALISHER, C. H., CHANDRAN, K., COLLINS, P. L., DIETZGEN, R. G., DOLNIK, O., DÜRRWALD, R., DYE, J. M., EASTON, A. J., EBIHARA, H., FANG, Q., FORMENTY, P., FOUCHIER, R. A. M., GHEDIN, E., HARDING, R. M., HEWSON, R., HIGGINS, C. M., HONG, J., HORIE, M., JAMES, A. P., JIÃNG, D., KOBINGER, G. P., KONDO, H., KURATH, G., LAMB, R. A., LEE, B., LEROY, E. M., LI, M., MAISNER, A., MÜHLBERGER, E., NETESOV, S. V., NOWOTNY, N., PATTERSON, J. L., PAYNE, S. L., PAWESKA, J. T., PEARSON, M. N., RANDALL, R. E., REVILL, P. A., RIMA, B. K., ROTA, P., RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., SMITHER, S. J., SONG, Q., STONE, D. M., TAKADA, A., TERREGINO, C., TESH, R. B., TOMONAGA, K., TORDO, N., TOWNER, J. S., VASILAKIS, N., VOLCHKOV, V. E., WAHL-JENSEN, V., WALKER, P. J., WANG, B., WANG, D., WANG, F., WANG, L.-F., WERREN, J. H., WHITFIELD, A. E., YAN, Z., YE, G. und KUHN, J. H. (2017). Taxonomy of the Order *Mononegavirales*: Update 2017. *Archives of Virology*, 162, 2493-2504.
- AMBJORN, M., ASMUSSEN, J. W., LINDSTAM, M., GOTFRYD, K., JACOBSEN, C., KISELYOV, V.
 V., MOESTRUP, S. K., PENKOWA, M., BOCK, E. und BEREZIN, V. (2008). Metallothionein and a Peptide Modeled after Metallothionein, EmtinB, Induce Neuronal Differentiation and Survival through Binding to Receptors of the Low-Density Lipoprotein Receptor Family. *Journal* of Neurochemistry, 104, 21-37.

- ANDERSON, M. A., AO, Y. und SOFRONIEW, M. V. (2014). Heterogeneity of Reactive Astrocytes. Neuroscience Letters, 565, 23-29.
- ANNUNZIATO, F., COSMI, L., LIOTTA, F., LAZZERI, E., MANETTI, R., VANINI, V., ROMAGNANI, P., MAGGI, E. und ROMAGNANI, S. (2002). Phenotype, Localization, and Mechanism of Suppression of CD4⁺CD25⁺ Human Thymocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, **196**, 379-387.
- ARNETT, H. A., MASON, J., MARINO, M., SUZUKI, K., MATSUSHIMA, G. K. und TING, J. P. Y. (2001). TNFα Promotes Proliferation of Oligodendrocyte Progenitors and Remyelination. *Nature Neuroscience*, 4, 1116-1122.
- ARUMUGAM, T. V., OKUN, E., TANG, S.-C., THUNDYIL, J., TAYLOR, S. M. und WOODRUFF, T. M. (2009). Toll-Like Receptors In Ischemia-Reperfusion Injury. *Shock*, **32**, 4-16.
- AXELSSON, L., BERGENFELDT, M. und OHLSSON, K. (1995). Studies of the Release and Turnover of a Human Neutrophil Lipocalin. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 55, 577-588.
- BABCOCK, A. A., KUZIEL, W. A., RIVEST, S. und OWENS, T. (2003). Chemokine Expression by Glial Cells Directs Leukocytes to Sites of Axonal Injury in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 23, 7922-7930.
- BALOSSO, S., RAVIZZA, T., ARONICA, E. und VEZZANI, A. (2013). The Dual Role of TNF-α and its Receptors in Seizures. *Experimental Neurology*, **247**, 267-271.
- BALOSSO, S., RAVIZZA, T., PEREGO, C., PESCHON, J., CAMPBELL, I. L., DE SIMONI, M. G. und VEZZANI, A. (2005). Tumor Necrosis Factor-α Inhibits Seizures in Mice via p75 Receptors Annals of Neurology, 57.
- BANDO, M., HIROSHIMA, Y., KATAOKA, M., SHINOHARA, Y., HERZBERG, M. C., ROSS, K. F., NAGATA, T. und KIDO, J.-I. (2007). Interleukin-1α Regulates Antimicrobial Peptide Expression in Human Keratinocytes. *Immunology And Cell Biology*, **85**, 532.
- BARBIERATO, M., FACCI, L., ARGENTINI, C., MARINELLI, C., D. SKAPER, S. und GIUSTI, P. (2013). Astrocyte-Microglia Cooperation in the Expression of a Pro-Inflammatory Phenotype. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 12, 608-618.

- BAUTISTA, J. R., SCHWARTZ, G. J., DE LA TORRE, J. C., MORAN, T. H. und CARBONE, K. M. (1994). Early and Persistent Abnormalities in Rats with Neonatally Acquired Borna Disease Virus Infection. *Brain Research Bulletin*, 34, 31-40.
- BEATTIE, E. C., STELLWAGEN, D., MORISHITA, W., BRESNAHAN, J. C., HA, B. K., VON ZASTROW, M., BEATTIE, M. S. und MALENKA, R. C. (2002). Control of Synaptic Strength by Glial TNF-α. Science, 295.
- BELYI, V. A., LEVINE, A. J. und SKALKA, A. M. (2010). Unexpected Inheritance: Multiple Integrations of Ancient Bornavirus and Ebolavirus/Marburgvirus Sequences in Vertebrate Genomes. *PLOS Pathogens*, 6, e1001030.
- BERARD, J. L., ZARRUK, J. G., ARBOUR, N., PRAT, A., YONG, V. W., JACQUES, F. H., AKIRA, S. und DAVID, S. (2012). Lipocalin 2 is a Novel Immune Mediator of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Pathogenesis and is Modulated in Multiple Sclerosis. *Glia*, 60, 1145-1159.
- BERNARDINO, L., XAPELLI, S., SILVA, A. P., JAKOBSEN, B., POULSEN, F. R., OLIVEIRA, C. R., VEZZANI, A., MALVA, J. O. und ZIMMER, J. (2005). Modulator Effects of Interleukin-1β and Tumor Necrosis Factor-α on AMPA-induced Excitotoxicity in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Journal of Neuroscience*, 25, 6734-6744.
- BEUTLER, B. A., MILSARK, I. W. und CERAMI, A. (1985). Cachectin/Tumor Necrosis Factor: Production, Distribution, and Metabolic Fate *in vivo*. *The Journal of Immunology*, **135**, 3972-3977.
- BEZZI, P., DOMERCQ, M., BRAMBILLA, L., GALLI, R., SCHOLS, D., DE CLERCQ, E., VESCOVI, A., BAGETTA, G., KOLLIAS, G., MELDOLESI, J. und VOLTERRA, A. (2001). CXCR4-Activated Astrocyte Glutamate Release via TNFα: Amplification by Microglia Triggers Neurotoxicity. *Nature Neuroscience*, 4, 702-710.
- BI, F., HUANG, C., TONG, J., QIU, G., HUANG, B., WU, Q., LI, F., XU, Z., BOWSER, R., XIA, X.-G. und ZHOU, H. (2013). Reactive Astrocytes Secrete Lcn2 to Promote Neuron Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 4069-4074.
- BILLAUD, J. N., LY, C., PHILLIPS, T. R. und DE LA TORRE, J. C. (2000). Borna Disease Virus Persistence Causes Inhibition of Glutamate Uptake by Feline Primary Cortical Astrocytes. *Journal of Virology*, **74**, 10438-10446.
- BILZER, T. und STITZ, L. (1994). Immune-Mediated Brain Atrophy. CD8⁺ T-Cells Contribute to Tissue Destruction during Borna Disease. *The Journal of Immunology*, **153**, 818-823.

- BINZ, T., LEBELT, J., NIEMANN, H. und HAGENAU, K. (1994). Sequence Analyses of the p24 Gene of Borna Disease Virus in Naturally Infected Horse, Donkey and Sheep. *Virus Research*, 34, 281-289.
- BODE, L., DURRWALD, R. und LUDWIG, H. (1994). Borna Virus Infections in Cattle Associated with Fatal Neurological Disease. *Veterinary Record*, 135, 283-284.
- BODMER, J.-L., SCHNEIDER, P. und TSCHOPP, J. (2002). The Molecular Architecture of the TNF Superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, **27**, 19-26.
- BOLIGNANO, D., DELLA TORRE, A., LACQUANITI, A., COSTANTINO, G., FRIES, W. und BUEMI,
 M. (2010). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Levels in Patients With Crohn Disease Undergoing Treatment With Infliximab. *Journal of Investigative Medicine*, 58, 569-571.
- BONNAUD, E. M., SZELECHOWSKI, M., BÉTOURNÉ, A., FORET, C., THOUARD, A., GONZALEZ-DUNIA, D. und MALNOU, C. E. (2015). Borna Disease Virus Phosphoprotein Modulates Epigenetic Signaling in Neurons To Control Viral Replication. *Journal of Virology*, 89, 5996-6008.
- BOURG, M., HERZOG, S., ENCARNACAO, J. A., NOBACH, D., LANGE-HERBST, H., EICKMANN,
 M. und HERDEN, C. (2013). Bicolored White-Toothed Shrews as Reservoir for Borna Disease
 Virus, Bavaria, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 2064-2066.
- BOURTEELE, S., OESTERLE, K., PLESCHKA, S., UNTERSTAB, G., EHRHARDT, C., WOLFF, T., LUDWIG, S. und PLANZ, O. (2005). Constitutive Activation of the Transcription Factor NF-κB Results in Impaired Borna Disease Virus Replication. *Journal of Virology*, **79**, 6043-6051.
- BRADLEY, J. R., THIRU, S. und POBER, J. S. (1995). Disparate Localization of 55-kd and 75-kd Tumor Necrosis Factor Receptors in Human Endothelial Cells. *American Journal of Pathology*, 146, 27-32.
- BRAMANTI, V., TOMASSONI, D., AVITABILE, M., AMENTA, F. und AVOLA, R. (2010). Biomarkers of Glial Cell Proliferation and Differentiation in Culture. *Frontiers in Bioscience*, 2, 558-570.
- BRATT, T., OHLSON, S. und BORREGAARD, N. (1999). Interactions Between Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Natural Lipophilic Ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -*General Subjects*, 1472, 262-269.

- BREDER, C. D., TSUJIMOTO, M., TERANO, Y., SCOTT, D. W. und SAPER, C. B. (1993). Distribution and Characterization of Tumor Necrosis Factor-α-like Immunoreactivity in the Murine Central Nervous System. *The Journal of Comparative Neurology*, **337**, 543-567.
- BRENNER, D., BLASER, H. und MAK, T. W. (2015). Regulation of Tumour Necrosis Factor Signalling: Live or Let Die. Nature Reviews Immunology, 15, 362-374.
- BRIESE, T., DE LA TORRE, J. C., LEWIS, A., LUDWIG, H. und LIPKIN, W. I. (1992). Borna Disease Virus, a Negative-Strand RNA-Virus, Transcribes in the Nucleus of Infected Cells. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, 89, 11486-11489.
- BRIESE, T., LIPKIN, W. I. und DE LA TORRE, J. C. (1995). Molecular Biology of Borna Disease Virus. Current Topics in Microbiology & Immunology, 190, 1-16.
- BRIESE, T., SCHNEEMANN, A., LEWIS, A. J., PARK, Y. S., KIM, S., LUDWIG, H. und LIPKIN, W. I. (1994). Genomic Organization of Borna Disease Virus. *Proceedings of the National Academy* of Sciences, 91, 4362-4366.
- BRISCOE, D. M., COTRAN, R. S. und POBER, J. S. (1992). Effects of Tumor Necrosis Factor, Lipopolysaccharide, and IL-4 on the Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 *in vivo*. Correlation with CD3⁺ T Cell Infiltration. *The Journal of Immunology*, **149**, 2954-2960.
- BROCKHAUS, M., SCHOENFELD, H. J., SCHLAEGER, E. J., HUNZIKER, W., LESSLAUER, W. und LOETSCHER, H. (1990). Identification of Two Types of Tumor Necrosis Factor Receptors on Human Cell Lines by Monoclonal Antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 3127-3131.
- BRUCE, A. J., BOLING, W., KINDY, M. S., PESCHON, J., KRAEMER, P. J., CARPENTER, M. K., HOLTSBERG, F. W. und MATTSON, M. P. (1996). Altered Neuronal and Microglial Responses to Excitotoxic and Ischemic Brain Injury in Mice Lacking TNF Receptors. *Nature Medicine*, 2, 788-794.
- BSIBSI, M., RAVID, R., GVERIC, D. und VAN NOORT, J. M. (2002). Broad Expression of Toll-like Receptors in the Human Central Nervous System. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61, 1013-1021.
- BURDA, J. E., BERNSTEIN, A. M. und SOFRONIEW, M. V. (2016). Astrocyte Roles in Traumatic Brain Injury. Experimental Neurology, 275, Part 3, 305-315.

- BUSH, T. G., PUVANACHANDRA, N., HORNER, C. H., POLITO, A., OSTENFELD, T., SVENDSEN,
 C. N., MUCKE, L., JOHNSON, M. H. und SOFRONIEW, M. V. (1999). Leukocyte Infiltration,
 Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive
 Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron*, 23, 297-308.
- BUSHONG, E. A., MARTONE, M. E., JONES, Y. Z. und ELLISMAN, M. H. (2002). Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *The Journal of Neuroscience*, 22, 183-192.
- BUTCHI, N. B., DU, M. und PETERSON, K. E. (2010). Interactions between TLR7 and TLR9 Agonists and Receptors Regulate Innate Immune Responses by Astrocytes and Microglia. *Glia*, **58**, 650-664.
- CABAL-HIERRO, L. und LAZO, P. S. (2012). Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor Receptors. Cellular Signalling, 24, 1297-1305.
- CAHOY, J. D., EMERY, B., KAUSHAL, A., FOO, L. C., ZAMANIAN, J. L., CHRISTOPHERSON, K.
 S., XING, Y., LUBISCHER, J. L., KRIEG, P. A., KRUPENKO, S. A., THOMPSON, W. J. und
 BARRES, B. A. (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and
 Oligodendrocytes: a New Resource for Understanding Brain Development and Function.
 Journal of Neuroscience, 28, 264-278.
- CALDERON, T. M., EUGENIN, E. A., LOPEZ, L., KUMAR, S. S., HESSELGESSER, J., RAINE, C. S. und BERMAN, J. W. (2006). A Role for CXCL12 (SDF-1α) in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Regulation of CXCL12 Expression in Astrocytes by Soluble Myelin Basic Protein. *Journal of Neuroimmunology*, **177**, 27-39.
- **CAMELO, S., LAFAGE, M. und LAFON, M. (2000)**. Absence of the p55 Kd TNF-α Receptor Promotes Survival in Rabies Virus Acute Encephalitis. *Journal of Neurovirology*, **6**, 507-518.
- CAPLAZI, P., MELZER, K., GOETZMANN, R., ROHNER-COTTI, A., BRACHER, V., ZLINSZKY, K. und EHRENSPERGER, F. (1999). [Borna Disease in Switzerland and in the Principality of Liechtenstein]. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde, 141, 521-527.
- CAPLAZI, P., WALDVOGEL, A., STITZ, L., BRAUN, U. und EHRENSPERGER, F. (1994). Borna Disease in Naturally Infected Cattle. *Journal of Comparative Pathology*, **111**, 65-72.

- CARBONE, K. M., DUCHALA, C. S., GRIFFIN, J. W., KINCAID, A. L. und NARAYAN, O. (1987). Pathogenesis of Borna Disease in Rats: Evidence that Intraaxonal Spread is the Major Route for Virus Dissemination and the Determinant for Disease Incubation. *Journal of Virology*, 61, 3431-3440.
- CARBONE, K. M., MOENCH, T. R. und LIPKIN, W. I. (1991). Borna Disease Virus Replicates in Astrocytes, Schwann Cells and Ependymal Cells in Persistently Infected Rats: Location of Viral Genomic and Messenger RNAs by In Situ Hybridization. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **50**, 205-214.
- CARBONE, K. M., TRAPP, B. D., GRIFFIN, J. W., DUCHALA, C. S. und NARAYAN, O. (1989). Astrocytes and Schwann Cells are Virus-Host Cells in the Nervous System of Rats with Borna Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **48**, 631-644.
- CARPENTIER, P. A., BEGOLKA, W. S., OLSON, J. K., ELHOFY, A., KARPUS, W. J. und MILLER,
 S. D. (2005). Differential Activation of Astrocytes by Innate and Adaptive Immune Stimuli. *Glia*, 49, 360-374.
- CARPENTIER, P. A., GETTS, M. T. und MILLER, S. D. (2008). Pro-Inflammatory Functions of Astrocytes Correlate with Viral Clearance and Strain-Dependent Protection from TMEV-Induced Demyelinating Disease. Virology, 375, 24-36.
- CARRO, E., SPUCH, C., TREJO, J. L., ANTEQUERA, D. und TORRES-ALEMAN, I. (2005). Choroid Plexus Megalin is Involved in Neuroprotection by Serum Insulin-Like Growth Factor I. *The Journal of Neuroscience*, 25, 10884-10893.
- CARSWELL, E. A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N. und WILLIAMSON, B. (1975). An Endotoxin-Induced Serum Factor that Causes Necrosis of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **72**, 3666-3670.
- CASTANOS-VELEZ, E., MAERLAN, S., OSORIO, L. M., ABERG, F., BIBERFELD, P., ORN, A. und ROTTENBERG, M. E. (1998). Trypanosoma Cruzi Infection in Tumor Necrosis Factor Receptor p55-Deficient Mice. *Infection and Immunity*, 66, 2960-2968.
- CEKANAVICIUTE, E. und BUCKWALTER, M. S. (2016). Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*, **13**, 685-701.

- CHAKRABORTY, S., KAUR, S., GUHA, S. und BATRA, S. K. (2012). The Multifaceted Roles of Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) in Inflammation and Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1826**, 129-169.
- CHAN, H. und AGGARWAL, B. B. (1994). Role of Tumor Necrosis Factor Receptors in the Activation of Nuclear Factor-κB in Human Histiocytic Lymphoma U-937 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 31424-31429.
- CHAO, C. C., HU, S., SHENG, W. S., BU, D., BUKRINSKY, M. I. und PETERSON, P. K. (1996). Cytokine-Stimulated Astrocytes Damage Human Neurons via a Nitric Oxide Mechanism. *Glia*, 16, 276-284.
- CHASE, G., MAYER, D., HILDEBRAND, A., FRANK, R., HAYASHI, Y., TOMONAGA, K. und SCHWEMMLE, M. (2007). Borna Disease Virus Matrix Protein is an Integral Component of the Viral Ribonucleoprotein Complex that Does Not Interfere with Polymerase Activity. *Journal of Virology*, **81**, 743-749.
- CHATURVEDI, M. M., LAPUSHIN, R. und AGGARWAL, B. B. (1994). Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin. Qualitative and Quantitative Differences in the Mediation of Early and Late Cellular Response. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 14575-14583.
- CHEN, G. und GOEDDEL, D. V. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. Science, 296, 1634-1635.
- CHEN, W.-W., ZHANG, X. I. A. und HUANG, W.-J. (2016). Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, **13**, 3391-3396.
- CHEN, X., BÄUMEL, M., MÄNNEL, D. N., HOWARD, O. M. Z. und OPPENHEIM, J. J. (2007). Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, **179**, 154-161.
- CHEN, X., SUBLESKI, J. J., KOPF, H., HOWARD, O. M. Z., MÄNNEL, D. N. und OPPENHEIM, J. J. (2008). Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, **180**, 6467-6471.
- CHEONG, H. K., CHEONG, C., LEE, Y. S., SEONG, B. L. und CHOI, B. S. (1999). Structure of Influenza Virus Panhandle RNA Studied by NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *Nucleic Acids Research*, 27, 1392-1397.

- CHIA, W.-J., DAWE, G. S. und ONG, W.-Y. (2011). Expression and Localization of the Iron– Siderophore Binding Protein Lipocalin 2 in the Normal Rat Brain and after Kainate-Induced Excitotoxicity. *Neurochemistry International*, 59, 591-599.
- CHIA, W. J., TAN, F. C., ONG, W. Y. und DAWE, G. S. (2015). Expression and Localisation of Brain-Type Organic Cation Transporter (BOCT/24p3R/LCN2R) in the Normal Rat Hippocampus and after Kainate-Induced Excitotoxicity. *Neurochemistry International*, 87, 43-59.
- CHOI, S. J., LEE, K. H., PARK, H. S., KIM, S. K., KOH, C. M. und PARK, J. Y. (2005). Differential Expression, Shedding, Cytokine Regulation and Function of TNFR1 and TNFR2 in Human Fetal Astrocytes. Yonsei Medical Journal, 46, 818-826.
- CHOY, Y.-J., HONG, S.-Y., PACK, S.-J., WOO, R.-S., BAIK, T.-K. und SONG, D.-Y. (2015). Changes of Gene Expression of Gal3, Hsp27, Lcn2, and Timp1 in Rat Substantia Nigra Following Medial Forebrain Bundle Transection Using a Candidate Gene Microarray. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 66–67, 10-18.
- CHRISTOPHERSON, K. S., ULLIAN, E. M., STOKES, C. C. A., MULLOWNEY, C. E., HELL, J. W., AGAH, A., LAWLER, J., MOSHER, D. F., BORNSTEIN, P. und BARRES, B. A. (2005). Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell*, 120, 421-433.
- CHU, F., SHI, M., ZHENG, C., SHEN, D., ZHU, J., ZHENG, X. und CUI, L. (2018). The Roles of Macrophages and Microglia in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 318, 1-7.
- CHUN, B. Y., KIM, J. H., NAM, Y., HUH, M. I., HAN, S. und SUK, K. (2015). Pathological Involvement of Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in the Demyelinating Optic Neuritis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**, 3691-3698.
- CHUN, J. T., WANG, L., PASINETTI, G. M., FINCH, C. E. und ZLOKOVIC, B. V. (1999). Glycoprotein 330/Megalin (LRP-2) has Low Prevalence as mRNA and Protein in Brain Microvessels and Choroid Plexus. *Experimental Neurology*, **157**, 194-201.
- CHUNG, I. Y. und BENVENISTE, E. N. (1990). Tumor Necrosis Factor-a Production by Astrocytes. Induction by Lipopolysaccharide, IFN-g, and IL-1b. *The Journal of Immunology*, **144**, 2999-3007.

- CLARK, I. A. und VISSEL, B. (2016). Excess Cerebral TNF Causing Glutamate Excitotoxicity Rationalizes Treatment of Neurodegenerative Diseases and Neurogenic Pain by Anti-TNF Agents. *Journal of Neuroinflammation*, **13**, 236-251.
- CLASADONTE, J. und HAYDON, P. G. (2012). Astrocytes and Epilepsy. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, TH, NOEBELS, J. L., AVOLI, M., ROGAWSKI, M. A., OLSEN, R. W. and DELGADO-ESCUETA, A. V., Eds, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), pp. 1-25.
- CLEMENTE, R. und DE LA TORRE, J. C. (2007). Cell-to-Cell Spread of Borna Disease Virus Proceeds in the Absence of the Virus Primary Receptor and Furin-Mediated Processing of the Virus Surface Glycoprotein. *Journal of Virology*, **81**, 5968-5977.
- CLEMENTE, R. und DE LA TORRE, J. C. (2009). Cell Entry of Borna Disease Virus Follows a Clathrin-Mediated Endocytosis Pathway that Requires Rab5 and Microtubules. *Journal of Virology*, 83, 10406-10416.
- CLEMENTE, R., DE PARSEVAL, A., PEREZ, M. und DE LA TORRE, J. C. (2009). Borna Disease Virus Requires Cholesterol in Both Cellular Membrane and Viral Envelope for Efficient Cell Entry. *Journal of Virology*, 83, 2655-2662.
- COLES, M., DIERCKS, T., MUEHLENWEG, B., BARTSCH, S., ZOLZER, V., TSCHESCHE, H. und KESSLER, H. (1999). The Solution Structure and Dynamics of Human Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *Journal of Molecular Biology*, 289, 139-157.
- COLOMBO, E. und FARINA, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*, **37**, 608-620.
- CONSTANTINESCU, C. S., TANI, M., RANSOHOFF, R. M., WYSOCKA, M., HILLIARD, B., FUJIOKA, T., MURPHY, S., TIGHE, P. J., SARMA, J. D., TRINCHIERI, G. und ROSTAMI, A. (2005). Astrocytes as Antigen-Presenting Cells: Expression of IL-12/IL-23. *Journal of Neurochemistry*, 95, 331-340.
- CORAS, R., KORN, K., KUERTEN, S., HUTTNER, H. B. und ENSSER, A. (2019). Severe Bornavirus-Encephalitis Presenting as Guillain–Barré-Syndrome. Acta Neuropathologica, **137**, 1017-1019.
- COWAN, S. W., NEWCOMER, M. E. und JONES, T. A. (1990). Crystallographic Refinement of Human Serum Retinol Binding Protein at 2A Resolution. *Proteins*, 8, 44-61.

- COWLAND, J. B. und BORREGAARD, N. (1997). Molecular Characterization and Pattern of Tissue Expression of the Gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from Humans. *Genomics*, **45**, 17-23.
- CROSS, A. H. und KU, G. (2000). Astrocytes and Central Nervous System Endothelial Cells do not Express B7-1 (CD80) or B7-2 (CD86) Immunoreactivity during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, **110**, 76-82.
- CUBITT, B. und DE LA TORRE, J. C. (1994). Borna Disease Virus (BDV), a Nonsegmented RNA Virus, Replicates in the Nuclei of Infected Cells where Infectious BDV Ribonucleoproteins are Present. *Journal of Virology*, 68, 1371-1381.
- CUBITT, B., LY, C. und DE LA TORRE, J. C. (2001). Identification and Characterization of a New Intron in Borna Disease Virus. *Journal of General Virology*, 82, 641-646.
- CUBITT, B., OLDSTONE, C. und DE LA TORRE, J. C. (1994a). Sequence and Genome Organization of Borna Disease Virus. *Journal of Virology*, 68, 1382-1396.
- CUBITT, B., OLDSTONE, C., VALCARCEL, J. und DE LA TORRE, J. C. (1994b). RNA Splicing Contributes to the Generation of Mature mRNAs of Borna Disease Virus, a Non-Segmented Negative Strand RNA Virus. *Virus Research*, **34**, 69-79.
- DAITO, T., FUJINO, K., HONDA, T., MATSUMOTO, Y., WATANABE, Y. und TOMONAGA, K. (2011). A Novel Borna Disease Virus Vector System That Stably Expresses Foreign Proteins from an Intercistronic Noncoding Region. *Journal of Virology*, 85, 12170-12178.
- DAVID, Y., CACHEAUX, L. P., IVENS, S., LAPILOVER, E., HEINEMANN, U., KAUFER, D. und FRIEDMAN, A. (2009). Astrocytic Dysfunction in Epileptogenesis: Consequence of Altered Potassium and Glutamate Homeostasis? *The Journal of Neuroscience*, 29, 10588-10599.
- DE LA TORRE, J. C. (1994). Molecular Biology of Borna Disease Virus: Prototype of a New Group of Animal Viruses. *Journal of Virology*, 68, 7669-7675.
- DE LA TORRE, J. C. (2002). Bornavirus and the Brain. Journal of Infectious Diseases, 186, S241-S247.
- DE LA TORRE, J. C., CARBONE, K. M. und LIPKINV, W. I. (1990). Molecular Characterization of the Borna Disease Agent. *Virology*, **179**, 853-856.
- DE LANEROLLE, N. C., LEE, T.-S. und SPENCER, D. D. (2010). Astrocytes and Epilepsy. Neurotherapeutics, 7, 424-438.

- DE SIMONI, M. G., PEREGO, C., RAVIZZA, T., MONETA, D., CONTI, M., MARCHESI, F., DE LUIGI, A., GARATTINI, S. und VEZZANI, A. (2000). Inflammatory Cytokines and Related Genes are Induced in the Rat Hippocampus by Limbic Status Epilepticus. *European Journal of Neuroscience*, 12, 2623-2633.
- DEGIORGIS, M.-P., BERG, A.-L., HÅRD AF SEGERSTAD, C., MÖRNER, T., JOHANSSON, M. und BERG, M. (2000). Borna Disease in a Free-Ranging Lynx (Lynx lynx). Journal of Clinical Microbiology, 38, 3087-3091.
- DENG, Z., WANG, Y., ZHOU, L., SHAN, Y., TAN, S., CAI, W., LIAO, S., PENG, L. und LU, Z. (2017). High Salt-Induced Activation and Expression of Inflammatory Cytokines in Cultured Astrocytes. *Cell Cycle*, **16**, 785-794.
- DEPUYDT, B., VAN LOO, G., VANDENABEELE, P. und DECLERCQ, W. (2005). Induction of Apoptosis by TNF Receptor 2 in a T-Cell Hybridoma is FADD Dependent and Blocked by Caspase-8 Inhibitors. *Journal of Cell Science*, **118**, 497-504.
- DEVIREDDY, L. R., GAZIN, C., ZHU, X. und GREEN, M. R. (2005). A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake. *Cell*, **123**, 1293-1305.
- DEVIREDDY, L. R., HART, D. O., GOETZ, D. H. und GREEN, M. R. (2010). A Mammalian Siderophore Synthesized by an Enzyme with a Bacterial Homolog Involved in Enterobactin Production. *Cell*, 141, 1006-1017.
- DEVIREDDY, L. R., TEODORO, J. G., RICHARD, F. A. und GREEN, M. R. (2001). Induction of Apoptosis by a Secreted Lipocalin That is Transcriptionally Regulated by IL-3 Deprivation. *Science*, **293**, 829-834.
- DHOTE, F., PEINNEQUIN, A., CARPENTIER, P., BAILLE, V., DELACOUR, C., FOQUIN, A., LALLEMENT, G. und DORANDEU, F. (2007). Prolonged Inflammatory Gene Response following Soman-Induced Seizures in Mice. *Toxicology*, 238, 166-176.
- DITTRICH, W., BODE, L., LUDWIG, H., KAO, M. und SCHNEIDER, K. (1989). Learning Deficiencies in Borna Disease Virus-Infected but Clinically Healthy Rats. *Biological Psychiatry*, 26, 818-828.
- DOLGA, A. M., GRANIC, I., BLANK, T., KNAUS, H.-G., SPIESS, J., LUITEN, P. G. M., EISEL, U. L. M. und NIJHOLT, I. M. (2008). TNF-α Mediates Neuroprotection against Glutamate-Induced Excitotoxicity via NF-κB-Dependent Up-Regulation of KCa2.2 Channels. *Journal of Neurochemistry*, 107, 1158-1167.
- DONATI, D., MARTINELLI, E., CASSIANI-INGONI, R., AHLQVIST, J., HOU, J., MAJOR, E. O. und JACOBSON, S. (2005). Variant-Specific Tropism of Human Herpesvirus 6 in Human Astrocytes. *Journal of Virology*, **79**, 9439-9448.
- DONG, M., XI, G., KEEP, R. F. und HUA, Y. (2013). Role of Iron in Brain Lipocalin 2 Upregulation after Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Brain Research*, **1505**, 86-92.
- DONG, Y. und BENVENISTE, E. N. (2001). Immune Function of Astrocytes. Glia, 36, 180-190.
- DONG, Y., DEKENS, D. W., DE DEYN, P. P., NAUDÉ, P. J. und EISEL, U. L. (2015). Targeting of Tumor Necrosis Factor-α Receptors as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Disorders. *Antibodies*, **4**, 369-408.
- DONG, Y., FISCHER, R., NAUDÉ, P. J. W., MAIER, O., NYAKAS, C., DUFFEY, M., VAN DER ZEE,
 E. A., DEKENS, D., DOUWENGA, W., HERRMANN, A., GUENZI, E., KONTERMANN, R. E.,
 PFIZENMAIER, K. und EISEL, U. L. M. (2016). Essential Protective Role of Tumor Necrosis
 Factor Receptor 2 in Neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
 113, 12304-12309.
- DOYLE, J. P., DOUGHERTY, J. D., HEIMAN, M., SCHMIDT, E. F., STEVENS, T. R., MA, G., BUPP, S., SHRESTHA, P., SHAH, R. D., DOUGHTY, M. L., GONG, S., GREENGARD, P. und HEINTZ, N. (2008). Application of a Translational Profiling Approach for the Comparative Analysis of CNS Cell Types. *Cell*, 135, 749-762.
- DREJER, J., LARSSON, O. M. und SCHOUSBOE, A. (1982). Characterization of L-Glutamate Uptake into and Release from Astrocytes and Neurons Cultured from Different Brain Regions. *Experimental Brain Research*, 47, 259-269.
- DU, F., QIAN, Z. M., ZHU, L., WU, X. M., QIAN, C., CHAN, R. und KE, Y. (2010). Purity, Cell Viability, Expression of GFAP and Bystin in Astrocytes Cultured by Different Procedures. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109, 30-37.
- DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., MULUNEH, A., HERZOG, S. und NOWOTNY, N. (2006). Epidemiological Pattern of Classical Borna Disease and Regional Genetic Clustering of Borna Disease Viruses Point towards the Existence of to-date Unknown Endemic Reservoir Host Populations. *Microbes and Infection*, **8**, 917-929.
- DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., WEISSENBÖCK, H. und NOWOTNY, N. (2014). The Bicolored White-Toothed Shrew Crocidura leucodon (HERMANN 1780) Is an Indigenous Host of Mammalian Borna Disease Virus. PLOS ONE [Electronic Resource], 9, e93659.

- DÜRRWALD, R. und LUDWIG, H. (1997). Borna Disease Virus (BDV), a (Zoonotic?) Worldwide Pathogen. A Review of the History of the Disease and the Virus Infection with Comprehensive Bibliography. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B, 44, 147-184.
- EDDLESTON, M. und MUCKE, L. (1993). Molecular Profile of Reactive Astrocytes–Implications for their Role in Neurologic Disease. *Neuroscience*, 54.
- EFSA AHAW PANEL (EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE), MORE S, BØTNER A, BUTTERWORTH A, CALISTRI P, DEPNER K, EDWARDS S, GARIN-BASTUJI B, GOOD M, GORTAZAR SCHMIDT C, MICHEL V, MIRANDA MA, NIELSEN SS, RAJ M, SIHVONEN L, SPOOLDER H, STEGEMAN JA, THULKE HH, VELARDE A, WILLEBERG P, WINCKLER C, BALDINELLI F, BROGLIA A, DHOLLANDER S, BELTRAN-BECK B, L, K. und D, B. (2017). Scientific Opinion on the Assessment of Listing and Categorisation of Animal Diseases within the Framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): Borna Disease *European Food Safety Authority Journal*, **15**, 4951.
- EGASHIRA, Y., HUA, Y., KEEP, R. F., IWAMA, T. und XI, G. (2016). Lipocalin 2 and Blood-Brain Barrier Disruption in White Matter after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Acta Neurochirurgica - Supplement*, **121**, 131-134.
- EGASHIRA, Y., HUA, Y., KEEP, R. F. und XI, G. (2014). Acute White Matter Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Potential Role of Lipocalin 2. *Stroke*, **45**, 2141-2143.
- EICKMANN, M., KIERMAYER, S., KRAUS, I., GÖSSL, M., RICHT, J. A. und GARTEN, W. (2005). Maturation of Borna Disease Virus Glycoprotein. *FEBS Letters*, **579**, 4751-4756.
- ENCARNAÇÃO, J. A., HERZOG, S., EICKMANN, M., BECKER, N. I., HERMES, N. und HERDEN, C. (2013). Landscape Features and Reservoir Occurrence Affecting the Risk for Equine Infection with Borna Disease Virus. *Journal of Wildlife Diseases*, **49**, 860-868.
- ENG, L. F. und GHIRNIKAR, R. S. (1994). GFAP and Astrogliosis. Brain Pathology, 4, 229-237.
- ENGELMANN, H., ADERKA, D., RUBINSTEIN, M., ROTMAN, D. und WALLACH, D. (1989). A Tumor Necrosis Factor-Binding Protein Purified to Homogeneity from Human Urine Protects Cells from Tumor Necrosis Factor Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 11974-11980.

- ERICKSON, S. L., DE SAUVAGE, F. J., KIKLY, K., CARVER-MOORE, K., PITTS-MEEK, S., GILLETT, N., SHEEHAN, K. C., SCHREIBER, R. D., GOEDDEL, D. V. und MOORE, M. W. (1994). Decreased Sensitivity to Tumour-Necrosis Factor but Normal T-Cell Development in TNF Receptor-2-Deficient Mice. *Nature*, 372, 560-563.
- EUGSTER, H.-P., FREI, K., BACHMANN, R., BLUETHMANN, H., LASSMANN, H. und FONTANA,
 A. (1999). Severity of Symptoms and Demyelination in MOG-Induced EAE Depends on TNFR1.
 European Journal of Immunology, 29, 626-632.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2018). Acute Encephalitis Associated with Infection with Borna Disease Virus 1 – Germany 2018. 26 March 2018. Stockholm: ECDC.
- FABER, M., BETTE, M., PREUSS, M. A., PULMANAUSAHAKUL, R., REHNELT, J., SCHNELL, M. J., DIETZSCHOLD, B. und WEIHE, E. (2005). Overexpression of Tumor Necrosis Factor-a by a Recombinant Rabies Virus Attenuates Replication in Neurons and Prevents Lethal Infection in Mice. *Journal of Virology*, **79**, 15405-15416.
- FALSIG, J., LATTA, M. und LEIST, M. (2004). Defined Inflammatory States in Astrocyte Cultures: Correlation with Susceptibility towards CD95-Driven Apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 88, 181-193.
- FARINA, C., ALOISI, F. und MEINL, E. (2007). Astrocytes are Active Players in Cerebral Innate Immunity. *Trends in Immunology*, 28, 138-145.
- FARINA, C., KRUMBHOLZ, M., GIESE, T., HARTMANN, G., ALOISI, F. und MEINL, E. (2005). Preferential Expression and Function of Toll-like Receptor 3 in Human Astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, **159**, 12-19.
- FAULKNER, J. R., HERRMANN, J. E., WOO, M. J., TANSEY, K. E., DOAN, N. B. und SOFRONIEW,
 M. V. (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, 24, 2143-2155.
- FERREIRA, A. C., DA MESQUITA, S., SOUSA, J. C., CORREIA-NEVES, M., SOUSA, N., PALHA, J.
 A. und MARQUES, F. (2015). From the Periphery to the Brain: Lipocalin-2, a Friend or Foe? Progress in Neurobiology, 131, 120-136.
- FERREIRA, A. C., PINTO, V., DÁ MESQUITA, S., NOVAIS, A., SOUSA, J. C., CORREIA-NEVES, M., SOUSA, N., PALHA, J. A. und MARQUES, F. (2013). Lipocalin-2 is Involved in Emotional Behaviors and Cognitive Function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 122.

- FIGIEL, I. (2008). Pro-Inflammatory Cytokine TNF-a as a Neuroprotective Agent in the Brain. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 68, 526-534.
- FINE, S. M., ANGEL, R. A., PERRY, S. W., EPSTEIN, L. G., ROTHSTEIN, J. D., DEWHURST, S. und GELBARD, H. A. (1996). Tumor Necrosis Factor α Inhibits Glutamate Uptake by Primary Human Astrocytes: Implications for Pathogenesis of HIV-1 Dementia. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15303-15306.
- FISCHER, R. und MAIER, O. (2015). Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 610813.
- FITZGERALD, M., NAIRN, P., BARTLETT, C. A., CHUNG, R. S., WEST, A. K. und BEAZLEY, L. D. (2007). Metallothionein-IIA Promotes Neurite Growth via the Megalin Receptor. *Experimental Brain Research*, 183, 171-180.
- FLO, T. H., SMITH, K. D., SATO, S., RODRIGUEZ, D. J., HOLMES, M. A., STRONG, R. K., AKIRA, S. und ADEREM, A. (2004). Lipocalin 2 Mediates an Innate Immune Response to Bacterial Infection by Sequestrating Iron. *Nature*, 432, 917-921.
- FLOWER, D. R., NORTH, A. C. und ATTWOOD, T. K. (1993). Structure and Sequence Relationships in the Lipocalins and Related Proteins. *Protein Science*, 2, 753-761.
- FLOWER, D. R., NORTH, A. C. T. und ATTWOOD, T. K. (1991). Mouse Oncogene Protein 24p3 is a Member of the Lipocalin Protein Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180, 69-74.
- FONTAINE, V., MOHAND-SAID, S., HANOTEAU, N., FUCHS, C., PFIZENMAIER, K. und EISEL, U. (2002). Neurodegenerative and Neuroprotective Effects of Tumor Necrosis Factor (TNF) in Retinal Ischemia: Opposite Roles of TNF Receptor 1 and TNF Receptor 2. *Journal of Neuroscience*, 22.
- FOO, L. C., ALLEN, N. J., BUSHONG, E. A., VENTURA, P. B., CHUNG, W. S., ZHOU, L., CAHOY, J.
 D., DANEMAN, R., ZONG, H., ELLISMAN, M. H. und BARRES, B. A. (2011). Development of a Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron*, **71**, 799-811.
- FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT. (2018). Humane Infektionen mit dem Borna Disease Virus (BoDV-1). Epidemiologisches Bulletin, 10, 105.

- FROMONT, A., DE SEZE, J., FLEURY, M. C., MAILLEFERT, J. F. und MOREAU, T. (2009). Inflammatory Demyelinating Events Following Treatment with Anti-Tumor Necrosis Factor. *Cytokine*, 45, 55-57.
- FUJINO, K., HORIE, M., HONDA, T., MERRIMAN, D. K. und TOMONAGA, K. (2014). Inhibition of Borna Disease Virus Replication by an Endogenous Bornavirus-like Element in the Ground Squirrel Genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 13175-13180.
- GAHRING, L. C., CARLSON, N. G., KULMAR, R. A. und ROGERS, S. W. (1996). Neuronal Expression of Tumor Necrosis Factor-a in the Murine Brain. *Neuroimmunomodulation*, 3, 289-303.
- GAJERA, C. R., EMICH, H., LIOUBINSKI, O., CHRIST, A., BECKERVORDERSANDFORTH-BONK,
 R., YOSHIKAWA, K., BACHMANN, S., CHRISTENSEN, E. I., GOTZ, M., KEMPERMANN, G.,
 PETERSON, A. S., WILLNOW, T. E. und HAMMES, A. (2010). LRP2 in Ependymal Cells
 Regulates BMP Signaling in the Adult Neurogenic Niche. *Journal of Cell Science*, 123, 1922-1930.
- GANFORNINA, M. D., GUTIERREZ, G., BASTIANI, M. und SANCHEZ, D. (2000). A Phylogenetic Analysis of the Lipocalin Protein Family. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 114-126.
- GARAY-ROJAS, E., HARPER, M., HRABA-RENEVEY, S. und KRESS, M. (1996). An Apparent Autocrine Mechanism Amplifies the Dexamethasone- and Retinoic Acid-Induced Expression of Mouse Lipocalin-Encoding Gene 24p3. *Gene*, **170**, 173-180.
- GERHAUSER, I., HANSMANN, F., PUFF, C., KUMNOK, J., SCHAUDIEN, D., WEWETZER, K. und BAUMGÄRTNER, W. (2012). Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Induced Phenotype Switch of Microglia *in vitro*. *Journal of Neuroimmunology*, 252, 49-55.
- GHOSH, N., MITRA, S., SINHA, P., CHAKRABARTI, N. und BHATTACHARYYA, A. (2018). TNFR2 Mediated TNF-α Signaling and NF-κB Activation in Hippocampus of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Mice. *Neuroscience Research*, **137**, 36-42.
- GIMSA, U., ØREN, A., PANDIYAN, P., TEICHMANN, D., BECHMANN, I., NITSCH, R. und BRUNNER-WEINZIERL, M. C. (2004). Astrocytes Protect the CNS: Antigen-Specific T Helper Cell Responses are Inhibited by Astrocyte-Induced Upregulation of CTLA-4 (CD152). Journal of Molecular Medicine, 82, 364-372.
- GIRVIN, A. M., GORDON, K. B., WELSH, C. J., CLIPSTONE, N. A. und MILLER, S. D. (2002). Differential Abilities of Central Nervous System Resident Endothelial Cells and Astrocytes to Serve as Inducible Antigen-Presenting Cells. *Blood*, **99**, 3692-3701.

- GLATIGNY, S. und BETTELLI, E. (2018). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 8, a028977.
- GOETZ, D. H., HOLMES, M. A., BORREGAARD, N., BLUHM, M. E., RAYMOND, K. N. und STRONG,
 R. K. (2002). The Neutrophil Lipocalin NGAL is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell*, **10**; 1033-1043.
- GOETZ, D. H., WILLIE, S. T., ARMEN, R. S., BRATT, T., BORREGAARD, N. und STRONG, R. K. (2000). Ligand Preference Inferred from the Structure of Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin. *Biochemistry*, **39**, 1935-1941.
- GONZALEZ-DUNIA, D., CUBITT, B. und DE LA TORRE, J. C. (1998). Mechanism of Borna Disease Virus Entry into Cells. *Journal of Virology*, **72**, 783-788.
- GONZALEZ-DUNIA, D., CUBITT, B., GRASSER, F. A. und DE LA TORRE, J. C. (1997). Characterization of Borna Disease Virus p56 Protein, a Surface Glycoprotein Involved in Virus Entry. *Journal of Virology*, **71**, 3208-3218.
- GOSZTONYI, G., DIETZSCHOLD, B., KAO, M., RUPPRECHT, C. E., LUDWIG, H. und KOPROWSKI,
 H. (1993). Rabies and Borna Disease. A Comparative Pathogenetic Study of Two Neurovirulent
 Agents. Laboratory Investigation, 68, 285-295.
- GOSZTONYI, G. und LUDWIG, H. (1984). Borna Disease of Horses. Acta Neuropathologica, 64, 213-221.
- GOUWELEEUW, L., NAUDÉ, P. J. W., ROTS, M., DEJONGSTE, M. J. L., EISEL, U. L. M. und SCHOEMAKER, R. G. (2015). The Role of Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) as Biological Constituent Linking Depression and Cardiovascular Disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 46, 23-32.
- GRABNER, A. und FISCHER, A. (1991). Symptomatology and Diagnosis of Borna Encephalitis of Horses. A Case Analysis of the Last 13 Years. *Tierärztliche Praxis*, **19**, 68-73.
- GRABNER, A., HERZOG, S., LANGE-HERBST, H. und FRESE, K. (2002). Die intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden. Pferdeheilkunde 18 (6), 579, 786.

- GRELL, M., DOUNI, E., WAJANT, H., LÖHDEN, M., CLAUSS, M., MAXEINER, B., GEORGOPOULOS, S., LESSLAUER, W., KOLLIAS, G., PFIZENMAIER, K. und SCHEURICH, P. (1995). The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor is the Prime Activating Ligand of the 80 kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *Cell*, 83, 793-802.
- GRELL, M., WAJANT, H., ZIMMERMANN, G. und SCHEURICH, P. (1998). The type 1 Receptor (CD120a) is the High-Affinity Receptor for Soluble Tumor Necrosis Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 570-575.
- GUIDOTTI, L. G. und CHISARI, F. V. (2000). Cytokine-Mediated Control of Viral Infections. Virology, 273, 221-227.
- GUTIERREZ, E. G., BANKS, W. A. und KASTIN, A. J. (1993). Murine Tumor Necrosis Factor-α is Transported from Blood to Brain in the Mouse. *Journal of Neuroimmunology*, **47**, 169-176.
- HABJAN, M., ANDERSSON, I., KLINGSTRÖM, J., SCHÜMANN, M., MARTIN, A., ZIMMERMANN,
 P., WAGNER, V., PICHLMAIR, A., SCHNEIDER, U., MÜHLBERGER, E., MIRAZIMI, A. und
 WEBER, F. (2008). Processing of Genome 5' Termini as a Strategy of Negative-Strand RNA
 Viruses to Avoid RIG-I-Dependent Interferon Induction. *PLOS ONE*, 3.
- HAILER, N. P., HEPPNER, F. L., HAAS, D. und NITSCH, R. (1998). Astrocytic Factors Deactivate Antigen Presenting Cells that Invade the Central Nervous System. *Brain Pathology*, 8, 459-474.
- HALLENSLEBEN, W., SCHWEMMLE, M., HAUSMANN, J., STITZ, L., VOLK, B., PAGENSTECHER,
 A. und STAEHELI, P. (1998). Borna Disease Virus-Induced Neurological Disorder in Mice: Infection of Neonates Results in Immunopathology. *Journal of Virology*, 72, 4379-4386.
- HAMZIC, N., BLOMQVIST, A. und NILSBERTH, C. (2013). Immune-Induced Expression of Lipocalin-2 in Brain Endothelial Cells: Relationship with Interleukin-6, Cyclooxygenase-2 and the Febrile Response. *Journal of Neuroendocrinology*, 25, 271-280.
- HAN, Y., HE, T., HUANG, D. R., PARDO, C. A. und RANSOHOFF, R. M. (2001). TNF-α mediates SDF-1a-induced NF-kB Activation and Cytotoxic Effects in Primary Astrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, **108**, 425-435.
- HANS, A., BAJRAMOVIC, J. J., SYAN, S., PERRET, E., DUNIA, I., BRAHIC, M. und GONZALEZ-DUNIA, D. (2004). Persistent, Noncytolytic Infection of Neurons by Borna Disease Virus Interferes with ERK 1/2 Signaling and Abrogates BDNF-Induced Synaptogenesis. *FASEB Journal*, 18, 863-865.

- HATALSKI, C. G., HICKEY, W. F. und LIPKIN, W. I. (1998). Evolution of the Immune Response in the Central Nervous System Following Infection with Borna Disease Virus. *Journal of Neuroimmunology*, 90, 137-142.
- HAUSMANN, J., HALLENSLEBEN, W., DE LA TORRE, J. C., PAGENSTECHER, A., ZIMMERMANN,
 C., PIRCHER, H. und STAEHELI, P. (1999). T Cell Ignorance in Mice to Borna Disease Virus can be Overcome by Peripheral Expression of the Viral Nucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 9769-9774.
- HELDMANN, U., THORED, P., CLAASEN, J.-H., ARVIDSSON, A., KOKAIA, Z. und LINDVALL, O. (2005). TNF-α Antibody Infusion Impairs Survival of Stroke-Generated Neuroblasts in Adult Rat Brain. *Experimental Neurology*, **196**, 204-208.
- HERDEN, C. (2009). Untersuchungen zu Pathogenese, Neurotropismus und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit. Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Habilitationsschrift.
- HERDEN, C., BRIESE, K., LIPKIN, W. und RICHT, J. (2013). Bornaviridae. In: *Fields Virology*, KNIPE,
 D. M. and HOWLEY, P. M., Eds, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins,
 Philadelphia, USA, pp. 1124 1150.
- HERDEN, C., SCHLUESENER, H. J. und RICHT, J. A. (2005). Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 and Haeme Oxygenase-1 in Brains of Rats Infected with the Neurotropic Borna Disease Virus. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **31**, 512-521.
- HERDER, V., ISKANDAR, C. D., KEGLER, K., HANSMANN, F., ELMARABET, S. A., KHAN, M. A., KALKUHL, A., DESCHL, U., BAUMGÄRTNER, W., ULRICH, R. und BEINEKE, A. (2015). Dynamic Changes of Microglia/Macrophage M1 and M2 Polarization in Theiler's Murine Encephalomyelitis. *Brain Pathology*, 25, 712-723.
- HERZOG, S., FRESE, K., RICHT, J. und ROTT, R. (1994). Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 81, 374-374.
- HERZOG, S., WONIGEIT, K., FRESE, K., HEDRICH, H. J. und ROTT, R. (1985). Effect of Borna Disease Virus Infection on Athymic Rats. *Journal of General Virology*, 66, 503-508.
- HILBE, M., HERRSCHE, R., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., ZLINSZKY, K. und EHRENSPERGER, F. (2006). Shrews as Reservoir Hosts of Borna Disease Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 675-677.

- HIRANO, N., KAO, M. und LUDWIG, H. (1983). Persistent, Tolerant or Subacute Infection in Borna Disease Virus-Infected Rats. *Journal of General Virology*, 64, 1521-1530.
- HIRZ, M. (2017). Pathogenese epileptiformer Krämpfe bei TNF-transgenen Mäusen nach Borna disease virus-Infektion: Rolle von astroglialen Dysfunktionen. Justus-Liebig Universität Gießen, Institut für Veterinär-Pathologie, Inaugural Dissertation.
- HOFER, M., HAUSMANN, J., STAEHELI, P. und PAGENSTECHER, A. (2004). Cerebral Expression of Interleukin-12 Induces Neurological Disease via Differential Pathways and Recruits Antigen-Specific T Cells in Virus-Infected Mice. *American Journal of Pathology*, **165**, 949-958.
- HOFFMANN, B., TAPPE, D., HÖPER, D., HERDEN, C., BOLDT, A., MAWRIN, C., NIEDERSTRAßER,
 O., MÜLLER, T., JENCKEL, M., VAN DER GRINTEN, E., LUTTER, C., ABENDROTH, B.,
 TEIFKE, J. P., CADAR, D., SCHMIDT-CHANASIT, J., ULRICH, R. G. und BEER, M. (2015).
 A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. New England
 Journal of Medicine, 373, 154-162.
- HÖFT, S., GRIEMSMANN, S., SEIFERT, G. und STEINHÄUSER, C. (2014). Heterogeneity in Expression of Functional Ionotropic Glutamate and GABA Receptors in Astrocytes across Brain Regions: Insights from the Thalamus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369, 20130602.
- HOLMES, M. A., PAULSENE, W., JIDE, X., RATLEDGE, C. und STRONG, R. K. (2005). Siderocalin (Lcn 2) Also Binds Carboxymycobactins, Potentially Defending against Mycobacterial Infections through Iron Sequestration. *Structure*, **13**, 29-41.
- HONDA, T., HORIE, M., DAITO, T., IKUTA, K. und TOMONAGA, K. (2009). Molecular Chaperone BiP Interacts with Borna Disease Virus Glycoprotein at the Cell Surface. *Journal of Virology*, 83, 12622-12625.
- HONDA, T. und TOMONAGA, K. (2013). Nucleocytoplasmic Shuttling of Viral Proteins in Borna Disease Virus Infection. Viruses, 5, 1978-1990.
- HONDA, T. und TOMONAGA, K. (2016). Endogenous Non-Retroviral RNA Virus Elements Evidence a Novel Type of Antiviral Immunity. *Mobile Genetic Elements*, 6, e1165785.
- HONKAVUORI, K. S., SHIVAPRASAD, H. L., WILLIAMS, B. L., QUAN, P. L., HORNIG, M., STREET,
 C., PALACIOS, G., HUTCHISON, S. K., FRANCA, M., EGHOLM, M., BRIESE, T. und LIPKIN,
 W. I. (2008). Novel Borna Virus in Psittacine Birds with Proventricular Dilatation Disease.
 Emerging Infectious Diseases, 14, 1883-1886.

- HORIE, M. (2017). The Biological Significance of Bornavirus-derived Genes in Mammals. *Current* Opinion in Virology, 25, 1-6.
- HORIE, M., HONDA, T., SUZUKI, Y., KOBAYASHI, Y., DAITO, T., OSHIDA, T., IKUTA, K., JERN, P., GOJOBORI, T., COFFIN, J. M. und TOMONAGA, K. (2010). Endogenous Non-Retroviral RNA Virus Elements in Mammalian Genomes. *Nature*, 463, 84-87.
- HORIE, M., KOBAYASHI, Y., SUZUKI, Y. und TOMONAGA, K. (2013). Comprehensive Analysis of Endogenous Bornavirus-like Elements in Eukaryote Genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368, 20120499-20120499.
- HOWLAND, D. S., LIU, J., SHE, Y., GOAD, B., MARAGAKIS, N. J., KIM, B., ERICKSON, J., KULIK, J., DEVITO, L., PSALTIS, G., DEGENNARO, L. J., CLEVELAND, D. W. und ROTHSTEIN, J.
 D. (2002). Focal Loss of the Glutamate Transporter EAAT2 in a Transgenic Rat Model of SOD1 Mutant-Mediated Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy* of Sciences, 99, 1604-1609.
- HRABA-RENEVEY, S., TURLER, H., KRESS, M., SALOMON, C. und WEIL, R. (1989). SV40-Induced Expression of Mouse Gene 24p3 Involves a Post-Transcriptional Mechanism. Oncogene, 4, 601-608.
- HSIAO, H.-Y., CHIU, F.-L., CHEN, C.-M., WU, Y.-R., CHEN, H.-M., CHEN, Y.-C., KUO, H.-C. und CHERN, Y. (2014). Inhibition of Soluble Tumor Necrosis Factor is Therapeutic in Huntington's Disease. *Human Molecular Genetics*, 23, 4328-4344.
- HUBBARD, J. A., SZU, J. I., YONAN, J. M. und BINDER, D. K. (2016). Regulation of Astrocyte Glutamate Transporter-1 (GLT1) and Aquaporin-4 (AQP4) Expression in a Model of Epilepsy. *Experimental Neurology*, 283, 85-96.
- HVIDBERG, V., JACOBSEN, C., STRONG, R. K., COWLAND, J. B., MOESTRUP, S. K. und BORREGAARD, N. (2005). The Endocytic Receptor Megalin Binds the Iron Transporting Neutrophil-Gelatinase-Associated Lipocalin with High Affinity and Mediates its Cellular Uptake. *FEBS Letters*, **579**, 773-777.
- HYNDMAN, T. H., SHILTON, C. M., STENGLEIN, M. D. und WELLEHAN, J. F. X., JR. (2018). Divergent Bornaviruses from Australian Carpet Pythons with Neurological Disease Date the Origin of Extant Bornaviridae prior to the End-Cretaceous Extinction. *PLOS Pathogens*, 14, e1006881.

- IADECOLA, C. und NEDERGAARD, M. (2007). Glial Regulation of the Cerebral Microvasculature. Nature Neuroscience, 10, 1369-1376.
- IANNETTI, A., PACIFICO, F., ACQUAVIVA, R., LAVORGNA, A., CRESCENZI, E., VASCOTTO, C., TELL, G., SALZANO, A. M., SCALONI, A., VUTTARIELLO, E., CHIAPPETTA, G., FORMISANO, S. und LEONARDI, A. (2008). The Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), a NF-kB-Regulated Gene, is a Survival Factor for Thyroid Neoplastic Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 14058-14063.
- IBROM, S. (2019). Änderungen der Einstufung der ZKBS betreffen das Mammalian 1 orthobornavirus (BoDV), Pestiviren und gentechnische Arbeiten mit rekombinanten Influenza-A-Viren (FLUAV), www.zkbs-online.de, ZKBS.
- **IDRISS, H. T. und NAISMITH, J. H. (2000)**. TNFα and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, **50**, 184-195.
- IORI, V., FRIGERIO, F. und VEZZANI, A. (2016). Modulation of Neuronal Excitability by Immune Mediators in Epilepsy. Current Opinion in Pharmacology, 26, 118-123.
- IP, J. P., NOCON, A. L., HOFER, M. J., LIM, S. L., MULLER, M. und CAMPBELL, I. L. (2011). Lipocalin 2 in the Central Nervous System Host Response to Systemic Lipopolysaccharide Administration. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 124.
- JACOBSEN, B., ALGERMISSEN, D., SCHAUDIEN, D., VENNER, M., HERZOG, S., WENTZ, E., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., BAUMGÄRTNER, W. und HERDEN, C. (2010). Borna Disease in an Adult Alpaca Stallion (Lama pacos). Journal of Comparative Pathology, 143, 203-208.
- JACOBSEN, F. W., ROTHE, M., RUSTEN, L., GOEDDEL, D. V., SMELAND, E. B., VEIBY, O. P., SLØRDAL, L. und JACOBSEN, S. E. (1994). Role of the 75-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor: Inhibition of Early Hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 10695-10699.
- JAIN, P., WADHWA, P. K. und JADHAV, H. R. (2015). Reactive Astrogliosis: Role in Alzheimer's Disease. CNS & Neurological Disorders Drug Targets, 14, 872-879.
- JANG, E., KIM, J. H., LEE, S., KIM, J. H., SEO, J. W., JIN, M., LEE, M. G., JANG, I. S., LEE, W. H. und SUK, K. (2013a). Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: The Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes. *Journal of Immunology*, 191, 5204-5219.

- JANG, E., LEE, S., KIM, J. H., KIM, J. H., SEO, J. W., LEE, W. H., MORI, K., NAKAO, K. und SUK,
 K. (2013b). Secreted Protein Lipocalin-2 Promotes Microglial M1 Polarization. *FASEB Journal*, 27, 1176-1190.
- JEON, S., JHA, M. K., OCK, J., SEO, J., JIN, M., CHO, H., LEE, W. H. und SUK, K. (2013). Role of Lipocalin-2-Chemokine Axis in the Development of Neuropathic Pain Following Peripheral Nerve Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 24116-24127.
- JHA, M. K., JEON, S., JIN, M., LEE, W.-H. und SUK, K. (2013). Acute Phase Protein Lipocalin-2 Is Associated with Formalin-induced Nociception and Pathological Pain. *Immune Network*, 13, 289-294.
- JHA, M. K., JEON, S., JIN, M., OCK, J., KIM, J. H., LEE, W. H. und SUK, K. (2014). The Pivotal Role Played by Lipocalin-2 in Chronic Inflammatory Pain. *Experimental Neurology*, 254, 41-53.
- JHA, M. K., LEE, S., PARK, D. H., KOOK, H., PARK, K. G., LEE, I. K. und SUK, K. (2015). Diverse Functional Roles of Lipocalin-2 in the Central Nervous System. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 49, 135-156.
- JHA, M. K., LEE, W.-H. und SUK, K. (2016). Functional Polarization of Neuroglia: Implications in Neuroinflammation and Neurological Disorders. *Biochemical Pharmacology*, 103, 1-16.
- JIN, M., JANG, E. und SUK, K. (2014a). Lipocalin-2 Acts as a Neuroinflammatogen in Lipopolysaccharide-Injected Mice. *Experimental Neurobiology*, 23, 155-162.
- JIN, M., KIM, J. H., JANG, E., LEE, Y. M., SOO HAN, H., WOO, D. K., PARK, D. H., KOOK, H. und SUK, K. (2014b). Lipocalin-2 Deficiency Attenuates Neuroinflammation and Brain Injury after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34, 1306-1314.
- JOEST, E. (1912). Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes, mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsweges und der Kerneinschlüsse. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, 44, 206-219.
- JOEST, E. K. und DEGEN, K. (1909). Über eigentümliche intranukleäre Einschlüsse bei der enzootischen Gehirn- und Rückenmarksentzündung. Zeitschrift für Infektiöse Krankheiten der Haustiere, 6, 348-356.
- JOHN, G. R., LEE, S. C. und BROSNAN, C. F. (2003). Cytokines: Powerful Regulators of Glial Cell Activation. *Neuroscientist*, 9, 10-22.

- KACEM, K., LACOMBE, P., SEYLAZ, J. und BONVENTO, G. (1998). Structural Organization of the Perivascular Astrocyte Endfeet and their Relationship with the Endothelial Glucose Transporter: A Confocal Microscopy Study. *Glia*, 23, 1-10.
- KALLFASS, C., ACKERMAN, A., LIENENKLAUS, S., WEISS, S., HEIMRICH, B. und STAEHELI, P. (2012). Visualizing Production of Beta Interferon by Astrocytes and Microglia in Brain of La Crosse Virus-Infected Mice. *Journal of Virology*, 86, 11223-11230.
- KANG, J., JIANG, L., GOLDMAN, S. A. und NEDERGAARD, M. (1998). Astrocyte-Mediated Potentiation of Inhibitory Synaptic Transmission. *Nature Neuroscience*, 1, 683-692.
- KANG, S. S., REN, Y., LIU, C. C., KURTI, A., BAKER, K. E., BU, G., ASMANN, Y. und FRYER, J. D. (2017). Lipocalin-2 Protects the Brain during Inflammatory Conditions. *Molecular Psychiatry*.
- KANG, Z., ALTUNTAS, C. Z., GULEN, M. F., LIU, C., GILTIAY, N., QIN, H., LIU, L., QIAN, W., RANSOHOFF, R. M., BERGMANN, C., STOHLMAN, S., TUOHY, V. K. und LI, X. (2010). Astrocyte-Restricted Ablation of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. *Immunity*, 32, 414-425.
- KARIMI-ABDOLREZAEE, S. und BILLAKANTI, R. (2012). Reactive Astrogliosis after Spinal Cord Injury-Beneficial and Detrimental Effects. *Molecular Neurobiology*, 46, 251-264.
- KASIK, J. W. und RICE, E. J. (1995). An Increase in Expression of the Lipocalin 24p3 is Found in Mouse Uterus Coincident with Birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **173**, 613-617.
- KASSIOTIS, G., BAUER, J., AKASSOGLOU, K., LASSMANN, H., KOLLIAS, G. und PROBERT, L. (1999). A Tumor Necrosis Factor-Induced Model of Human Primary Demyelinating Diseases Develops in Immunodeficient Mice. *European Journal of Immunology*, 29.
- KASSIOTIS, G. und KOLLIAS, G. (2001). Uncoupling the Proinflammatory from the Immunosuppressive Properties of Tumor Necrosis Factor (TNF) at the P55 TNF Receptor Level. Implications for Pathogenesis and Therapy of Autoimmune Demyelination, **193**, 427-434.
- KASTER, M. P., GADOTTI, V. M., CALIXTO, J. B., SANTOS, A. R. S. und RODRIGUES, A. L. S. (2012). Depressive-Like Behavior Induced by Tumor Necrosis Factor-α in Mice. *Neuropharmacology*, **62**, 419-426.

- KEHR, K. (2016). Ausbreitungs- und Persistenzstrategien des Virus der Bornaschen Krankheit in primären corticalen Astrozytenkulturen von Lewis-Ratten. Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Veterinär-Pathologie, Inaugural Dissertation.
- KEMPURAJ, D., THANGAVEL, R., NATTERU, P. A., SELVAKUMAR, G. P., SAEED, D., ZAHOOR,
 H., ZAHEER, S., IYER, S. S. und ZAHEER, A. (2016). Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine*, 1, 1003.
- KETTENMANN, H. und VERKHRATSKY, A. (2008). Neuroglia: The 150 years after. Trends in Neurosciences, 31, 653-659.
- KIERMAYER, S., KRAUS, I., RICHT, J. A., GARTEN, W. und EICKMANN, M. (2002). Identification of the Amino Terminal Subunit of the Glycoprotein of Borna Disease Virus. *FEBS Letters*, 531, 255-258.
- KIM, B.-W., JEONG, K. H., KIM, J.-H., JIN, M., KIM, J.-H., LEE, M.-G., CHOI, D.-K., WON, S.-Y., MCLEAN, C., JEON, M.-T., LEE, H.-W., KIM, S. R. und SUK, K. (2016). Pathogenic Upregulation of Glial Lipocalin-2 in the Parkinsonian Dopaminergic System. *The Journal of Neuroscience*, 36, 5608-5622.
- KIM, B. W., KOPPULA, S., HONG, S. S., JEON, S. B., KWON, J. H., HWANG, B. Y., PARK, E. J. und CHOI, D. K. (2013). Regulation of Microglia Activity by Glaucocalyxin-A: Attenuation of Lipopolysaccharide-Stimulated Neuroinflammation through NF-kB and p38 MAPK Signaling Pathways. *PLOS One*, 8, e55792.
- KIMELBERG, H. K. (1983). Primary Astrocyte Cultures a Key to Astrocyte Function. Cellular and Molecular Neurobiology, 3, 1-16.
- KIMELBERG, H. K. (2010). Functions of Mature Mammalian Astrocytes: a Current View. Neuroscientist, 16, 79-106.
- KINNUNEN, P. M., PALVA, A., VAHERI, A. und VAPALAHTI, O. (2013). Epidemiology and Host Spectrum of Borna Disease Virus Infections. *Journal of General Virology*, 94, 247-262.
- KISTLER, A. L., GANCZ, A., CLUBB, S., SKEWES-COX, P., FISCHER, K., SORBER, K., CHIU, C.
 Y., LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, Y., GRENINGER, A., WEN, C. C., KARLENE,
 S. B., GANEM, D. und DERISI, J. L. (2008). Recovery of Divergent Avian Bornaviruses from
 Cases of Proventricular Dilatation Disease: Identification of a Candidate Etiologic Agent.
 Virology Journal, 5, 88.

- KJELDSEN, L., BAINTON, D. F., SENGELOV, H. und BORREGAARD, N. (1993a). Structural and Functional Heterogeneity among Peroxidase-Negative Granules in Human Neutrophils: Identification of a Distinct Gelatinase-Containing Granule Subset by Combined Immunocytochemistry and Subcellular Fractionation. *Blood*, 82, 3183-3191.
- KJELDSEN, L., BAINTON, D. F., SENGELOV, H. und BORREGAARD, N. (1994). Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Matrix Protein of Specific Granules in Human Neutrophils. *Blood*, 83, 799-807.
- KJELDSEN, L., JOHNSEN, A. H., SENGELØV, H. und BORREGAARD, N. (1993b). Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 10425-10432.
- KOBAYASHI, T., KAMITANI, W., ZHANG, G., WATANABE, M., TOMONAGA, K. und IKUTA, K. (2001). Borna Disease Virus Nucleoprotein Requires both Nuclear Localization and Export Activities for Viral Nucleocytoplasmic Shuttling. *Journal of Virology*, **75**, 3404-3412.
- KOBAYASHI, T., SHOYA, Y., KODA, T., TAKASHIMA, I., LAI, P. K., IKUTA, K., KAKINUMA, M. und KISHI, M. (1998). Nuclear Targeting Activity Associated with the Amino Terminal Region of the Borna Disease Virus Nucleoprotein. *Virology*, 243, 188-197.
- KOBAYASHI, T., WATANABE, M., KAMITANI, W., TOMONAGA, K. und IKUTA, K. (2000). Translation Initiation of a Bicistronic mRNA of Borna Disease Virus: A 16-kDa Phosphoprotein Is Initiated at an Internal Start Codon. *Virology*, 277, 296-305.
- KOEHLER, R. C., ROMAN, R. J. und HARDER, D. R. (2009). Astrocytes and the Regulation of Cerebral Blood Flow. *Trends in Neurosciences*, 32, 160-169.
- KOHNO, T., GOTO, T., TAKASAKI, T., MORITA, C., NAKAYA, T., IKUTA, K., KURANE, I., SANO, K. und NAKAI, M. (1999). Fine structure and Morphogenesis of Borna Disease Virus. *Journal of Virology*, 73, 760-766.
- KOJIMA, S., SATO, R., YANAI, M., KOMATSU, Y., HORIE, M., IGARASHI, M. und TOMONAGA, K.
 (2019). Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms. *Journal of Virology*, 93, e01621-01618.
- KOLOKOLTSOVA, O. A., YUN, N. E. und PAESSLER, S. (2014). Reactive Astrogliosis in Response to Hemorrhagic Fever Virus: Microarray Profile of Junin Virus-Infected Human Astrocytes. *Virology Journal*, 11, 126.

- KONDYLIS, V., KUMARI, S., VLANTIS, K. und PASPARAKIS, M. (2017). The Interplay of IKK, NF-κB and RIPK1 Signaling in the Regulation of Cell Death, Tissue Homeostasis and Inflammation. *Immunological Reviews*, 277, 113-127.
- KORN, K., CORAS, R., BOBINGER, T., HERZOG, S. M., LÜCKING, H., STÖHR, R., HUTTNER, H.
 B., HARTMANN, A. und ENSSER, A. (2018). Fatal Encephalitis Associated with Borna Disease Virus 1. New England Journal of Medicine, 379, 1375-1377.
- KOU, W., BANERJEE, S., EUDY, J., SMITH, L. M., PERSIDSKY, R., BORGMANN, K., WU, L., SAKHUJA, N., DESHPANDE, M. S., WALSETH, T. F. und GHORPADE, A. (2009). CD38 Regulation in Activated Astrocytes: Implications for Neuroinflammation and HIV-1 Brain nfection. Journal of Neuroscience Research, 87, 2326-2339.
- KRAMER, K. (2006). Experimentelle Infektion von TNFα-transgenen [TNF-alpha-transgenen] Mäusen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit: Charakterisierung der Entzündungsreaktion und der Virusreplikation. Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Inaugural Dissertation.
- KRAMER, K., SCHAUDIEN, D., EISEL, U. L., HERZOG, S., RICHT, J. A., BAUMGARTNER, W. und HERDEN, C. (2012). TNF-Overexpression in Borna Disease Virus-Infected Mouse Brains Triggers Inflammatory Reaction and Epileptic Seizures. *PLOS One*, 7, e41476.
- KRAUS, I., BOGNER, E., LILIE, H., EICKMANN, M. und GARTEN, W. (2005). Oligomerization and Assembly of the Matrix Protein of Borna Disease Virus. FEBS *Letters*, 579, 2686-2692.
- KRAUS, I., EICKMANN, M., KIERMAYER, S., SCHEFFCZIK, H., FLUESS, M., RICHT, J. A. und GARTEN, W. (2001). Open Reading Frame III of Borna Disease Virus Encodes a Nonglycosylated Matrix Protein. *Journal of Virology*, **75**, 12098-12104.
- KRIEGLER, M., PEREZ, C., DEFAY, K., ALBERT, I. und LU, S. D. (1988). A Novel Form of TNF/Cachectin is a Cell Surface Cytotoxic Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of TNF. Cell, 53, 45-53.
- KUHN, J. H., DÜRRWALD, R., BÀO, Y., BRIESE, T., CARBONE, K., CLAWSON, A. N., DERISI, J.
 L., GARTEN, W., JAHRLING, P. B., KOLODZIEJEK, J., RUBBENSTROTH, D.,
 SCHWEMMLE, M., STENGLEIN, M., TOMONAGA, K., WEISSENBÖCK, H. und NOWOTNY,
 N. (2015). Taxonomic Reorganization of the Family Bornaviridae. Archives of Virology, 160, 621-632.

- KUPKE, A. (2016). Die Rolle des olfaktorischen Epithels in der initialen Phase der Infektion mit dem neurotropen Borna disease virus. Institut f
 ür Veterin
 är-Pathologie, Justus-Liebig-Universit
 ät Gießen, Inaugural Dissertation.
- KUPKE, A., BECKER, S., WEWETZER, K., AHLEMEYER, B., EICKMANN, M. und HERDEN, C.
 (2019). Intranasal Borna Disease Virus (BoDV-1) Infection: Insights into Initial Steps and Potential Contagiosity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1318.
- KUTEYKIN-TEPLYAKOV, K., BRANDT, C., HOFFMANN, K. und LÖSCHER, W. (2009). Complex Time-Dependent Alterations in the Brain Expression of Different Drug Efflux Transporter Genes after Status Epilepticus. *Epilepsia*, **50**, 887-897.
- LAEGREID, A., MEDVEDEV, A., NONSTAD, U., BOMBARA, M. P., RANGES, G., SUNDAN, A. und ESPEVIK, T. (1994). Tumor Necrosis Factor Receptor p75 Mediates Cell-Specific Activation of Nuclear Factor-kB and Induction of Human Cytomegalovirus Enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 7785-7791.
- LAMBERTSEN, K. L., CLAUSEN, B. H., BABCOCK, A. A., GREGERSEN, R., FENGER, C., NIELSEN, H. H., HAUGAARD, L. S., WIRENFELDT, M., NIELSEN, M., DAGNAES-HANSEN, F., BLUETHMANN, H., FÆRGEMAN, N. J., MELDGAARD, M., DEIERBORG, T. und FINSEN, B. (2009). Microglia Protect Neurons against Ischemia by Synthesis of Tumor Necrosis Factor. *The Journal of Neuroscience*, 29, 1319-1330.
- LANGE, S. C., BAK, L. K., WAAGEPETERSEN, H. S., SCHOUSBOE, A. und NORENBERG, M. D. (2012). Primary Cultures of Astrocytes: Their Value in Understanding Astrocytes in Health and Disease. *Neurochemical Research*, 37, 2569-2588.
- LANGELUEDDECKE, C., ROUSSA, E., FENTON, R. A., WOLFF, N. A., LEE, W. K. und THEVENOD, F. (2012). Lipocalin-2 (24p3/Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)) Receptor is Expressed in Distal Nephron and Mediates Protein Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 159-169.
- LÉCUYER, M.-A., KEBIR, H. und PRAT, A. (2016). Glial Influences on BBB Functions and Molecular Players in Immune Cell Trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862, 472-482.
- LEE, S., KIM, J.-H., KIM, J.-H., SEO, J.-W., HAN, H.-S., LEE, W.-H., MORI, K., NAKAO, K., BARASCH, J. und SUK, K. (2011). Lipocalin-2 Is a Chemokine Inducer in the Central Nervous System: Role of Chemokine Ligand 10 (CXCL10) in Lipocalin-2-linduced Cell Migration. *Journal* of Biological Chemistry, 286, 43855-43870.

- LEE, S., LEE, W.-H., LEE, M.-S., MORI, K. und SUK, K. (2012). Regulation by Lipocalin-2 of Neuronal Cell Death, Migration, and Morphology. *Journal of Neuroscience Research*, 90, 540-550.
- LEE, S., PARK, J. Y., LEE, W. H., KIM, H., PARK, H. C., MORI, K. und SUK, K. (2009). Lipocalin-2 is an Autocrine Mediator of Reactive Astrocytosis. *Journal of Neuroscience*, **29**, 234-249.
- LEE, S. J., DRABIK, K., VAN WAGONER, N. J., LEE, S., CHOI, C., DONG, Y. und BENVENISTE, E. N. (2000). ICAM-1-Induced Expression of Proinflammatory Cytokines in Astrocytes: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *The Journal of Immunology*, **165**, 4658-4666.
- LENNARTZ, F., BAYER, K., CZERWONKA, N., LU, Y., KEHR, K., HIRZ, M., STEINMETZER, T., GARTEN, W. und HERDEN, C. (2016). Surface Glycoprotein of Borna Disease Virus Mediates Virus Spread from Cell to Cell. Cellular Microbiology, 18, 340-354.
- LI, C. und CHAN, Y. R. (2011). Lipocalin 2 Regulation and its Complex Role in Inflammation and Cancer. Cytokine, 56, 435-441.
- LI, N., ZHANG, X., DONG, H., ZHANG, S., SUN, J. und QIAN, Y. (2016). Lithium Ameliorates LPS-Induced Astrocytes Activation Partly via Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38, 714-725.
- LIDDELOW, S. A. und BARRES, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, **46**, 957-967.
- LIDDELOW, S. A., GUTTENPLAN, K. A., CLARKE, L. E., BENNETT, F. C., BOHLEN, C. J., SCHIRMER, L., BENNETT, M. L., MÜNCH, A. E., CHUNG, W.-S., PETERSON, T. C., WILTON, D. K., FROUIN, A., NAPIER, B. A., PANICKER, N., KUMAR, M., BUCKWALTER, M. S., ROWITCH, D. H., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., STEVENS, B. und BARRES, B. A. (2017). Neurotoxic Reactive Astrocytes are Induced by Activated Microglia. *Nature*, 541, 481.
- LIEBERMAN, A. P., PITHA, P. M., SHIN, H. S. und SHIN, M. L. (1989). Production of Tumor Necrosis Factor and Other Cytokines by Astrocytes Stimulated with Lipopolysaccharide or a Neurotropic Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6348-6352.
- LIPKIN, W. I., TRAVIS, G. H., CARBONE, K. M. und WILSON, M. C. (1990). Isolation and Characterization of Borna Disease Agent cDNA Clones. *Proceedings of the National Academy* of Sciences, 87, 4184-4188.

- LISTWAK, S. J., RATHORE, P. und HERKENHAM, M. (2013). Minimal NF-KB Activity in Neurons. *Neuroscience*, 250, 282-299.
- LIU, Q. und NILSEN-HAMILTON, M. (1995). Identification of a New Acute Phase Protein. Journal of Biological Chemistry, 270, 22565-22570.
- LIU, T., CLARK, R. K., MCDONNELL, P. C., YOUNG, P. R., WHITE, R. F., BARONE, F. C. und FEUERSTEIN, G. Z. (1994). Tumor Necrosis Factor-α Expression in Ischemic Neurons. *Stroke*, 25, 1481-1488.
- LIU, Z., PETERSEN, R. und DEVIREDDY, L. (2013). Impaired Neutrophil Function in 24p3 Null Mice Contributes to Enhanced Susceptibility to Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*, **190**, 4692-4706.
- LOETSCHER, H., PAN, Y.-C. E., LAHM, H.-W., GENTZ, R., BROCKHAUS, M., TABUCHI, H. und LESSLAUER, W. (1990). Molecular Cloning and Expression of the Human 55 kd Tumor Necrosis Factor Receptor. Cell, 61, 351-359.
- LOTZ, M., SETAREH, M., VON KEMPIS, J. und SCHWARZ, H. (1996). The Nerve Growth Factor/Tumor Necrosis Factor Receptor Family. *Journal of Leukocyte Biology*, **60**, 1-7.
- LUCAS, R., JUILLARD, P., DECOSTER, E., REDARD, M., BURGER, D., DONATI, Y., GIROUD, C., MONSO-HINARD, C., DE KESEL, T., BUURMAN, W. A., MOORE, M. W., DAYER, J.-M., FIERS, W., BLUETHMANN, H. und GRAU, G. E. (1997). Crucial Role of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 2 and Membrane-Bound TNF in Experimental Cerebral Malaria. *European Journal of Immunology*, 27, 1719-1725.
- LUETTIG, B., DECKER, T. und LOHMANN-MATTHES, M. L. (1989). Evidence for the Existence of two Forms of Membrane Tumor Necrosis Factor: an Integral Protein and a Molecule Attached to its Receptor. *The Journal of Immunology*, **143**, 4034-4038.
- LUKASIUK, K. und PITKÄNEN, A. (2004). Large-Scale Analysis of Gene Expression in Epilepsy Research: Is Synthesis Already Possible? *Neurochemical Research*, 29, 1169-1178.
- LUNDGREN, A.-L., LINDBERG, R., LUDWIG, H. und GOSZTONYI, G. Immunoreactivity of the Central Nervous System in Cats with a Borna Disease-Like Meningoencephalomyelitis (Staggering Disease). Acta Neuropathologica, **90**, 184-193.
- LUNDGREN, A.-L., ZIMMERMANN, W., BODE, L., CZECH, G., GOSZTONYI, G., LINDBERG, R. und LUDWIG, H. (1995). Staggering Disease in Cats: Isolation and Characterization of the Feline Borna Disease Virus. *Journal of General Virology*, **76**, 2215-2222.

- LUNDGREN, S., CARLING, T., HJÄLM, G., JUHLIN, C., RASTAD, J., PIHLGREN, U., RASK, L., ÅKERSTRÖM, G. und HELLMAN, P. (1997). Tissue Distribution of Human gp330/Megalin, a Putative Ca²⁺-sensing Protein. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **45**, 383-392.
- LUNG, H. L., LEUNG, K. N., STADLIN, A., MA, C. M. und TSANG, D. (2001). Induction of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 2 Gene Expression by Tumor Necrosis Factor-α in Rat Primary Astrocytes. *Life Sciences*, **68**, 2081-2091.
- MAIER, O., FISCHER, R., AGRESTI, C. und PFIZENMAIER, K. (2013). TNF Receptor 2 Protects Oligodendrocyte Progenitor Cells against Oxidative Stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440, 336-341.
- MAKINO, A., FUJINO, K., PARRISH, N. F., HONDA, T. und TOMONAGA, K. (2015). Borna Disease Virus Possesses an NF-kB Inhibitory Sequence in the Nucleoprotein Gene. *Scientific Reports*, 5, 8696.
- MALKINSON, M., WEISMAN, Y., PERL, S. und ASHASH, E. (1995). A Borna-Like Disease of Ostriches in Israel. In: *Borna Disease*, KOPROWSKI, H. and LIPKIN, W. I., Eds, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 31-38.
- MANZANO, J., BERNAL, J. und MORTE, B. (2007). Influence of Thyroid Hormones on Maturation of Rat Cerebellar Astrocytes. International Journal of Developmental Neuroscience, 25, 171-179.
- MARCHETTI, L., KLEIN, M., SCHLETT, K., PFIZENMAIER, K. und EISEL, U. L. (2004). Tumor Necrosis Factor (TNF)-Mediated Neuroprotection Against Glutamate-Induced Excitotoxicity is Enhanced by N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activation. Essential Role of a TNF Receptor 2-Mediated Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent NF-kB Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32869-32881.
- MARQUES, F., MESQUITA, S. D., SOUSA, J. C., COPPOLA, G., GAO, F., GESCHWIND, D. H., COLUMBA-CABEZAS, S., ALOISI, F., DEGNA, M., CERQUEIRA, J. J., SOUSA, N., CORREIA-NEVES, M. und PALHA, J. A. (2012). Lipocalin 2 is Present in the EAE Brain and is Modulated by Natalizumab. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6.
- MARQUES, F., RODRIGUES, A.-J., SOUSA, J. C., COPPOLA, G., GESCHWIND, D. H., SOUSA, N., CORREIA-NEVES, M. und PALHA, J. A. (2008). Lipocalin 2 is a Choroid Plexus Acute-Phase Protein. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 28, 450-455.

- MARQUES, F. Z., PRESTES, P. R., BYARS, S. G., RITCHIE, S. C., WÜRTZ, P., PATEL, S. K., BOOTH, S. A., RANA, I., MINODA, Y., BERZINS, S. P., CURL, C. L., BELL, J. R., WAI, B., SRIVASTAVA, P. M., KANGAS, A. J., SOININEN, P., RUOHONEN, S., KÄHÖNEN, M., LEHTIMÄKI, T., RAITOHARJU, E., HAVULINNA, A., PEROLA, M., RAITAKARI, O., SALOMAA, V., ALA-KORPELA, M., KETTUNEN, J., MCGLYNN, M., KELLY, J., WLODEK, M. E., LEWANDOWSKI, P. A., DELBRIDGE, L. M., BURRELL, L. M., INOUYE, M., HARRAP, S. B. und CHARCHAR, F. J. (2017). Experimental and Human Evidence for Lipocalin-2 (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin [NGAL]) in the Development of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Journal of the American Heart Association*, 6, e005971.
- MARTORANA, F., GUIDOTTI, G., BRAMBILLA, L. und ROSSI, D. (2015). Withaferin A Inhibits Nuclear Factor-kB-Dependent Pro-Inflammatory and Stress Response Pathways in the Astrocytes. *Neural Plasticity*, 2015, 381964.
- MATSUMOTO, Y., HAYASHI, Y., OMORI, H., HONDA, T., DAITO, T., HORIE, M., IKUTA, K., FUJINO,
 K., NAKAMURA, S., SCHNEIDER, U., CHASE, G., YOSHIMORI, T., SCHWEMMLE, M. und
 TOMONAGA, K. (2012). Bornavirus Closely Associates and Segregates with Host
 Chromosomes to Ensure Persistent Intranuclear Infection. *Cell Host & Microbe*, **11**, 492-503.
- MBANWI, A. N. und WATTS, T. H. (2014). Costimulatory TNFR Family Members in Control of Viral Infection: Outstanding Questions. *Seminars in Immunology*, 26, 210-219.
- MCALPINE, F. E., LEE, J.-K., HARMS, A. S., RUHN, K. A., BLURTON-JONES, M., HONG, J., DAS,
 P., GOLDE, T. E., LAFERLA, F. M., ODDO, S., BLESCH, A. und TANSEY, M. G. (2009).
 Inhibition of Soluble TNF Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease Prevents Pre-Plaque Amyloid-Associated Neuropathology. *Neurobiology of Disease*, 34, 163-177.
- MCCARTHY, K. D. und DE VELLIS, J. (1980). Preparation of Separate Astroglial and Oligodendroglial Cell Cultures from Rat Cerebral Tissue. *The Journal of Cell Biology*, 85, 890-902.
- MCKIMMIE, C. S., JOHNSON, N., FOOKS, A. R. und FAZAKERLEY, J. K. (2005). Viruses Selectively Upregulate Toll-Like Receptors in the Central Nervous System. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**, 925-933.
- MEISTRELL, M. E., 3RD, BOTCHKINA, G. I., WANG, H., DI SANTO, E., COCKROFT, K. M., BLOOM,
 O., VISHNUBHAKAT, J. M., GHEZZI, P. und TRACEY, K. J. (1997). Tumor Necrosis Factor is a Brain Damaging Cytokine in Cerebral Ischemia. *Shock*, 8, 341-348.
- METZLER, A., EHRENSPERGER, F. und WYLER, R. (1978). Natürliche Bornavirus-Infektion bei Kaninchen. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B, 25, 161-164.

- METZLER, A., MINDER, H., WEGMANN, C. und ZINDEL, W. (1979). Bornasche Krankheit, ein veterinärmedizinisches Problem von regionaler Bedeutung. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde, 121, 207-213.
- MICHEAU, O. und TSCHOPP, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. Cell, 114, 181-190.
- MILLER, R. H. und RAFF, M. C. (1984). Fibrous and Protoplasmic Astrocytes are Biochemically and Developmentally Distinct. *Journal of Neuroscience*, 4, 585-592.
- MIN, R. und NEVIAN, T. (2012). Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nature Neuroscience*, 15, 746-753.
- MIR, M., ASENSIO, V. J., TOLOSA, L., GOU-FABREGAS, M., SOLER, R. M., LLADÓ, J. und OLMOS, G. (2009). Tumor Necrosis Factor-α and Interferon-γ Cooperatively Induce Oxidative Stress and Motoneuron Death in Rat Spinal Cord Embryonic Explants. *Neuroscience*, **162**, 959-971.
- MIR, M., TOLOSA, L., ASENSIO, V. J., LLADÓ, J. und OLMOS, G. (2008). Complementary Roles of Tumor Necrosis Factor-α and Interferon-γ Inducible Microglial Nitric Oxide Generation. *Journal* of Neuroimmunology, 204, 101-109.
- MONYER, H., BURNASHEV, N., LAURIE, D. J., SAKMANN, B. und SEEBURG, P. H. (1994). Developmental and Regional Expression in the Rat Brain and Functional Properties of four NMDA Receptors. *Neuron*, **12**, 529-540.
- MORALES, J. A., HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K. und ROTT, R. (1988). Axonal Transport of Borna Disease Virus along Olfactory Pathways in Spontaneously and Experimentally Infected Rats. *Medical Microbiology and Immunology*, **177**, 51-68.
- MORIMOTO, K., HOOPER, D. C., BORNHORST, A., CORISDEO, S., BETTE, M., FU, Z. F., SCHÄFER, M. K.-H., KOPROWSKI, H., WEIHE, E. und DIETZSCHOLD, B. (1996). Intrinsic Responses to Borna Disease Virus Infection of the Central Nervous System. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 13345-13350.
- MORIZAWA, Y. M., HIRAYAMA, Y., OHNO, N., SHIBATA, S., SHIGETOMI, E., SUI, Y., NABEKURA, J., SATO, K., OKAJIMA, F., TAKEBAYASHI, H., OKANO, H. und KOIZUMI, S. (2017). Reactive Astrocytes Function as Phagocytes after Brain Ischemia via ABCA1-Mediated Pathway. *Nature Communications*, 8, 28.

- MUCHA, M., SKRZYPIEC, A. E., SCHIAVON, E., ATTWOOD, B. K., KUCEROVA, E. und PAWLAK,
 R. (2011). Lipocalin-2 Controls Neuronal Excitability and Anxiety by Regulating Dendritic Spine Formation and Maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 18436-18441.
- MURDACA, G., SPANO, F., CONTATORE, M., GUASTALLA, A., PENZA, E., MAGNANI, O. und PUPPO, F. (2015). Infection Risk Associated with Anti-TNF-α Agents: A Review. *Expert Opinion* on Drug Safety, 14, 571-582.
- NAIR, A., FREDERICK, T. J. und MILLER, S. D. (2008). Astrocytes in Multiple Sclerosis: A Product of their Environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 2702.
- NAM, Y., KIM, J.-H., SEO, M., KIM, J.-H., JIN, M., JEON, S., SEO, J.-W., LEE, W.-H., BING, S. J., JEE, Y., LEE, W. K., PARK, D. H., KOOK, H. und SUK, K. (2014). Lipocalin-2 Protein Deficiency Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: The Pathogenic Role Of Lipocalin-2 In The Central Nervous System And Peripheral Lymphoid Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 16773-16789.
- NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H. und ROTT, R. (1983). Behavioral Disease in Rats Caused by Immunopathological Responses to Persistent Borna Virus in the Brain. *Science*, 220, 1401-1403.
- NATHAN, D. M., ANGUS, P. W. und GIBSON, P. R. (2006). Hepatitis B and C Virus Infections and Anti-Tumor Necrosis Factor-α Therapy: Guidelines for Clinical Approach. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21, 1366-1371.
- NAUDE, P. J., NYAKAS, C., EIDEN, L. E., AIT-ALI, D., VAN DER HEIDE, R., ENGELBORGHS, S., LUITEN, P. G., DE DEYN, P. P., DEN BOER, J. A. und EISEL, U. L. (2012). Lipocalin 2: Novel Component of Proinflammatory Signaling in Alzheimer's Disease. *FASEB Journal*, 26, 2811-2823.
- NAUDÉ, P. J. W., DEN BOER, J. A., LUITEN, P. G. M. und EISEL, U. L. M. (2011). Tumor Necrosis Factor Receptor Cross-Talk. *FEBS Letters*, **278**, 888-898.
- NAUDE, P. J. W., DOBOS, N., VAN DER MEER, D., MULDER, C., PAWIRONADI, K. G. D., DEN BOER, J. A., VAN DER ZEE, E. A., LUITEN, P. G. M. und EISEL, U. L. M. (2014). Analysis of Cognition, Motor Performance and Anxiety in Young and Aged Tumor Necrosis Factor-α Receptor 1 and 2 Deficient Mice. *Behavioural Brain Research*, 258, 43-51.

- NAWASHIRO, H., MARTIN, D. und HALLENBECK, J. M. (1997). Neuroprotective Effects of TNF Binding Protein in Focal Cerebral Ischemia. Brain Research, 778, 265-271.
- NEDERGAARD, M., RANSOM, B. und GOLDMAN, S. A. (2003). New roles for Astrocytes: Redefining the Functional Architecture of the Brain. *Trends in Neurosciences*, 26, 523-530.
- NEUMANN, P., LIEBER, D., MEYER, S., DAUTEL, P., KERTH, A., KRAUS, I., GARTEN, W. und STUBBS, M. T. (2009). Crystal Structure of the Borna Disease Virus Matrix Protein (BDV-M) Reveals ssRNA Binding Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 3710-3715.
- NI, W., ZHENG, M., XI, G., KEEP, R. F. und HUA, Y. (2015). Role of Lipocalin-2 in Brain Injury after Intracerebral Hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35, 1454-1461.
- NIKCEVICH, K. M., GORDON, K. B., TAN, L., HURST, S. D., KROEPFL, J. F., GARDINIER, M., BARRETT, T. A. und MILLER, S. D. (1997). IFN-g-Activated Primary Murine Astrocytes Express B7 Costimulatory Molecules and Prime Naive Antigen-Specific T Cells. *The Journal of Immunology*, 158, 614-621.
- NILSEN-HAMILTON, M., HAMILTON, R. T. und ADAMS, G. A. (1982). Rapid Selective Stimulation by Growth Factors of the Incorporation by Balbc-3T3 Cells of [35S]Methionine into a Glycoprotein and five Superinducible Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108, 158-166.
- NILSEN-HAMILTON, M., LIU, Q., RYON, J., BENDICKSON, L. E. E., LEPONT, P. und CHANG, Q. (2003). Tissue Involution and the Acute Phase Response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 995, 94-108.
- NISHINO, Y., MURAKAMI, M. und FUNABA, M. (2016). Expression and Role of the TGF-β Family in Glial Cells Infected with Borna Disease Virus. *Microbes and Infection*, **18**, 128-136.
- NOBACH, D., BOURG, M., HERZOG, S., LANGE-HERBST, H., ENCARNAÇÃO, J. A., EICKMANN,
 M. und HERDEN, C. (2015). Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews. *PLOS One*, **10**, e0137018.
- NOCON, A. L., IP, J. P., TERRY, R., LIM, S. L., GETTS, D. R., MULLER, M., HOFER, M. J., KING, N. J. und CAMPBELL, I. L. (2014). The Bacteriostatic Protein Lipocalin 2 is Induced in the Central Nervous System of Mice with West Nile Virus Encephalitis. *Journal of Virology*, 88, 679-689.

- NOPHAR, Y., KEMPER, O., BRAKEBUSCH, C., ENGLEMANN, H., ZWANG, R., ADERKA, D., HOLTMANN, H. und WALLACH, D. (1990). Soluble Forms of Tumor Necrosis Factor Receptors (TNF-Rs). The cDNA for the Type I TNF-R, Cloned Using Amino Acid Sequence Data of its Soluble Form, Encodes Both the Cell Surface and a Soluble Form of the Receptor. *EMBO Journal*, 9, 3269-3278.
- NORDEN, D. M., TROJANOWSKI, P. J., VILLANUEVA, E., NAVARRO, E. und GODBOUT, J. P. (2016). Sequential Activation of Microglia and Astrocyte Cytokine Expression Precedes Increased Iba-1 or GFAP Immunoreactivity following Systemic Immune Challenge. *Glia*, 64, 300-316.
- NORTON, W. T. und FAROOQ, M. (1989). Astrocytes Cultured from Mature Brain Derive from Glial Precursor Cells. *Journal of Neuroscience*, 9, 769-775.
- NOSKE, K., BILZER, T., PLANZ, O. und STITZ, L. (1998). Virus-Specific CD4⁺ T Cells Eliminate Borna Disease Virus from the Brain via Induction of Cytotoxic CD8⁺ T Cells. *Journal of Virology*, 72, 4387-4395.
- OGATA, K. und KOSAKA, T. (2002). Structural and Quantitative Analysis of Astrocytes in the Mouse Hippocampus. *Neuroscience*, **113**, 221-233.
- OLIET, S. H. R., PIET, R. und POULAIN, D. A. (2001). Control of Glutamate Clearance and Synaptic Efficacy by Glial Coverage of Neurons. *Science*, **292**, 923-926.
- OLIVER, J. C., BLAND, L. A., OETTINGER, C. W., ARDUINO, M. J., MCALLISTER, S. K., AGUERO,
 S. M. und FAVERO, M. S. (1993). Cytokine Kinetics in an *In Vitro* Whole Blood Model Following an Endotoxin Challenge. *Lymphokine Cytokine Research*, **12**, 115-120.
- ORTINSKI, P. I., DONG, J., MUNGENAST, A., YUE, C., TAKANO, H., WATSON, D. J., HAYDON, P.
 G. und COULTER, D. A. (2010). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nature Neuroscience*, 13, 584.
- OUCHI, N., PARKER, J. L., LUGUS, J. J. und WALSH, K. (2011). Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nature Reviews Immunology*, 11, 85-97.
- OVANESOV, M. V., AYHAN, Y., WOLBERT, C., MOLDOVAN, K., SAUDER, C. und PLETNIKOV, M.
 V. (2008a). Astrocytes Play a Key Role in Activation of Microglia by Persistent Borna Disease Virus Infection. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 50.

- OVANESOV, M. V., MOLDOVAN, K., SMITH, K., VOGEL, M. W. und PLETNIKOV, M. V. (2008b). Persistent Borna Disease Virus (BDV) Infection Activates Microglia Prior to a Detectable Loss of Granule Cells in the Hippocampus. *Journal of Neuroinflammation*, 5.
- OVANESOV, M. V., SAUDER, C., RUBIN, S. A., RICHT, J., NATH, A., CARBONE, K. M. und PLETNIKOV, M. V. (2006). Activation of Microglia by Borna Disease Virus Infection: *In Vitro* Study. *Journal of Virology*, **80**, 12141-12148.
- OVANESOV, M. V., VOGEL, M. W., MORAN, T. H. und PLETNIKOV, M. V. (2007). Neonatal Borna Disease Virus Infection in Rats is Associated with Increased Extracellular Levels of Glutamate and Neurodegeneration in the Striatum. *Journal of Neurovirology*, **13**, 185-194.
- PAN, W., KASTIN, A. J., ZANKEL, T. C., VAN KERKHOF, P., TERASAKI, T. und BU, G. (2004). Efficient Transfer of Receptor-Associated Protein (RAP) Across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Cell Science*, **117**, 5071-5078.
- PANEK, R. B., LEE, Y. J., ITOH-LINDSTROM, Y., TING, J. P. und BENVENISTE, E. N. (1994). Characterization of Astrocyte Nuclear Proteins Involved in IFN-γ- and TNF-α-Mediated Class II MHC Gene Expression. *The Journal of Immunology*, **153**, 4555-4564.
- PARK, C., LEE, S., CHO, I. H., LEE, H. K., KIM, D., CHOI, S. Y., OH, S. B., PARK, K., KIM, J. S. und LEE, S. J. (2006). TLR3-Mediated Signal Induces Proinflammatory Cytokine and Chemokine Gene Expression in Astrocytes: Differential Signaling Mechanisms of TLR3-Induced IP-10 and IL-8 Gene Expression. *Glia*, 53, 248-256.
- PARPURA, V. und VERKHRATSKY, A. (2014). Pathological Potential of Neuroglia : Possible New Targets for Medical Intervention, Imprint: Springer, New York, NY.
- PAXINOS, G. und WATSON, C. (1986). The Rat Brain Atlas. San Diego, CA: Academic Press.
- PAYNE, S. L., DELNATTE, P., GUO, J., HEATLEY, J. J., TIZARD, I. und SMITH, D. A. (2012). Birds and Bornaviruses. Animal Health Research Reviews, 13, 145-156.
- PEKNY, M. und PEKNA, M. (2014). Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits. *Physiological Reviews*, 94, 1077-1098.
- PEKNY, M., PEKNA, M., MESSING, A., STEINHÄUSER, C., LEE, J.-M., PARPURA, V., HOL, E. M., SOFRONIEW, M. V. und VERKHRATSKY, A. (2016). Astrocytes: A Central Element in Neurological Diseases. Acta Neuropathologica, 131, 323-345.

- PENG, G., ZHANG, F., ZHANG, Q., WU, K., ZHU, F. und WU, J. (2007). Borna Disease Virus P Protein Inhibits Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Astrocytes. *Virology*, **366**, 446-452.
- PEREZ, C., ALBERT, I., DEFAY, K., ZACHARIADES, N., GOODING, L. und KRIEGLER, M. (1990). A Nonsecretable Cell Surface Mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) Kills by Cell-to-Cell Contact. Cell, 63, 251-258.
- PEREZ, M., SANCHEZ, A., CUBITT, B., ROSARIO, D. und DE LA TORRE, J. C. (2003). A Reverse Genetics System for Borna Disease Virus. *Journal of General Virology*, **84**, 3099-3104.
- PERRAUD, F., LABOURDETTE, G., ECLANCHER, F. und SENSENBRENNER, M. (1990). Primary Cultures of Astrocytes from Different Brain Areas of Newborn Rats and Effects of Basic Fibroblast Growth Factor. *Developmental Neuroscience*, **12**, 11-21.
- PESCHON, J. J., TORRANCE, D. S., STOCKING, K. L., GLACCUM, M. B., OTTEN, C., WILLIS, C. R., CHARRIER, K., MORRISSEY, P. J., WARE, C. B. und MOHLER, K. M. (1998). TNF Receptor-Deficient Mice Reveal Divergent Roles for p55 and p75 in Several Models of Inflammation. *The Journal of Immunology*, **160**, 943-952.
- PETR, G. T., SUN, Y., FREDERICK, N. M., ZHOU, Y., DHAMNE, S. C., HAMEED, M. Q., MIRANDA, C., BEDOYA, E. A., FISCHER, K. D., ARMSEN, W., WANG, J., DANBOLT, N. C., ROTENBERG, A., AOKI, C. J. und ROSENBERG, P. A. (2015). Conditional Deletion of the Glutamate Transporter GLT-1 Reveals That Astrocytic GLT-1 Protects against Fatal Epilepsy While Neuronal GLT-1 Contributes Significantly to Glutamate Uptake into Synaptosomes. *The Journal of Neuroscience*, 35, 5187-5201.
- PFEFFER, K., MATSUYAMA, T., KÜNDIG, T. M., WAKEHAM, A., KISHIHARA, K., SHAHINIAN, A., WIEGMANN, K., OHASHI, P. S., KRÖNKE, M. und MAK, T. W. (1993). Mice Deficient for the 55 kd Tumor Necrosis Factor Receptor are Resistant to Endotoxic Shock, yet Succumb to L. Monocytogenes Infection. *Cell*, **73**, 457-467.
- PFEFFERKORN, C., KALLFASS, C., LIENENKLAUS, S., SPANIER, J., KALINKE, U., RIEDER, M., CONZELMANN, K.-K., MICHIELS, T. und STAEHELI, P. (2016). Abortively Infected Astrocytes Appear To Represent the Main Source of Interferon-ß in the Virus-Infected Brain. *Journal of Virology*, 90, 2031-2038.
- PFRIEGER, F. W. und BARRES, B. A. (1997). Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. Science, 277, 1684-1687.

- PLANZ, O., BILZER, T., SOBBE, M. und STITZ, L. (1993). Lysis of Major Histocompatibility Complex Class I-Bearing Cells in Borna Disease Virus-Induced Degenerative Encephalopathy. *The Journal of Experimental Medicine*, **178**, 163-174.
- PLANZ, O., BILZER, T. und STITZ, L. (1995). Immunopathogenic Role of T-Cell Subsets in Borna Disease Virus-Induced Progressive Encephalitis. *Journal of Virology*, **69**, 896-903.
- PLANZ, O., PLESCHKA, S. und WOLFF, T. (2009). Borna Disease Virus: a Unique Pathogen and its Interaction with Intracellular Signalling Pathways. *Cellular Microbiology*, **11**, 872-879.
- PLESCHKA, S. (2008). RNA Viruses and the Mitogenic Raf/MEK/ERK Signal Transduction Cascade. Biological Chemistry, 389, 1273-1282.
- PLESCHKA, S., STAEHELI, P., KOLODZIEJEK, J., RICHT, J. A., NOWOTNY, N. und SCHWEMMLE,
 M. (2001). Conservation of Coding Potential and Terminal Sequences in four Different Isolates of Borna Disease Virus. *Journal of General Virology*, 82, 2681-2690.
- POENISCH, M., BURGER, N., STAEHELI, P., BAUER, G. und SCHNEIDER, U. (2009). Protein X of Borna Disease Virus Inhibits Apoptosis and Promotes Viral Persistence in the Central Nervous Systems of Newborn-Infected Rats. *Journal of Virology*, 83, 4297-4307.
- POENISCH, M., STAEHELI, P. und SCHNEIDER, U. (2008a). Viral Accessory Protein X Stimulates the Assembly of Functional Borna Disease Virus Polymerase Complexes. *Journal of General Virology*, **89**, 1442-1445.
- POENISCH, M., UNTERSTAB, G., WOLFF, T., STAEHELI, P. und SCHNEIDER, U. (2004). The X Protein of Borna Disease Virus Regulates Viral Polymerase Activity through Interaction with the P Protein. *Journal of General Virology*, **85**, 1895-1898.
- POENISCH, M., WILLE, S., ACKERMANN, A., STAEHELI, P. und SCHNEIDER, U. (2007). The X Protein of Borna Disease Virus Serves Essential Functions in the Viral Multiplication Cycle. *Journal of Virology*, 81, 7297-7299.
- POENISCH, M., WILLE, S., STAEHELI, P. und SCHNEIDER, U. (2008b). Polymerase Read-Through at the First Transcription Termination Site Contributes to Regulation of Borna Disease Virus Gene Expression. *Journal of Virology*, 82, 9537-9545.

- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. und BEUTLER, B. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in TLR4 Gene. *Science*, 282, 2085-2088.
- POROMBKA, D. (2006). Untersuchungen zur Transkription, Replikation und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit in Gehirnen von experimentell infizierten Lewis-Ratten mittels real-time RT-PCR. Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover, Inaugural Dissertation.
- POROMBKA, D., BAUMGÄRTNER, W., EICKMANN, M. und HERDEN, C. (2008). Implications for a Regulated Replication of Borna Disease Virus in Brains of Experimentally Infected Lewis Rats. *Virus Genes*, **36**, 415-420.
- POZNER, R. G., BERRÍA, M. I., NEGROTTO, S., SCHATTNER, M. und GÓMEZ, R. M. (2005). Differential Astrocyte Response to Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection. *Intervirology*, 48, 279-284.
- PRINGLE, C. R. (1996). Virus Taxonomy 1996 A Bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. Archives of Virology, 141, 2251-2256.
- PROBERT, L. (2015). TNF and its Receptors in the CNS: The Essential, the Desirable and the Deleterious Effects. *Neuroscience*, 302, 2-22.
- PROBERT, L., AKASSOGLOU, K., PASPARAKIS, M., KONTOGEORGOS, G. und KOLLIAS, G. (1995). Spontaneous Inflammatory Demyelinating Disease in Transgenic Mice Showing Central Nervous System-Specific Expression of Tumor Necrosis Factor-α. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 11294–11298.
- PUSCHMANN, T. B., DIXON, K. J. und TURNLEY, A. M. (2010). Species Differences in Reactivity of Mouse and Rat Astrocytes In Vitro. *Neurosignals*, 18, 152-163.
- PYPER, J. M. und CLEMENTS, J. E. (1994). Partial Purification and Characterization of Borna Disease Virions Released from Infected Neuroblastoma Cells. *Virology*, 201, 380-382.
- PYPER, J. M. und GARTNER, A. E. (1997). Molecular Basis for the Differential Subcellular Localization of the 38- and 39-kilodalton Structural Proteins of Borna Disease Virus. *Journal of Virology*, 71, 5133-5139.

- RANDALL, R. E. und GRIFFIN, D. E. (2017). Within Host RNA Virus Persistence: Mechanisms and Consequences. Current Opinion in Virology, 23, 35-42.
- RANJBAR TAKLIMIE, F., GASTERICH, N., SCHELD, M., WEISKIRCHEN, R., BEYER, C., CLARNER, T. und ZENDEDEL, A. (2019). Hypoxia Induces Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in Ischemic Stroke. International Journal of Molecular Sciences, 20, 1271.
- RANNIKKO, E. H., WEBER, S. S. und KAHLE, P. J. (2015). Exogenous α-Synuclein Induces Toll-Like Receptor 4 Dependent Inflammatory Responses in Astrocytes. *BMC Neuroscience*, **16**, 57.
- RANSOHOFF, R. M. (2016). How Neuroinflammation Contributes to Neurodegeneration. *Science*, 353, 777-783.
- RANSOM, B., BEHAR, T. und NEDERGAARD, M. (2003). New Roles for Astrocytes (Stars at Last). Trends in Neurosciences, 26, 520-522.
- RAO, P., HSU, K. C. und CHAO, M. V. (1995). Upregulation of NF-kB-Dependent Gene Expression Mediated by the p75 Tumor Necrosis Factor Receptor. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 15, 171-177.
- RATHORE, K. I., BERARD, J. L., REDENSEK, A., CHIERZI, S., LOPEZ-VALES, R., SANTOS, M., AKIRA, S. und DAVID, S. (2011). Lipocalin 2 Plays an Immunomodulatory Role and has Detrimental Effects after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, **31**, 13412-13419.
- RAUER, M., GÖTZ, J., SCHUPPLI, D., STAEHELI, P. und HAUSMANN, J. (2004). Transgenic Mice Expressing the Nucleoprotein of Borna Disease Virus in either Neurons or Astrocytes: Decreased Susceptibility to Homotypic Infection and Disease. *Journal of Virology*, 78, 3621-3632.
- RICHARDSON, D. R. (2005). 24p3 and Its Receptor: Dawn of a New Iron Age? Cell, 123, 1175-1177.
- RICHT, J. A., CLEMENTS, J. E., HERZOG, S., PYPER, J., WAHN, K. und BECHT, H. (1993). Analysis of Virus-Specific RNA Species and Proteins in Freon-113 Preparations of the Borna Disease Virus. *Medical Microbiology and Immunology*, **182**, 271-280.
- RICHT, J. A., FURBRINGER, T., KOCH, A., PFEUFFER, I., HERDEN, C., BAUSE-NIEDRIG, I. und GARTEN, W. (1998). Processing of the Borna Disease Virus Glycoprotein gp94 by the Subtilisin-Like Endoprotease Furin. *Journal of Virology*, **72**, 4528-4533.

- RICHT, J. A., GRABNER, A. und HERZOG, S. (2000). Borna Disease in Horses. The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice, 16, 579-595, xi.
- RICHT, J. A., PFEUFFER, I., CHRIST, M., FRESE, K., BECHTER, K. und HERZOG, S. (1997). Borna Disease Virus Infection in Animals and Humans. *Emerging Infectious Diseases*, **3**, 343-352.
- RICHT, J. A. und STITZ, L. (1992). Borna Disease Virus-Infected Astrocytes Function In Vitro as Antigen-Presenting and Target Cells for Virus-Specific CD4-Bearing Lymphocytes. Archives of Virology, 124, 95-109.
- RIEDHAMMER, C. und WEISSERT, R. (2015). Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 6, 322.
- ROTHE, J., LESSLAUER, W., LOTSCHER, H., LANG, Y., KOEBEL, P., KONTGEN, F., ALTHAGE,
 A., ZINKERNAGEL, R., STEINMETZ, M. und BLUETHMANN, H. (1993). Mice Lacking the Tumour Necrosis Factor Receptor 1 are Resistant to TNF-Mediated Toxicity but Highly Susceptible to Infection by Listeria Monocytogenes. *Nature*, 364, 798-802.
- ROTHHAMMER, V. und QUINTANA, F. J. (2015). Control of Autoimmune CNS Inflammation by Astrocytes. Seminars in Immunopathology, 37, 625-638.
- ROUACH, N., KOULAKOFF, A., ABUDARA, V., WILLECKE, K. und GIAUME, C. (2008). Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. Science, 322, 1551-1555.
- RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., BEER, M., ENSSER, A., HENGEL, H., SCHMIDT, B., SCHMIDT-CHANASIT, J. und VAHLENKAMP, T. (2018). Stellungnahme der Gesellschaft für Virologie (GfV) zu humanen Infektionen mit dem Borna disease virus 1 (BoDV-1), http://www.g-f-v.org 2018. Gesellschaft für Virologie.
- RUBIN, S. A., WALTRIP, R. W., 2ND, BAUTISTA, J. R. und CARBONE, K. M. (1993). Borna Disease Virus in Mice: Host-Specific Differences in Disease Expression. *Journal of Virology*, 67, 548-552.
- RUDD, P. M., MATTU, T. S., MASURE, S., BRATT, T., VAN DEN STEEN, P. E., WORMALD, M. R., KUSTER, B., HARVEY, D. J., BORREGAARD, N., VAN DAMME, J., DWEK, R. A. und OPDENAKKER, G. (1999). Glycosylation of Natural Human Neutrophil Gelatinase B and Neutrophil Gelatinase B-Associated Lipocalin. *Biochemistry*, 38, 13937-13950.

- SAHLENDER, D., A., SAVTCHOUK, I. und VOLTERRA, A. (2014). What Do we Know about Gliotransmitter Release from Astrocytes? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369, 20130592.
- SAITO, A., PIETROMONACO, S., LOO, A. K. und FARQUHAR, M. G. (1994). Complete Cloning and Sequencing of Rat gp330/"Megalin," a Distinctive Member of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 9725-9729.
- SALIER, J.-P. (2000). Chromosomal Location, Exon/Intron Organization and Evolution of Lipocalin Genes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1482, 25-34.
- SANTELLO, M., BEZZI, P. und VOLTERRA, A. (2011). TNFα Controls Glutamatergic Gliotransmission in the Hippocampal Dentate Gyrus. *Neuron*, **69**, 988-1001.
- SAUDER, C. und DE LA TORRE, J. C. (1999). Cytokine Expression in the Rat Central Nervous System following Perinatal Borna Disease Virus Infection. *Journal of Neuroimmunology*, 96, 29-45.
- SAUDER, C., HALLENSLEBEN, W., PAGENSTECHER, A., SCHNECKENBURGER, S., BIRO, L., PERTLIK, D., HAUSMANN, J., SUTER, M. und STAEHELI, P. (2000). Chemokine Gene Expression in Astrocytes of Borna Disease Virus-Infected Rats and Mice in the Absence of Inflammation. *Journal of Virology*, 74, 9267-9280.
- SCHALL, T. J., LEWIS, M., KOLLER, K. J., LEE, A., RICE, G. C., WONG, G. H. W., GATANAGA, T., GRANGER, G. A., LENTZ, R., RAAB, H., KOHR, W. J. und GOEDDEL, D. V. (1990). Molecular Cloning and Expression of a Receptor for Human Tumor Necrosis Factor. *Cell*, 61, 361-370.
- SCHAUDIEN, D. (2007). Experimentelle Infektion von TNF-transgenen M\u00e4usen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit – Einfluss auf Zytokinprofil, Neurodegeneration und Neuroprotektion. Institut f\u00fcr Pathologie, Stiftung Tier\u00e4rztliche Hochschule Hannover, PhD-These.
- SCHLOTTAU, K., FORTH, L., ANGSTWURM, K., HÖPER, D., ZECHER, D., LIESCHE, F., HOFFMANN, B., KEGEL, V., SEEHOFER, D., PLATEN, S., SALZBERGER, B., LIEBERT, U.
 G., NILLER, H.-H., SCHMIDT, B., MATIASEK, K., RIEMENSCHNEIDER, M. J., BROCHHAUSEN, C., BANAS, B., RENDERS, L., MOOG, P., WUNDERLICH, S., SEIFERT, C. L., BARREIROS, A., RAHMEL, A., WEISS, J., TAPPE, D., HERDEN, C., SCHMIDT-CHANASIT, J., SCHWEMMLE, M., RUBBENSTROTH, D., SCHLEGEL, J., PIETSCH, C., HOFFMANN, D., JANTSCH, J. und BEER, M. (2018). Fatal Encephalitic Borna Disease Virus 1 in Solid-Organ Transplant Recipients. New England Journal of Medicine, 379, 1377-1379.

- SCHLOTTAU, K., JENCKEL, M., VAN DEN BRAND, J., FAST, C., HERDEN, C., HOPER, D., HOMEIER-BACHMANN, T., THIELEBEIN, J., MENSING, N., DIENDER, B., HOFFMANN, D., ULRICH, R. G., METTENLEITER, T. C., KOOPMANS, M., TAPPE, D., SCHMIDT-CHANASIT, J., REUSKEN, C. B., BEER, M. und HOFFMANN, B. (2017). Variegated Squirrel Bornavirus 1 in Squirrels, Germany and the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 23, 477-481.
- SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., KIM, S. und LIPKIN, W. I. (1994). Identification of Signal Sequences that Control Transcription of Borna Disease Virus, a Nonsegmented, Negative-Strand RNA Virus. *Journal of Virology*, **68**, 6514-6522.
- SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., LAMB, R. A. und LIPKIN, W. I. (1995a). The Remarkable Coding Strategy of Borna Disease Virus: A New Member of the Nonsegmented Negative Strand RNA Viruses. *Virology*, **210**, 1-8.
- SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A. und LIPKIN, W. I. (1995b). The Atypical Strategies Used for Gene Expression of Borna Disease Virus, a Nonsegmented, Negative-Strand RNA Virus. *Uirusu*, 45, 165-174.
- SCHNEIDER, P. A., HATALSKI, C. G., LEWIS, A. J. und LIPKIN, W. I. (1997). Biochemical and Functional Analysis of the Borna Disease Virus G Protein. *Journal of Virology*, 71, 331-336.
- SCHNEIDER, U. (2005). Novel Insights into the Regulation of the Viral Polymerase Complex of Neurotropic Borna Disease Virus. Virus Research, 111, 148-160.
- SCHNEIDER, U., MARTIN, A., SCHWEMMLE, M. und STAEHELI, P. (2007). Genome Trimming by Borna Disease Viruses: Viral Replication Control or Escape from Cellular Surveillance? *Cellular* and Molecular Life Sciences, 64, 1038.
- SCHNEIDER, U., NAEGELE, M., STAEHELI, P. und SCHWEMMLE, M. (2003). Active Borna Disease Virus Polymerase Complex Requires a Distinct Nucleoprotein-to-Phosphoprotein Ratio but no Viral X Protein. *Journal of Virology*, 77, 11781-11789.
- SCHNEIDER, U., SCHWEMMLE, M. und STAEHELI, P. (2005). Genome Trimming: a Unique Strategy for Replication Control Employed by Borna Visease Virus. *Proceedings of the National Academy* of Sciences, 102, 3441-3446.
- SCHOUSBOE, A. und DIVAC, I. (1979). Differences in Glutamate Uptake in Astrocytes Cultured from Different Brain Regions. *Brain Research*, 177, 407-409.

- SCHWEMMLE, M., DE, B., SHI, L., BANERJEE, A. und LIPKIN, W. I. (1997). Borna Disease Virus Pprotein Is Phosphorylated by Protein Kinase Cε and Casein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 21818-21823.
- SEDGER, L. M. und MCDERMOTT, M. F. (2014). TNF and TNF-Receptors: From Mediators of Cell Death and Inflammation to Therapeutic Giants – Past, Present and Future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25, 453-472.
- SEDGWICK, J. D., RIMINTON, D. S., CYSTER, J. G. und KÖRNER, H. (2000). Tumor Necrosis Factor: a Master-Regulator of Leukocyte Movement. *Immunology Today*, **21**, 110-113.
- SELEME, M. C., KOSMAC, K., JONJIC, S. und BRITT, W. J. (2017). Tumor Necrosis Factor-a-Induced Recruitment of Inflammatory Mononuclear Cells Leads to Inflammation and Altered Brain Development in Murine Cytomegalovirus-Infected Newborn Mice. *Journal of Virology*, 91.
- SEO, S. H. und WEBSTER, R. G. (2002). Tumor Necrosis Factor-a Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 76, 1071-1076.
- SERGERIE, Y., RIVEST, S. und BOIVIN, G. (2007). Tumor Necrosis Factor-a and Interleukin-1b Play a Critical Role in the Resistance against Lethal Herpes Simplex Virus Encephalitis. *Journal of Infectious Diseases*, **196**, 853-860.
- SHANKAR, V., KAO, M., HAMIR, A. N., SHENG, H., KOPROWSKI, H. und DIETZSCHOLD, B. (1992). Kinetics of Virus Spread and Changes in Levels of Several Cytokine mRNAs in the Brain after Intranasal Infection of Rats with Borna Disease Virus. *Journal of Virology*, 66, 992-998.
- SHIRATORI-HAYASHI, M., KOGA, K., TOZAKI-SAITOH, H., KOHRO, Y., TOYONAGA, H., YAMAGUCHI, C., HASEGAWA, A., NAKAHARA, T., HACHISUKA, J., AKIRA, S., OKANO, H., FURUE, M., INOUE, K. und TSUDA, M. (2015). STAT3-Dependent Reactive Astrogliosis in the Spinal Dorsal Horn Underlies Chronic Itch. *Nature Medicine*, 21, 927-931.
- SHRESTHA, B., ZHANG, B., PURTHA, W. E., KLEIN, R. S. und DIAMOND, M. S. (2008). Tumor Necrosis Factor-a Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Promoting Trafficking of Mononuclear Leukocytes into the Central Nervous System. *Journal of Virology*, 82, 8956-8964.
- SKRZYPIEC, A. E., SHAH, R. S., SCHIAVON, E., BAKER, E., SKENE, N., PAWLAK, R. und MUCHA,
 M. (2013). Stress-Induced Lipocalin-2 Controls Dendritic Spine Formation and Neuronal Activity in the Amygdala. *PLOS One*, 8, e61046.

- SMITH, C., DAVIS, T., ANDERSON, D., SOLAM, L., BECKMANN, M., JERZY, R., DOWER, S., COSMAN, D. und GOODWIN, R. (1990). A Receptor for Tumor Necrosis Factor Defines an Unusual Family of Cellular and Viral Proteins. *Science*, 248, 1019-1023.
- SO, E. Y., KANG, M. H. und KIM, B. S. (2006). Induction of Chemokine and Cytokine Genes in Astrocytes following Infection with Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus is Mediated by the Toll-Like Receptor 3. *Glia*, 53, 858-867.
- SO, E. Y. und KIM, B. S. (2009). Theiler's Virus Infection Induces TLR3-Dependent Upregulation of TLR2 Critical for Proinflammatory Cytokine Production. *Glia*, 57, 1216-1226.
- **SOFRONIEW, M. V. (2009)**. Molecular Dissection of Reactive Astrogliosis and Glial Scar Formation. *Trends in Neurosciences*, **32**, 638-647.
- SOFRONIEW, M. V. (2015). Astrocyte Barriers to Neurotoxic Inflammation. *Nature Reviews* Neuroscience, 16, 249.
- SOFRONIEW, M. V. und VINTERS, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and Pathology. Acta Neuropathologica, 119, 7-35.
- SOFUKU, K., PARRISH, N. F., HONDA, T. und TOMONAGA, K. (2015). Transcription Profiling Demonstrates Epigenetic Control of Non-Retroviral RNA Virus-Derived Elements in the Human Genome. *Cell Reports*, **12**, 1548-1554.
- SONG, W., KAO, W., ZHAI, A., QIAN, J., LI, Y., ZHANG, Q., ZHAO, H., HU, Y., LI, H. und ZHANG, F. (2013). Borna Disease Virus Nucleoprotein Inhibits type I Interferon Induction Through the Interferon Regulatory Factor 7 Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438, 619-623.
- SRINIVASAN, M., SEDMAK, D. und JEWELL, S. (2002). Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *The American Journal of Pathology*, **161**, 1961-1971.
- SRIRAM, K., MATHESON, J. M., BENKOVIC, S. A., MILLER, D. B., LUSTER, M. I. und O'CALLAGHAN, J. P. (2002). Mice Deficient in TNF Receptors are Protected against Dopaminergic Neurotoxicity: Implications for Parkinson's Disease. *FASEB Journal*, **16**, 196-202.

STAEHELI, P. (2002). Bornaviruses. Virus Research, 82, 55-59.

- STEELAND, S., GORLÉ, N., VANDENDRIESSCHE, C., BALUSU, S., BRKIC, M., VAN CAUWENBERGHE, C., VAN IMSCHOOT, G., VAN WONTERGHEM, E., DE RYCKE, R., KREMER, A., LIPPENS, S., STOPA, E., JOHANSON, C. E., LIBERT, C. und VANDENBROUCKE, R. E. (2018). Counteracting the Effects of TNF Receptor-1 has Therapeutic Potential in Alzheimer's Disease. *EMBO Molecular Medicine*, **10**, e8300.
- STELLWAGEN, D., BEATTIE, E. C., SEO, J. Y. und MALENKA, R. C. (2005). Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor-α. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 3219-3228.
- STELLWAGEN, D. und MALENKA, R. C. (2006). Synaptic Scaling Mediated by Glial TNF-α. Nature, 440, 1054-1059.
- STITZ, L., BILZER, T. und PLANZ, O. (2002). The Immunopathogenesis of Borna Disease Virus Infection. Frontiers in Bioscience, 7, d541-555.
- STITZ, L., KREY, H. und LUDWIG, H. (1980). Borna Disease in Rhesus Monkeys as a Model for Uveo-Cerebral Symptoms. *Journal of Medical Virology*, 6, 333-340.
- STITZ, L., SOEDER, D., DESCHL, U., FRESE, K. und ROTT, R. (1989). Inhibition of Immune-Mediated Meningoencephalitis in Persistently Borna Disease Virus-Infected Rats by Cyclosporine A. *The Journal of Immunology*, 143, 4250-4256.
- SUK, K. (2016). Lipocalin-2 as a Therapeutic Target for Brain Injury: An Astrocentric Perspective. Progress in Neurobiology, 144, 158-172.
- SZYMOCHA, R., AKAOKA, H., DUTUIT, M., MALCUS, C., DIDIER-BAZES, M., BELIN, M.-F. und GIRAUDON, P. (2000). Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1-Infected T Lymphocytes Impair Catabolism and Uptake of Glutamate by Astrocytes via Tax-1 and Tumor Necrosis Factor-a. *Journal of Virology*, 74, 6433-6441.
- TAKEUCHI, H., JIN, S., WANG, J., ZHANG, G., KAWANOKUCHI, J., KUNO, R., SONOBE, Y., MIZUNO, T. und SUZUMURA, A. (2006). Tumor Necrosis Factor-α Induces Neurotoxicity via Glutamate Release from Hemichannels of Activated Microglia in an Autocrine Manner. *Journal* of Biological Chemistry, 281, 21362-21368.
- TANAKA, K., WATASE, K., MANABE, T., YAMADA, K., WATANABE, M., TAKAHASHI, K., IWAMA, H., NISHIKAWA, T., ICHIHARA, N., KIKUCHI, T., OKUYAMA, S., KAWASHIMA, N., HORI,
 S., TAKIMOTO, M. und WADA, K. (1997). Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1. *Science*, 276, 1699-1702.
- TAOUFIK, E., VALABLE, S., MÜLLER, G. J., ROBERTS, M. L., DIVOUX, D., TINEL, A., VOULGARI-KOKOTA, A., TSEVELEKI, V., ALTRUDA, F., LASSMANN, H., PETIT, E. und PROBERT, L. (2007). FLIPL Protects Neurons against *In Vivo* Ischemia and *In Vitro* Glucose Deprivation-Induced Cell Death. *The Journal of Neuroscience*, 27, 6633-6646.
- TAPPE, D., SCHLOTTAU, K., CADAR, D., HOFFMANN, B., BALKE, L., BEWIG, B., HOFFMANN, D., EISERMANN, P., FICKENSCHER, H., KRUMBHOLZ, A., LAUFS, H., HUHNDORF, M., ROSENTHAL, M., SCHULZ-SCHAEFFER, W., ISMER, G., HOTOP, S.-K., BRÖNSTRUP, M., OTT, A., SCHMIDT-CHANASIT, J. und BEER, M. (2018). Occupation-Associated Fatal Limbic Encephalitis Caused by Variegated Squirrel Bornavirus 1, Germany, 2013. Emerging Infectious Disease Journal, 24, 978.
- TARASSISHIN, L., LOUDIG, O., BAUMAN, A., SHAFIT-ZAGARDO, B., SUH, H.-S. und LEE, S. C. (2011). Interferon Regulatory Factor 3 Inhibits Astrocyte Inflammatory Gene Expression through Suppression of the Proinflammatory miR-155 and miR-155*. *Glia*, **59**, 1911-1922.
- TARASSISHIN, L., SUH, H.-S. und LEE, S. C. (2014). LPS and IL-1 Differentially Activate Mouse and Human Astrocytes: Role of CD14. *Glia*, 62, 999-1013.
- TARLOW, M. J., JENKINS, R., COMIS, S. D., OSBORNE, M. P., STEPHENS, S., STANLEY, P. und CROCKER, J. (1993). Ependymal Cells of the Choroid Plexus Express Tumour Necrosis Factor-α. Neuropathology & Applied Neurobiology, 19, 324-328.
- TARTAGLIA, L. A., AYRES, T. M., WONG, G. H. W. und GOEDDEL, D. V. (1993a). A Novel Domain within the 55 kd TNF Receptor Signals Cell Death. Cell, 74, 845-853.
- TARTAGLIA, L. A., GOEDDEL, D. V., REYNOLDS, C., FIGARI, I. S., WEBER, R. F., FENDLY, B. M. und PALLADINO, M. A. (1993b). Stimulation of Human T-Cell Proliferation by Specific Activation of the 75-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *The Journal of Immunology*, 151, 4637-4641.
- TARTAGLIA, L. A., WEBER, R. F., FIGARI, I. S., REYNOLDS, C., PALLADINO, M. A. und GOEDDEL,
 D. V. (1991). The two Different Receptors for Tumor Necrosis Factor Mediate Distinct Cellular Responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 9292-9296.
- TAUPIN, V., RENNO, T., BOURBONNIÈRE, L., PETERSON, A. C., RODRIGUEZ, M. und OWENS,
 T. (1997). Increased Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Chronic Macrophage/Microglial Reactivity, and Demyelination in Transgenic Mice Producing Tumor Necrosis Factor-α in the Central Nervous System. *European Journal of Immunology*, 27, 905-913.

- TCHÉLINGÉRIAN, J.-L., MONGE, M., LE SAUX, F., ZALC, B. und JACQUE, C. (1995). Differential Oligodendroglial Expression of the Tumor Necrosis Factor Receptors *In Vivo* and *In Vitro*. *Journal of Neurochemistry*, 65, 2377-2380.
- THIEDEMANN, N., PRESEK, P., ROTT, R. und STITZ, L. (1992). Antigenic Relationship and further Characterization of two Major Borna Disease Virus-Specific Proteins. *Journal of General Virology*, 73, 1057-1064.
- THOMA, B., GRELL, M., PFIZENMAIER, K. und SCHEURICH, P. (1990). Identification of a 60-kD Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor as the Major Signal Transducing Component in TNF Responses. *The Journal of Experimental Medicine*, **172**, 1019-1023.
- THORNTON, P., PINTEAUX, E., GIBSON, R. M., ALLAN, S. M. und ROTHWELL, N. J. (2006). Interleukin-1-Induced Neurotoxicity is Mediated by Glia and Requires Caspase Activation and Free Radical Release. *Journal of Neurochemistry*, 98, 258-266.
- TING, A. T. und BERTRAND, M. J. M. (2016). More to Life than NF-κB in TNFR1 Signaling. *Trends in Immunology*, **37**, 535-545.
- TOMONAGA, K., KOBAYASHI, T. und IKUTA, K. (2002). Molecular and Cellular Biology of Borna Disease Virus Infection. *Microbes and Infection*, 4, 491-500.
- TRAJKOVIC, V., VUCKOVIC, O., STOSIC-GRUJICIC, S., MILJKOVIC, D., POPADIC, D., MARKOVIC, M., BUMBASIREVIC, V., BACKOVIC, A., CVETKOVIC, I., HARHAJI, L., RAMIC,
 Z. und MOSTARICA STOJKOVIC, M. (2004). Astrocyte-Induced Regulatory T Cells Mitigate CNS Autoimmunity. *Glia*, 47, 168-179.
- TRIEBEL, S., BLÄSER, J., REINKE, H. und TSCHESCHE, H. (1992). A 25 kDa α2-Microglobulin-Related Protein is a Component of the 125 kDa Form of Human Gelatinase. *FEBS Letters*, **314**, 386-388.
- TURRIN, N. P. und RIVEST, S. (2004). Innate Immune Reaction in Response to Seizures: Implications for the Neuropathology Associated with Epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 16, 321-334.
- ULLIAN, E. M., SAPPERSTEIN, S. K., CHRISTOPHERSON, K. S. und BARRES, B. A. (2001). Control of Synapse Number by Glia. *Science*, **291**, 657-661.

- UNTERSTAB, G., LUDWIG, S., ANTON, A., PLANZ, O., DAUBER, B., KRAPPMANN, D., HEINS, G., EHRHARDT, C. und WOLFF, T. (2005). Viral Targeting of the Interferon-β-Inducing Traf Family Member-Associated NF-κB Activator (TANK)-Binding Kinase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13640-13645.
- VALENTIN-TORRES, A., SAVARIN, C., HINTON, D. R., PHARES, T. W., BERGMANN, C. C. und STOHLMAN, S. A. (2016). Sustained TNF Production by Central Nervous System Infiltrating Macrophages Promotes Progressive Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 46.
- VARATHARAJ, A. und GALEA, I. (2017). The Blood-Brain Barrier in Systemic Inflammation. Brain, Behavior, and Immunity, 60, 1-12.
- VARDJAN, N., GABRIJEL, M., POTOKAR, M., ŠVAJGER, U., KREFT, M., JERAS, M., DE PABLO, Y., FAIZ, M., PEKNY, M. und ZOREC, R. (2012). IFN-γ-induced Increase in the Mobility of MHC Class II Compartments in Astrocytes Depends on Intermediate Filaments. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 144.
- VARGAS, M. R. und JOHNSON, J. A. (2010). Astrogliosis in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Role and Therapeutic Potential of Astrocytes. *Neurotherapeutics*, 7, 471-481.
- VASSALLI, P. (1992). The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. Annual Review of Immunology, 10, 411-452.
- VERKHRATSKY, A., MATTEOLI, M., PARPURA, V., MOTHET, J. P. und ZOREC, R. (2016). Astrocytes as Secretory Cells of the Central Nervous System: Idiosyncrasies of Vesicular Secretion. *The EMBO Journal*, **35**, 239-257.
- VERKHRATSKY, A. und NEDERGAARD, M. (2014). Astroglial Cradle in the Life of the Synapse. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 369.
- VEZZANI, A., FRENCH, J., BARTFAI, T. und BARAM, T. Z. (2011). The Role of Inflammation in Epilepsy. *Nature Reviews. Neurology*, **7**, 31-40.
- VIEL, J. J., MCMANUS, D. Q., SMITH, S. S. und BREWER, G. J. (2001). Age- and Concentration-Dependent Neuroprotection and Toxicity by TNF in Cortical Neurons from β-Amyloid. *Journal* of Neuroscience Research, 64, 454-465.
- VILCEK, J. und LEE, T. H. (1991). Tumor Necrosis Factor. New Insights into the Molecular Mechanisms of its Multiple Actions. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 7313-7316.

- VILELA, M. C., LIMA, G. K., RODRIGUES, D. H., LACERDA-QUEIROZ, N., MANSUR, D. S., MIRANDA, A. S. D., RACHID, M. A., KROON, E. G., VIEIRA, L. Q., CAMPOS, M. A., TEIXEIRA, M. M. und TEIXEIRA, A. L. (2010). TNFR1 Plays a Critical Role in the Control of Severe HSV-1 Encephalitis. *Neuroscience Letters*, 479, 58-62.
- WAAGE, A. (1987). Production and Clearance of Tumor Necrosis Factor in Rats Exposed to Endotoxin and Dexamethasone. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 45, 348-355.
- WALKER, M. P., JORDAN, I., BRIESE, T., FISCHER, N. und LIPKIN, W. I. (2000). Expression and Characterization of the Borna Disease Virus Polymerase. *Journal of Virology*, 74, 4425-4428.
- WALKER, M. P. und LIPKIN, W. I. (2002). Characterization of the Nuclear Localization Signal of the Borna Disease Virus Polymerase. *Journal of Virology*, 76, 8460-8467.
- WANG, G., WENG, Y.-C., HAN, X., WHALEY, J. D., MCCRAE, K. R. und CHOU, W.-H. (2015). Lipocalin-2 Released in Response to Cerebral Ischaemia Mediates Reperfusion Injury in Mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **19**, 1637-1645.
- WANG, J., AL-LAMKI, R. S., ZHANG, H., KIRKILES-SMITH, N., GAETA, M. L., THIRU, S., POBER, J. S. und BRADLEY, J. R. (2003). Histamine Antagonizes Tumor Necrosis Factor (TNF) Signaling by Stimulating TNF Receptor Shedding from the Cell Surface and Golgi Storage Pool. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 21751-21760.
- WANG, J., LI, G., WANG, Z., ZHANG, X., YAO, L., WANG, F., LIU, S., YIN, J., LING, E. A., WANG,
 L. und HAO, A. (2012). High Glucose-Induced Expression of Inflammatory Cytokines and
 Reactive Oxygen Species in Cultured Astrocytes. *Neuroscience*, 202, 58-68.
- WANG, L.-W., CHANG, Y.-C., CHEN, S.-J., TSENG, C.-H., TU, Y.-F., LIAO, N.-S., HUANG, C.-C. und HO, C.-J. (2014). TNFR1-JNK Signaling is the Shared Pathway of Neuroinflammation and Neurovascular Damage after LPS-Sensitized Hypoxic-Ischemic Injury in the Immature Brain. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 215.
- WANG, W., XU, L., BRANDSMA, J. H., WANG, Y., HAKIM, M. S., ZHOU, X., YIN, Y., FUHLER, G. M.,
 VAN DER LAAN, L. J. W., VAN DER WOUDE, C. J., SPRENGERS, D., METSELAAR, H. J.,
 SMITS, R., POOT, R. A., PEPPELENBOSCH, M. P. und PAN, Q. (2016). Convergent
 Transcription of Interferon-Stimulated Genes by TNF-α and IFN-α Augments Antiviral Activity
 against HCV and HEV. Scientific Reports, 6, 25482.
- WANG, Y.-C., LIN, S. und YANG, Q.-W. (2011). Toll-Like Receptors in Cerebral Ischemic Inflammatory Injury. Journal of Neuroinflammation, 8, 134.

- WANG, Z., TRILLO-PAZOS, G., KIM, S.-Y., CANKI, M., MORGELLO, S., SHARER, L. R., GELBARD,
 H. A., SU, Z.-Z., KANG, D.-C., BROOKS, A. I., FISHER, P. B. und VOLSKY, D. J. (2004).
 Effects of Human Immunodeficiency Virus Type 1 on Astrocyte Gene Expression and Function:
 Potential Role in Neuropathogenesis. *Journal of Neurovirology*, 10, 25-32.
- WATANABE, M., INOUE, Y., SAKIMURA, K. und MISHINA, M. (1993). Distinct Distributions of five N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channel Subunit mRNAs in the Forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 338, 377-390.
- WATANABE, M., ZHONG, Q., KOBAYASHI, T., KAMITANI, W., TOMONAGA, K. und IKUTA, K. (2000). Molecular Ratio between Borna Disease Viral-p40 and -p24 Proteins in Infected Cells Determined by Quantitative Antigen Capture ELISA. *Microbiology and Immunology*, 44, 765-772.
- WEHNER, T., RUPPERT, A., HERDEN, C., FRESE, K., BECHT, H. und RICHT, J. A. (1997). Detection of a Novel Borna Disease Virus-Encoded 10 kDa Protein in Infected Cells and Tissues. *Journal* of General Virology, 78, 2459-2466.
- WEINBERG, M. S., BLAKE, B. L. und MCCOWN, T. J. (2013). Opposing Actions of Hippocampus TNFα Receptors on Limbic Seizure Susceptibility. *Experimental Neurology*, 247, 429-437.
- WEISSENBÖCK, H., BAGO, Z., KOLODZIEJEK, J., HAGER, B., PALMETZHOFER, G., DURRWALD,
 R. und NOWOTNY, N. (2017). Infections of Horses and Shrews with Bornaviruses in Upper Austria: A Novel Endemic Area of Borna Disease. *Emerging Microbes & Infections*, 6, e52.
- WEISSENBÖCK, H., HORNIG, M., HICKEY, W. F. und LIPKIN, W. I. (2000). Microglial Activation and Neuronal Apoptosis in Bornavirus Infected Neonatal Lewis Rats. *Brain Pathology*, **10**, 260-272.
- WEISSENBÖCK, H., NOWOTNY, N., CAPLAZI, P., KOLODZIEJEK, J. und EHRENSPERGER, F. (1998a). Borna Disease in a Dog with Lethal Meningoencephalitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2127-2130.
- WEISSENBÖCK, H., SUCHY, A., CAPLAZI, P., HERZOG, S. und NOWOTNY, N. (1998b). Borna Disease in Austrian Horses. Veterinary Record, 143, 21-22.
- WENSMAN, J. J., MUNIR, M., THADURI, S., HORNAEUS, K., RIZWAN, M., BLOMSTROM, A. L., BRIESE, T., LIPKIN, W. I. und BERG, M. (2013). The X Proteins of Bornaviruses Interfere with Type I Interferon Signalling. *Journal of General Virology*, 94, 263-269.

- WERNER-KEIŠS, N., GARTEN, W., RICHT, J., POROMBKA, D., ALGERMISSEN, D., HERZOG, S., BAUMGÄRTNER, W. und HERDEN, C. (2008). Restricted Expression of Borna Disease Virus Glycoprotein in Brains of Experimentally Infected Lewis Rats. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34, 590-602.
- WESTERGAARD, N., SONNEWALD, U., UNSGÅRD, G., PENG, L., HERTZ, L. und SCHOUSBOE,
 A. (1994). Uptake, Release, and Metabolism of Citrate in Neurons and Astrocytes in Primary Cultures. *Journal of Neurochemistry*, 62, 1727-1733.
- WHEELER, D., KNAPP, E., BANDARU, V. V. R., WANG, Y., KNORR, D., POIRIER, C., MATTSON,
 M. P., GEIGER, J. D. und HAUGHEY, N. J. (2009). Tumor Necrosis Factor-α-Induced Neutral Sphingomyelinase-2 Modulates Synaptic Plasticity by Controlling the Membrane Insertion of NMDA Receptors. *Journal of Neurochemistry*, 109, 1237-1249.
- WILHELMSSON, U., BUSHONG, E. A., PRICE, D. L., SMARR, B. L., PHUNG, V., TERADA, M., ELLISMAN, M. H. und PEKNY, M. (2006). Redefining the Concept of Reactive Astrocytes as Cells that Remain within their Unique Domains upon Reaction to Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 17513-17518.
- WONG, G. H. W., BARTLETT, P. F., CLARK-LEWIS, I., BATTYE, F. und SCHRADER, J. W. (1984). Inducible Expression of H-2 and la Antigens on Brain Cells. *Nature*, **310**, 688-691.
- WU, V. W., NISHIYAMA, N. und SCHWARTZ, J. P. (1998). A Culture Model of Reactive Astrocytes: Increased Nerve Growth Factor Synthesis and Reexpression of Cytokine Responsiveness. *Journal of Neurochemistry*, **71**, 749-756.
- WU, V. W. und SCHWARTZ, J. P. (1998). Cell Culture Models for Reactive Gliosis: New Perspectives. Journal of Neuroscience Research, 51, 675-681.
- XIAO, X., YEOH, B. S. und VIJAY-KUMAR, M. (2017). Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 37, 103-130.
- XING, C., WANG, X., CHENG, C., MONTANER, J., MANDEVILLE, E., LEUNG, W., VAN LEYEN, K., LOK, J., WANG, X. und LO, E. H. (2014). Neuronal Production of Lipocalin-2 as a Help-Me Signal for Glial Activation. *Stroke*, 45, 2085-2092.
- YANAI, H., HAYASHI, Y., WATANABE, Y., OHTAKI, N., KOBAYASHI, T., NOZAKI, Y., IKUTA, K. und TOMONAGA, K. (2006). Development of a Novel Borna Disease Virus Reverse Genetics System Using RNA Polymerase II Promoter and SV40 Nuclear Import Signal. *Microbes and Infection*, 8, 1522-1529.

- YANAI, M., SAKAI, M., MAKINO, A. und TOMONAGA, K. (2017). Dual Function of the Nuclear Export Signal of the Borna Disease Virus Nucleoprotein in Nuclear Export Activity and Binding to Viral Phosphoprotein. *Virology Journal*, 14, 126.
- YANG, J., GOETZ, D., LI, J. Y., WANG, W., MORI, K., SETLIK, D., DU, T., ERDJUMENT-BROMAGE,
 H., TEMPST, P., STRONG, R. und BARASCH, J. (2002). An Iron Delivery Pathway Mediated
 by a Lipocalin. *Molecular Cell*, 10, 1045-1056.
- YE, L.-L., WEI, X.-S., ZHANG, M., NIU, Y.-R. und ZHOU, Q. (2018). The Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in CD8(+) Regulatory T Cells and CD8(+) Effector T Cells. *Frontiers in Immunology*, 9, 583-583.
- ZAMANIAN, J. L., XU, L., FOO, L. C., NOURI, N., ZHOU, L., GIFFARD, R. G. und BARRES, B. A. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *The Journal of Neuroscience*, 32, 6391-6410.
- ZHANG, Y. und BARRES, B. A. (2010). Astrocyte Heterogeneity: An Underappreciated Topic in Neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology*, 20, 588-594.
- ZHANG, Y., FONCEA, R., DEIS, J. A., GUO, H., BERNLOHR, D. A. und CHEN, X. (2014). Lipocalin 2 Expression and Secretion Is Highly Regulated by Metabolic Stress, Cytokines, and Nutrients in Adipocytes. *PLOS One*, 9, e96997.
- ZHAO, P. und STEPHENS, J. M. (2013). STAT1, NF-κB and ERKs Play a Role in the Induction of Lipocalin-2 Expression in Adipocytes. *Molecular Metabolism*, 2, 161-170.
- ZHENG, G., BACHINSKY, D. R., STAMENKOVIC, I., STRICKLAND, D. K., BROWN, D., ANDRES, G. und MCCLUSKEY, R. T. (1994). Organ Distribution in Rats of two Members of the Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Family, gp330 and LRP/a2MR, and the Receptor-Associated Protein (RAP). Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 42, 531-542.
- ZHENG, L., CALENOFF, M. A. und DAL CANTO, M. C. (2001). Astrocytes, not Microglia, are the Main Cells Responsible for Viral Persistence in Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection Leading to Demyelination. *Journal of Neuroimmunology*, **118**, 256-267.
- ZIMMERMANN, W., BRETER, H., RUDOLPH, M. und LUDWIG, H. (1994). Borna Disease Virus: Immunoelectron Microscopic Characterization of Cell-Free Virus and further Information about the Genome. *Journal of Virology*, 68, 6755-6758.

- **ZOU, J. Y. und CREWS, F. T. (2005)**. TNFα Potentiates Glutamate Neurotoxicity by Inhibiting Glutamate Uptake in Organotypic Brain Slice Cultures: Neuroprotection by NFκB Inhibition. *Brain Research*, **1034**, 11-24.
- ZURBRIGGEN, A., MÜLLER, C. und VANDEVELDE, M. (1993). In Situ Hybridization of Virulent Canine Distemper Virus in Brain Tissue, Using Digoxigenin-Labeled Probes. *American Journal* of Veterinary Research, 54, 1457-1461.
- ZWICK, W. und SEIFRIED, O. (1925). Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn-und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). Berliner Tierärztliche Wochenschrift, 41, 129-132.
- ZWICK, W., SEIFRIED, O. und WITTE, J. (1927). Experimentelle Untersuchung über die seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). Zeitschrift für Infektionskrankheiten, Parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere, 30, 42-136.

10 ANHANG

10.1 Lösungen und Puffer

0,25 Acetanhydrid (Aca) in 0,1 M Triethanolamin (TEA), pH 7,5

745 mg TEA

ad 50 ml Aqua bidest./DEPC

pH 7,5 mit 1-2 N HCl einstellen

125 µl Aca kurz vor Gebrauch zugeben, gut rühren

Aqua bidest. steril

Aqua bidest. in sterile, ausgebackene Glasflaschen füllen und autoklavieren

5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (X-Phosphat, BCIP)

500 mg X-Phosphat

10 ml 100%iges Dimethylformamid

0,1 M CaCl₂

1,47 g Calciumchlorid (CaCl₂, MW: 147,02 g/mol)

100 ml Aqua bidest.

50 x Denhardts

5 g Ficoll

5 g Polyvinylpyrrolidone

5 g bovines Serumalbumin

500 ml Aqua bidest., steril

20 x Hybridisierungssalze

10 ml 0,5 M EDTA-Na₂, pH 8

10 ml 0,5 M PIPES, pH 7

30 ml 5 M NaCl

Dextransulfat (wird während der ISH frisch angesetzt)

250 mg Dextransulfat

400 µl Aqua bidest./DEPC

im warmen Wasserbad lösen

3,3`-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB)

100 mg DAB

200 ml 0,1 M Imidazol-Puffer (pH7,1)

DAB-Imidazolgemisch lichtgeschützt durch ein Filterpapier filtrieren (Machery-Nagel GmbH &Co. KG, Düren) und unmittelbar vor Gebrauch 70 μ I 30 %iges H₂O₂ zugeben

Diethylpyrokarbonat (DEPC)- Aqua bidest.

1 ml Diethylpyrokarbonat Reinsubstanz

1000 ml Aqua bidest.

Unter einem Abzug über Nacht auf Magnetrührer lösen, anschließend autoklavieren

DIG-Antikörper-Lösung

31 µl NSS

94 µl 10 %iges Triton X-100

3 ml Puffer 1

Bei 37°C vorinkubieren

15 µl Anti-DIG-Antikörper (1:200)

0,5 M EDTA-Na₂, pH 8

18,6 g di-Natrium-EDTA-di-Hydrat (MW: 372,31 g/mol)

60 ml Aqua bidest./DEPC oder Aqua bidest./steril

pH 8 mit 5 N NaOH einstellen

Farbreaktionslösung (ISH)

Unter Lichtschutz frisch ansetzen.

225 µl NBT

175 µl X-Phosphat

12 mg Levamisol

50 ml Puffer 3

0,2 %iges Glycin in 1 x PBS

1 g Glycin

500 ml 1 x PBS, pH 7,4

0,2 N HCI

50 ml 2N HCI

450 ml Aqua bidest.

Heringssperma-DNA (ssDNA)

mit Puffer 4 (pH 4) 10 mg/ml lösen

Hybridisierungspuffer (HB-Mix)

16 ml 100%iges Formamid, deionisiert

8 ml 20 x Hybridisierungssalze

3,2 ml 50x Denhardts

320 µl Heparin

320 µl 10%iges Triton X-100

= 40 Aliquots zu je 696 µl, bei -20°C gelagert

In der ISH pro Aliquot zugeben:

18 µl RNA

20 µl ssDNA

80 µl gelöstes Dextransulfat

0,1 M Imidazol-Puffer

6,81 g Imidazol

1000 ml Aqua dest.

500 ml 0,1 M HCI

pH Wert mit 0,1 M HCl auf 7,1 einstellen

IFN-γ

Stocklösung:

20 µg lyophilisiertes Pulver in 20 µl sterilem Wasser auflösen; entspricht 100 000 U (in 20 µl)

Arbeitslösung

1:100-Verdünnung der Stocklösung mit sterilem 1 x PBS, so dass 50 000 U/ml bzw. 50 U /µl

Inkubationslösung

1 µl der Arbeitslösung in 1 ml DMEM-Medium

IL-4

Stocklösung

5 µg Lyophilisat in 50 µl sterilem Wasser lösen, entspricht 0,1 mg/ml

Inkubationslösung

0,1 µl der Stocklösung in 1 ml Medium (wegen fehlender Pipettierbarkeit größere Volumina gewählt)

Kardasewitsch: Stammlösung

200 ml 25 %ige Ammoniaklösung

800 ml 70 %iges Ethanol

Kardasewitsch: Gebrauchslösung

5 ml Stammlösung

175 ml 70 %iges Ethanol

LPS

Stocklösung

1 mg Lyophilisat in 1 ml sterilem 1 x PBS auflösen

<u>Arbeitslösung</u>

1:10-Verdünnung der Stocklösung mit sterilem 1 x PBS

Inkubationslösung

1 µl der Arbeitslösung in 1 ml DMEM-Medium; entspricht 100 ng/ml

1 M MgCl₂

20,33 g MgCl₂ (Hexahydrat: MW: 203,3 g/mol)

100 ml Aqua bidest.

3 M NaCl

87,66 g NaCl (MW: 58,44 g/mol)

500 ml Aqua bidest.

5 M NaCl

29,22 g NaCl (MW: 58,44 g/mol)

100 ml Aqua bidest.

5 N NaOH

20 g NaOH-Plätzchen (MW: 40 g/mol)

100 ml Aqua bidest.

4 %iges Paraformaldehyd (PFA, pH 7,35-7,4)

40 g PFA

1000 ml 1 x PBS, pH 7,4

Lösen unter Erwärmen auf 70°C; nicht autoklavieren

Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT): Stammlösung (75 mg/ml)

1 g NBT

13,3 ml 70 %iges Dimethylformamid (DMF; 30 ml Aqua bidest. + 70 ml DMF)

Papanicolaou Gebrauchslösung

Papanicolaou Hämatoxylin 1b mit Aqua dest im Verhältnis 1:10 verdünnen.

Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid (phosphate buffered saline, PBS): Stammlösung (10x)

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

1000 ml Aqua bidest.

Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid (phosphate buffered saline, PBS): Gebrauchslösung

Stammlösung 1:10 mit 1x PBS verdünnen (Aqua bidest.)

pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen

1 x PBS + 5 mM MgCl₂

6 ml 10 x PBS

0,3 ml 1 M MgCl₂

ad 60 ml Aqua bidest./DEPC

Frisch herstellen oder steril filtrieren

0,5 M Piperazin-N,N'bis[2-etansulfat-Säure] (PIPES)

8,6575 g PIPES (MW: 346,3 g/mol)

50 ml Aqua bidest.

Prähybridisierungspuffer (PHB-Mix)

450 ml 20 x SSC

675 ml 100%iges Formamid, deionisiert

150 ml 50 x Denhardts

210 ml Aqua bidest./DEPC

= 30 Aliquots zu je 49,5ml bei -20°C gelagert

in der ISH pro Aliquot zugeben:

0,5 ml ssDNA (5 Minuten auf 95°C erhitzen und auf Eis abkühlen)

1,25 ml RNA

Proteinase K – Gebrauchslösung

1 ml 1 M Tris, pH 8

1 ml 0.1 M CaCl₂ ad 60 ml Aqua bidest. DEPC Zusammen vorinkubieren bei 37°C 4,3 µl Proteinase K kurz vor Gebrauch dazugeben Puffer 1, pH 7,5 12,11 g Tris-HCI (MW: 121,14 g/mol) 8,77 g NaCl (MW: 58,44 g/mol) 1000 ml Aqua bidest. Puffer 2 (Blocking-Puffer) 1,2 ml steriles neutrales Schafserum (NSS) 1,8 ml 10%iges Triton X-100 ad 60 ml Puffer 1 Puffer 3, pH 9,5 12,11 g Tris-HCl (121,14 g/mol) 5,84 g NaCl (MW: 58,44 g/mol) 10,17 g MgCl₂ x 6H₂O (MW: 203,3 g/mol) 1000 ml Agua bidest. ohne DEPC pH 9,5 mit 1 N HCl vor Zugabe von MgCl2 einstellen und steril filtrieren Puffer 4, pH 8 1,21 g Tris-HCl (MW: 121,14 g/mol) 0,37 g EDTA-Na2 (MW: 372,3 g/mol) 1000 ml Aqua bidest. **RNAse-Lösung** 10 ml 3 M NaCl 600 µl 1 M Tris, pH 8 120 µl 0,5 M EDTA, pH 8 49 ml Aqua bidest. Zusammen bei 37°C vorinkubieren 15 µl RNAse A kurz vor Gebrauch zugeben 10 µl RNAse T kurz vor Gebrauch zugeben Standard Natriumzitrat (SSC, standard saline citrate): Stammlösung (20x) 175,3 g NaCl (MW: 58,44 g/mol) 88,2 g Na-Citrat (Tri-Natrium-di-Hydrat)

800 ml Aqua bidest.

pH 7 mit 1 N HCl einstellen, auf 1000ml auffüllen

0,2 x SSC

1,2 ml 20 x SSC

ad 120 ml Aqua bidest.

2 x SSC

24 ml 20 x SSC

ad 240 ml Aqua bidest.

2 x SSC + 5 mM EDTA-Na₂

50 ml 20 x SSC

5 ml 0,5 M EDTA-Na₂

500 ml Aqua bidest.

6 x SSC + 45 %iges Formamid

36 ml 20 x SSC

54 ml 100 %iges Formamid

30 ml Aqua bidest.

TNF-α

Stocklösung

5 µg Lyophilisat in 50 µl sterilem Wasser gelöst

Inkubationslösung

1 μ l der Stocklösung in 10 ml DMEM-Medium lösen für 10 ng/ml TNF- α ; entspricht 10 ng/ml; 3 μ l in 3 ml DMEM-Medium; entspricht 100 ng/ml

Tris Buffered Saline (TBS): Stammlösung

60,57 g Tris(hydroxyl)-aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCI

pH auf 7,6 mit 1 N HCl einstellen

Tris Buffered Saline (TBS): Gebrauchslösung

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8 %ige NaCl-Lösung in Aqua dest.

pH auf 7,6 mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH einstellen

1 M TrisHCI, pH 8

12,11 g TrisHCl (MW: 121,14 g/mol)

100 ml Aqua bidest.

pH 8,0 mit konzentrierter HCI einstellen

10.2 Bezugsquellen für Antikörper, Einmalwaren, Kits und Reagenzien

Biochrom GmbH, Berlin

Poly-L-Lysine (MW > 300.000) 0,1 mg/ml, Kat.-Nr. L7240

Biotechne R&D Systems, Wiesbaden

Mouse Lipocalin 2/NGAL Antibody, Kat.-Nr.: 1857

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Midori Green Advance (Kat.-Nr. 617004)

Dako, Glostrup, Dänemark

Kaninchen anti-Glial Fibrillar Acidic Protein, Kat.-Nr.: Z0334

Schwein anti-Kaninchen IgG, Kat.Nr.: Z0196

Dianova GmbH, Hamburg

Esel IgG anti-Ziege IgG (H + L) Alexa-Fluor 488, Kat.-Nr. 705-545-147

Esel IgG anti-Kaninchen (H + L) Alexa-Fluor 467, Kat.-Nr. 711-605-152

Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf

DNA LoBind®-Tube, 1,5 ml, Kat.-Nr.: 022431021

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm; jetzt Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, USA

Acetanhydrid: Kat.-Nr.: 320102

Dextransulfat: Kat.-Nr.: 31395

Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, USA

Bovines Serum Albumin (IgG-frei, Protease-frei, Kat.-Nr.: 001-000-162

Kaninchen Peroxidase anti-Peroxidase, Kat.-Nr.: 323-005-024

R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen

Superfrost®Plus Objektträger

Marabu GmbH & Co. KG, Tamm

Marabu Fixogum Montagekleber, Kat.-Nr.: 4007751000743

Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt

Venno®Vet 1 super, Kat.-Nr.: 58200-06

Merck KGaA, Darmstadt

Entellan® in Toluen, Kat.-Nr.: 107960

Natronlauge Titrisol® 1 mol/I,1N, Kat.-Nr.: 1.09956.0001

Tri-Natriumcitrat, Kat.-Nr.: 1.11037.1000

Kaisers Glyceringelatine, Kat.-Nr.: 109242

Papanicolaous Lösung, Kat.-Nr.: 1092530500

Merck Millipore Ltd., Tullagreen

Amicon® Ultra – 0,5 ml Centrifugal Filter Devices, Kat.-Nr. UFC503096

PAA Laboratories, Pasching

Donor Horse Serum, Kat.-Nr.: B15-023

Gentamicin, 10 mg/ml, Kat.-Nr.: P11-004

Goat Serum, Kat.-Nr.: B11-035

PeproTech GmbH, Hamburg

Recombinant Murine TNF-a; Kat.-Nr.: 315-01A

Recombinant Murine IFN-y; Kat.-Nr.: 315-05

Recombinant Murine IL-4; Kat.-Nr.: 214-14

Qiagen GmbH, Hilden

RNase-Free DNase, Kat.-Nr.: 79254

RNeasy® mini kit, Kat.-Nr.: 74106

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

DIG-RNA-Labeling Kit, Kat.-Nr.: 11 175 025 910

T3-RNA Polymerase, Kat.-Nr.: 11 031 163 001

Anti-digoxigenin-AP FAb fragments, 150 U, Kat.-Nr.: 1093274

Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe

Ammoniaklösung \geq 25%, reinst, Kat.-Nr.: 5460.1 Calciumchlorid Dihydrat \geq 99 %, Ph.Eur., Kat.-Nr.: T885.2 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI): Kat.-Nr.: 6335.1 Deckgläser, 20 x 60 mm, Kat.-Nr.: H878 Diethylpyrocarbonat (DEPC), Kat.-Nr.: K028.2 Dimethylformamid \geq 99,5 %, zur Synthese, Kat.-Nr.: 6251.1 Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA); Kat.-Nr.: X986.3 Ethanol vergällt \geq 99,8 %, Kat.-Nr.: K928.2 Formamid deionisiert \geq 99,5 %, RNAse / DNAse-frei, Kat.-Nr.: P040.1 Kaliumchlorid (KCI) \geq 99 %, Kat.-Nr.: P017.2 Kaliumdihydrogenphosphat \geq 99 %, p.a., ACS, Kat.-Nr.: 3904.1 Magnesiumchlorid Hexahydrat \geq 99 %, p.a., ACS, Kat.-Nr.: 4627.3 Natriumchlorid (NaCl) \geq 99%, Ph.Eur., USP, Kat.-Nr.: P029.3 Natriumchlorid (NaCl) \geq 99 %, Ph.Eur., reinst, Kat.-Nr.: 8551.1 Natriumhydrogenphosphat ≥99 %, p.a., ACS, wasserfrei, Kat.-Nr.: P030.2

Natriumhydroxid ≥99 %, p.a., ISO, in Plätzchen, Kat.-Nr.: 6771.1

Natriumsulfat ≥99 %, Kat.-Nr.: 8631.2

Proteinase K lyophilisiert, ≥30 mAnson U/mg, Kat.-Nr.: 7528.4

RNase away®, Kat.-Nr.: A998.1

Roti®-Histol (Xylol-Ersatz), Kat.-Nr.: 6640.1

Salzsäure (HCI), rauchend, 37 %, Kat.-Nr. 2607.2

Triethanolamin, Kat.-Nr.: 6300.1

Tris, Pufferan[®]≥99,9%, p.a., Kat.-Nr.: 4855.2

Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran® p.a., ISO, stabilisiert, Kat.-Nr.: 8070.1

Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande

GLCTM Mounting Medium, Kat.-Nr. 1408

Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound, Kat.-Nr.: SA62550-01

SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn

Ethanol 96 %, vergällt, Kat.-Nr.: ETO-10000-96-1

Xylol reinst, Kat.-Nr.: XTR-10000-97-1

Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt

Mikrozid[®] AF liquid

Sensiva® wash lotion

Sempert Technische Produkt GmbH, Wien

Handschuhe semperguard nitrile powderfree

Serva Electrophoresis GmbH, Frankfurt

Triton[®] X-100, Kat.-Nr.: 37240

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (X-Phosphat), Kat.-Nr.: B6777

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid, Kat.-Nr.: D5637

Levamisol, Kat.-Nr.: L9756

Lipopolysaccharides (LPS) from Escherichia coli 0111:B4; Kat.-Nr.: L4391

Lithiumchlorid (8 M), Kat.-Nr.: L7026

Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), Kat.-Nr.: N6639

Paraformaldehyd, Kat.-Nr.: 158127

Piperazin-N,N`bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES), Kat.-Nr.: P3768

Proteinase, bacterial, Type XXIV, Kat.-Nr.: P8038

Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

DMEM, low glucose (1 g/l), mit Pyruvat und L-Glutamin, Gibco, Kat.-Nr. 31885023

Heat Inactivated Fetal Bovine Serum, Gibco, Kat.-Nr. 10500-064

Pen Strep, Penicillin: 10.000 U/m*l, Streptomycin: 10.000 µg/ml, Kat.-Nr. 15140-122

RiboLock[™] RNase inhibitor, Kat.-Nr.: EO0381

TOPO[®] TA Cloning[®] Kit

0,05 % Trypsin-EDTA (1x), Kat.-Nr. 25300-054

UltraPure[™] Agarose, Invitrogen, Kat.-Nr. 16500-500

Vector Laboratories, Burlingame, USA

Pferd anti-Ziege IgG (H+L), biotinyliert, Kat.-Nr.: BA-9500

Vectastain® ABC Kit Peroxidase Standard, Kat.-Nr.: PK-4000

10.3 Bezugsquellen für Geräte und Software

Bachofer GmbH, Reutlingen

Transluminator Typ IL-200-K

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl

Laminar Flow Sicherheitswerkbank BDK-SK 1500

Biomed GmbH, Oberschleißheim

Thermocycler 60

Biomers, Ulm

Synthese von Primern und Oligonukleotiden

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Multicycler® PTC 200

GelBond[®], Kat.-Nr.: 863746

DAKO Cytomation, Hamburg

DAKO-Pen®, Kat.-Nr.: S2002

Dunn Labortechnik, Asbach

Multitest-Objektträger®, 10 Kreise a 6 mm Durchmesser, Kat.-Nr. 40-410-06

Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf

Eppendorf-Zentrifuge C4515

Erlab D.F.S S.A.S, Köln

Mastermix-Box Captair® bio

GATC Biotech, Konstanz

Sequenzierung der PCR-Produkte für die Sondensynthese der ISH

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

Varioklav® Dampfsterilisator Typ 500EP-Z (RL)

Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach

Magnetrührer MR 2002

Vortexer Reax 2000

Heraeus Instruments, Hanau

Begasungsbrutschrank Typ B16

Labofuge 400R

Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen

Zentrifuge Universal Rotina 16A, Rotina 48 RC

Zentrifuge Mikroliter 2022

Ika® Works Incorporated, Wilmington

MS1 Minishaker

Kesla Pharma Wolfen GmbH, Greppin

Wofasept AHA

Kodak GmbH, Stuttgart

Geldokumentationssystem 1.0 "Digital Imaging"

LTF-Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg/Bodensee

UV Airclean Workstation DNA/RNA UV Cleaner Box UVC/T-M-AR

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Sterilisator Modell 200

Menzel Gläser, Braunschweig

Super Frost Plus® Objektträger, Kat.-Nr.: J1800 AMNZ

MWG Biotech, Ebersberg

Powersupply PPS 200-1D

Nikon GmbH, Düsseldorf

Mikroskop Eclipse 80i mit Kamera DS-Qi1Mc

Mikroskop Eclipse TS100

NIS-Elements Software BR 3.10, SP3

Orion Research Incorporated, Cambridge

pH-Meter Expendable ionAnalyzer EA920

Qiagen, Hilden

Rotor-Gene® Software 2.0.2

Thermocycler Rotor-Gene® Q

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

1,5 ml Kunststoffgefäßen

Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren

NucleoSEQ[®] spin columns, Kat.-Nr.: 740523.10

Sakura Finetek, Japan

Tissue-Tek® Coverslipper

Tissue-Tek[®] SCA™

Vilber Loumant, Torcy, Frankreich

UV-Transiluminator

10.4 Rohdaten

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	с	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	0	0	0
					II	0	0	0
1//25/12	ta	ta/ta		21	III	0	0	0
V433/12	ig	ig/ig	D0D V-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	ISH .cn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
					II	0	0	0
1/426/12	ta	ta/ta		21		0	0	0
V430/12	ig	ig/ig	BODV-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
					II	0	0	0
V438/12	ta	ta/ta		21	III	0	0	0
	ig	ig/ig	D0D V-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
					II	0	0	0
1/430/12	ta	ta/ta		21	III	0	0	0
V435/12	ig	ig/ig	D0D V-1	21	IV	0	0	Positive positive Zellen in 5 HPF 0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
					II	0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0
V60/13	ta	ta/ta		21	III	0	0	0
V00/13	ig	ig/ig	D0D V-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	2 eller III 9 HPF 0
					VI	0	0	0
					I	0	0	-
					II	0	0	-
1/1/11	ta	ta/ta	n inf	21		0	0	-
V 1/ 1 1	чy	ig/ig	n. inf	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tabelle 41: Ergebnisse des In-vivo-Teils (IHC und ISH)

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2 ^ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	0	0	-
					II	0	0	-
V3/11	ta	ta/ta	n inf	21	III	0	0	-
V0/11	-9	ig/ig		21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					<u> </u>	0	0	-
						0	0	-
V18/10	tg	ta/ta	n. inf.	21		0	0	-
	0	-33			IV	0	0	-
					V	0	0	-
		-			VI	0	0	-
					I	0	0	-
V19/10						0	0	-
	tg	tg/tg	n. inf.	21		0	0	-
					1V	0	0	-
					V VI	0	0	-
						0	0	_
						0	0	ECTI2-INITVAC es positive Zellen in 5 HPF - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
						0	0	
V22/10	tg	tg/tg	n. inf.	21	N/	0	0	
						0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V106/13	ta	ta/ta	mock	21		0	0	-
1.00/10	5	19,19	moon		IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					<u> </u>	0	0	-
V140/13	ta	ta/ta	mock	21		0	0	-
	-3	·9/ ·9	moon	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2 ^a	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	37	0	0
					II	72	1	0
V80/13	ta	ta/ta	BoDV-1	42	III	0	0	0
100,10	-9	(g) (g	BODVI	12	IV	9	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					<u> </u>	36	1	5
						114	3	42
V72/13	tg	tg/tg	BoDV-1	42		16	1	6
						43	0	15
					VI	0	0	0
					1	61	3	0
					ll	174	3	65
104/12	ta	ta /ta		40	111	12	1	7
V04/13	ıg	tg/tg	BODA-1	42	IV	4	1	2
					V	0	0	0
				VI	0	0	0	
					<u> </u>	59	3	13
						147	3	31
V76/13	tg	tg/tg	BoDV-1	42		42	1	4
					IV	49 0	1 0	0
					VI	0	0	construction s positive Zellen in 5 HPF 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 11 39 10 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
					1	37	1	11
					II	110	3	39
174/12	ta	ta /ta		40	III	23	1	10
V74/13	ig	ig/ig	BODV-1	42	IV	14	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					<u> </u>	52	2	0
						61	3	25
V130/13	tg	tg/tg	BoDV-1	49		15	1	/
					IV	⊃ ∩	0	0
					VI	0	0	0
					1	53	2	19
						60	3	42
						8	1	0
V131/13	tg	tg/tg	BoDV-1	49	IV	4	0	0
		-3, -9			V	0	0	0
					VI	0	0	0

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
						0	0	_
						0	0	-
V6/12	ta	ta/ta	n inf	42		0	0	-
10/12	-5	(g) (g		.2	IV	0	0	-
					V	0	0	ISH Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V127/11	tg	ta/ta	n. inf.	42		0	0	-
	0	-5-5			IV	0	0	-
					V	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V126/11	tg	tg/tg	n. inf.	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					II	0	0	-
1/125/11	ta	ta/ta	n inf	12		0	0	-
V125/11	ig	ig/ig	11. 1111.	42	IV	0	0	-
					V	0	0	äres positive 2 ^a Zellen in 5 HPF - <
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V120/11	tg	tg/tg	n. inf.	42	N/	0	0	-
						0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
					II	0	0	-
						0	0	-
V118/13	tg	tg/tg	mock	49	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					II	0	0	-
1/170/12	ta	ta/ta	mook	40		0	0	-
v1/9/13	ıy	ig/ig	THOCK	49	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					Ι	0	0	-
					II	0	0	-
V381/12	ta	ta/wt	BoDV-1	21	III	0	0	-
V001/12	-9	ig/wi	DODVI	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V404/12	tg	ta/wt	BoDV-1	21		0	0	-
		5			IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
					11	0	0	-
V437/12	tg	tg/wt	BoDV-1	21	III N/	0	0	-
					1V	0	0	-
					V \/I	0	0	_
						0	0	_
						0	0	-
						0	0	-
V441/12	tg	tg/wt	BoDV-1	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					II	0	0	-
			5 5) (4		===	0	0	-
V57/13	tg	tg/wt	BODA-1	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					ll	0	0	-
1/2/11	ta	talut	n inf	21	III	0	0	-
VZ/11	ig	ig/wi	n. m.	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					ll	0	0	-
V21/10	ta	ta/wt	n inf	21		0	0	-
121/10	-9	·9/ ····			IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					l	0	0	-
						0	0	-
V20/12	ta	ta/wt	n inf	21		0	0	-
	-5	.g,			IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V22/12	tg	tg/wt	n. inf.	21		0	0	-
	_	0			IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V21/12	tg	tg/wt	n. inf.	21		0	0	-
						0	0	_
					V	0	0	_
						0	0	
						0	0	-
						0	0	_
V108/13	tg	tg/wt	mock	21	IV	0	0	_
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V107/13	tg	tg/wt	mock	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	85	3	-
					II	118	3	-
	4-1		5 5) (4	40		13	1	-
V89/13	ıg	tg/wt	BODA-1	42	IV	13	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	93	1	-
					ll	134	3	-
1/86/12	ta	talut		42		14	1	-
V86/13	чy	ig/wi	000-1	42	IV	3	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	81	1	-
						49	1	-
1/06/13	ta	ta/wt	BoDV-1	12		15	0	-
V30/13	^{rg}	ig/wi	000 0-1	72	IV	28	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					<u> </u>	85	3	31
					II	144	3	30
\/00/13	ta	ta/wt	BoDV-1	12	III	15	1	7
V33/13	-9	ig/wi	000 0-1	72	IV	15	0	4
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					<u> </u>	0	0	0
					II	0	0	0
\/98/13	ta	ta/wt	BoDV-1	42	III	0	0	0
100,10	-9	ig/wi	DODVI	72	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	-
						0	0	-
V205/12	ta	ta/wt	n inf	42	III	0	0	-
1200/12	-5	.g,			IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	Zellen in 5 HPF - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
V202/12	tg	tg/wt	n. inf.	42		0	0	-
	_					0	0	-
					V	0	0	-
					1	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	_
V201/12	tg	tg/wt	n. inf.	42	IV	0	0	_
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
						Õ	0	-
					III	0	0	-
V200/12	tg	tg/wt	n. inf.	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					l	0	0	-
					II	0	0	-
V4/12	ta	ta/wt	n inf	42		0	0	-
•=	-5	.g,			IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V120/13	tg	ta/wt	mock	42		0	0	-
	, s	.			IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V121/13	tg	tg/wt	mock	42		0	0	-
		-				0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	0
						0	0	0
V382/12	wt	wt/wt	BoDV-1	21		0	0	0
						0	0	0
					V \/I	0	0	0
						0	0	0
						0	0	0
						0	0	0
V406/12	wt	wt/wt	BoDV-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					1	0	0	0
						0	0	0
						0	0	0
V440/12	wt	wt/wt	BoDV-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -
					VI	0	0	0
					Ι	0	0	0
						0	0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
				0.1		0	0	0
V59/13	wt	wt/wt	RODA-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2 ^ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
						0	0	0
						0	0	0
V112/13	wt	wt/wt	BoDV-1	21		0	0	0
					IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	-
						0	0	-
V95/11	wt	wt/wt	n. inf	21	N/	0	0	-
					IV V	0	0	_
					VI	0	0	-
					1	0	0	_
						0	0	-
					III	0	0	-
V97/11	wt	wt/wt	n. inf.	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					-	0	0	-
					II	0	0	-
1/00/11	t	had bad	n inf	21		0	0	-
V90/11	vvi	WU/WU	11. 1111.	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					l	0	0	-
						0	0	-
V99/11	wt	wt/wt	n. inf.	21		0	0	-
	-				IV N	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V100/11	wt	wt/wt	n. inf.	21		0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					<u> </u>	0	0	-
					<u> </u>	0	0	-
V110/13	wt	wt/wt	mock	21		0	0	-
		wt wt/wt	mock	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	U	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2 ^a	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	0	0	-
					II	0	0	-
V111/13	wt	wt/wt	mock	21	III	0	0	-
111110			moon	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					l	0	0	0
					II	0	0	0
177/40	t			40	Ш	0	0	0
V///13	WL	wt/wt	BODA-1	42	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
					II	0	0	0
1/02/12	wet	had had		40		0	0	0
V02/13	WL	wi/wi	BODV-1	42	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
						0	0	0
						0	0	0
V83/13	wt	wt/wt	BoDV-1	42		0	0	0
					IV	0	0	0
					V	0	0	0
						0	0	0
						0	0	0
						0	0	0
V87/13	wt	wt/wt	BoDV-1	21	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
						0	0	0
175/12	wit	had had		40		0	0	0
V75/15	VVL	WU WU	B0DV-1	42	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
						0	0	0
						0	0	0
V126/13	wt	wt/wt	BoDV-1	49		0	0	0
v126/13				-	IV	0	0	U
					V	0	0	0
1	1				VI	U	U	U

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	0	0	0
					II	0	0	0
1/120/13	wt	sart/sart	BoDV-1	10	III	0	0	0
V123/13	vvc		000 0-1	43	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
						0	0	-
						0	0	-
V106/11	wt	wt/wt	n inf	42	III	0	0	-
	-				IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V123/11	wt	wt/wt	n. inf.	42		0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V124/11	wt	wt/wt	n. inf.	42	N/	0	0	-
					10	0	0	-
					V \/I	0	0	-
						0	0	
						0	0	_
						0	0	-
V128/11	wt	wt/wt	n. inf.	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V5/12	wt	wt/wt	n. inf.	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					ll	0	0	-
1400/40				40	111	0	0	-
v122/13	wt	wt/wt	тоск	42	IV	0	0	
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					l	0	0	-
					II	0	0	-
V123/13	wt	wt/wt	mock	42		0	0	-
1120/10			moon	12	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V286/14	R1-k.o.	-/-	BoDV-1	21		0	0	-
					1V	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	_
						0	0	-
						0	0	_
V287/14	R1-k.o.	-/-	BoDV-1	21	IV	0	0	ISH Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
						0	0	-
	D4 1		5 5) (4			0	0	-
V288/14	R1-K.O.	-/-	BoDV-1	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					l	0	0	-
					II	0	0	-
1/280/1/	R1-ko	_/_	BoDV-1	21		0	0	-
V203/14	IXI K.O.	-/-	000 0-1	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V290/14	R1-k.o.	-/-	BoDV-1	21		0	0	-
						0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I II	0	0	-
					 	0	0	-
V238/12	R1-k.o.	-/-	n. inf	21	IV III	0	0	_
1200/12				-·	V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	ehirn- IHC		ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
V239/12	R1-k.o.	-/-	n. inf.	21	l	0	0	-
					II	0	0	-
					III	0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
V240/12	R1-k.o.	-/-	n. inf.	21	<u> </u>	0	0	-
						0	0	-
					III	0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
V302/14	R1-k.o.	-/-	n. inf.	21	I	0	0	-
					l	0	0	-
						0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
V303/14	R1-k.o.	-/-	n. inf.	21	l	0	0	-
					II	0	0	-
						0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
V312/14	R1-k.o.	-/-	mock	21		0	0	-
					ll	0	0	-
						0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
V313/14	R1-k.o.	-/-	mock	21		0	0	-
					II	0	0	-
					111	0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	
Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
---------	-----------	-----------------	-------------	-------	----------	--	--	--
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	0	0	-
					II	0	0	-
NOFCIAA		,		40		0	0	-
V256/14	RI-K.O.	-/-	BODA-1	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF Extra Lcn2 ⁱ I 0 0 II 0 0 II 0 0 II 0 0 III 0 0 IV 0 0 IV 0 0 IV 0 0 IV 0 0 V 0 0 II 0 0 II 0 0 II 0 0 V 0 0 III 0 0 V 0 0 V 0 0 III 0 0 IV 0 0 III 0 0 III 0 0 IV 0 0 III 0 0 III 0 0 III 0 0	0	-
					-	0	0	-
					II	0	0	-
V057/14	D1 ko	,		40	III	0	0	-
VZ57/14	R1-K.U.	-/-	BoDV-1	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					II	0	0	-
V258/14	R1-k.o.	_/_	BoDV-1	42	III	0	0	-
		,	BODVI	12	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V259/14	R1-k.o.	-/-	BoDV-1	21		0	0	-
						0	positive Silazellen in 5 HPF Lcn2 ^a Zellen i HPF 0 0 - 0 </td <td>-</td>	-
					V \/I	0		-
						0		_
						0	0	-
						0	0	-
V260/14	R1-k o	_/_	BoDV-1	12	IV	0	0	-
V200/14	111 10.01	-/-	000 0-1	72	V	0	0	-
					VI	0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
					II	0	0	-
105040	DAL	,		40	III	0	0	-
V259/12	K1-K.O.	-/-	n. inf.	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	0	0	-
					II	0	0	-
1/260/12	R1-ko	_/_	n inf	12	III	0	0	-
V200/12	IXI K.O.	-/-		72	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					0	0	-	
						0	0	-
						0	0	-
V328/14	R1-k.o.	-/-	n. inf.	42		0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
				-		0	0	-
V329/14	R1-k.o.	-/-	n. inf.	42		0	0	-
						0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
			n. inf.			0	0	-
V330/14	R1-k.o.	-/-		42		0	0	-
					1V	0	0	-
					V	0	0	_
						0	0	
						0	0	-
						0	0	_
V331/14	R1-k.o.	-/-	mock	42	IV	0	0	_
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V332/14	R1-k.o.	-/-	mock	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
					l	0	0	-
		,	D DV/	21	III	0	0	-
V45/14	R2-K.O.	-/-	BoDV-1		IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					l	0	0	-
					II	0	0	-
V46/14	R2-k o	_/_	BoDV-1	21		0	0	-
110/11		,	BOBY	2.	IV	0	0	-
					$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	-		
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	-
V47/14	R2-k.o.	-/-	BoDV-1	21		0	0	-
						0	0	-
					V	0	0	-
					1	0	0	-
					I 	0	0	-
						0	0	_
V48/14	R2-k.o/- B	BoDV-1	21	IV	0	0	_	
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					1	0	0	-
						0	0	-
	50.1					0	0	-
V49/14	R2-K.O.	-/-	BoDV-1	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					ll	0	0	-
1/211/12	R2-ko	1	n inf	21	III	0	0	-
VZ11/1Z	TNZ-K.U.	-/-		21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
					 	0	0	-
V216/12	R2-k.o.	-/-	n. inf.	21		0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I 	0	0	-
						0	0	-
V241/12	R2-k.o.	-/-	n. inf.	21	III IV	0	0	_
					V	0	0	
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					<u> </u>	0	0	-
					II	0	0	-
1/242/14	R2-k o	_/_	n inf	21	III	0	0	-
VZ7Z/14	112 10.0.	,		21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
			n. inf. 21 n. inf. 21 mock 21 mock 21 BoDV-1 42	VI	0	0	-	
			n. inf. n. inf. mock BoDV-1			0	0	-
					II	0	0	-
VOACIAA		,	a laf	04		0	0	-
VZ40/14	RZ-K.U.	-/-	n. m.	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					ll	0	0	-
V212/14 F	D2 ko	,		04		0	0	-
	RZ-K.U.	-/-	тоск	21	IV	0	0	-
					V	0	0	-
			n. inf. n. inf. mock BoDV-1 BoDV-1		VI	0	0	-
				k 21	I	0	0	-
					II	0	0 0 0 0 0 0	-
1/212/14	R2-ko	1	mock	21	III	0	0	-
VZ13/14	112 1.0.	-/-	HIOCK	21	IV	0	Lcn2 ^a Ze 0 0<	-
				I positive Gliazellen in 5 HPF zelluläre: Lcn2 ^a iii 0 0 iii 0 0 iii 0 0 iii 0 0 iiii 0 0 iiii 0 0 iv 0 0 v 0 0 v 0 0 v 0 0 v 0 0 v 0 0 v 0 0 v 0 0 v 0 0 v 0 0	0	-		
					areal Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF ze I 0 1 I 0 1 II 0 1 III 0 1 III 0 1 IV 0 1 IV 0 1 IV 0 1 II 0 1 II 0 1 II 0 1 IV 0 1 IV 0 1 II 0 1 II 0 1 II 0 1 III 0 1 </td <td>0</td> <td>-</td>	0	-	
					I	0	0	-
					II	0	0	-
VICAUAA		,		40		0	0	-
V04/14	rz-k.u.	-/-	B0DV-1	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					II	0	0	-
	R2-k o	_/_	BoDV-1	12		0	0	-
V03/14	1.2 1.0.	-/-	5000-1	42	IV	0	0	-
					V	0	0	-
		o. -/- n. ir o. -/- n. ir o. -/- mod o. -/- mod o. -/- BoD' o. -/- BoD'			VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2 ^a	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
						0	0	-
					II	0	0	-
V66/14	R2-k.o.	-/-	BoDV-1	42		0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	Dositive Gliazellen in 5 HPF Zellulares Lcn2 ^a Zellulares Zel 0 0 0	-	
				$ \begin{array}{ c c c c c c } & a \mbox{lear} & \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ $	0	-		
						0	0	-
V204/14	R2-k.o.	-/-	BoDV-1	21	N/	0	0	-
					10	0	0	-
					V	0	0	
						0	0	_
						0	0	-
						0	0	-
V205/14	R2-k o	_/_	BoDV-1	42	IV	0	0	-
V200/14	NZ N.O.	-/-	000 0-1	72	V	0	0	-
					VI	0	0	-
				<u> </u>	VI	0	0	-
					I	0	0	-
					II	0	0	-
1/200/12	R2-k o	1	n inf	12	III	0	0	-
V000/12	112 10.0.	-/-		72	IV	0	0	-
				n. inf. 42	V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
						0	0	-
V400/12	R2-k.o.	-/-	n. inf.	42		0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
						0	0	_
V401/12	R2-k.o.	-/-	n. inf.	42	IV	0	0	_
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
						0	0	-
					ll	0	0	-
1400/40	D2 k c	,	- inf	42		0	0	-
V402/12	rtz-k.0.	-/-	n. Int.		IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	С	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
						0	0	-
					 	0	0	-
V403/12	R2-k.o.	-/-	n. inf.	42		0	0	-
					IV	0	0	-
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I II	0	0	-
						0	0	_
V261/14	R2-k.o.	-/-	mock	42	IV	0	0	_
					V	0	0	-
					VI	0	0	-
					I	0	0	-
					II	0	0	-
V060/14	262/14 R2-k o	,	maak	40		0	0	-
V202/14	1\Z-K.U.	-/-	MOCK	42	IV	$\begin{array}{c ccccc} I & 0 & 0 \\ II & 0 & 0 \\ III & 0 & 0 \\ IV & 0 & 0 \\ V & 0 & 0 \\ VI & 0 & 0 \\ I & 49 & 2 \\ II & 46 & 2 \\ \end{array}$	-	
					V		-	
					VI	0	0	-
					I	49	2	0
					II	46	2	0
V67/14 ^b	R2-k.o.	_/_	BoDV-1	30		30	0	0
		,	BODVI	00	IV	Dositive Gliazellen in 5 HPF zellulares Lcn2 ^a 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 <	0	
			n. inf. mock mock BoDV-1 BoDV-1		V	53	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
					II	0	0	0
V63/14 ^b	R2-k.o.	_/_	BoDV-1	37	III	0	0	0
		,	DODVI	01	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0
					I	0	0	0
					II	0	0	0
V306/	R2-k.o.	,		40	III	0	0	0
14 ^b		-/-	B0DA-1	40	IV	0	0	0
					V	0	0	0
					VI	0	0	0

Tier	Stamm	Geneti-	Infektions-	Alter	Gehirn-	IH	с	ISH
		scher Status	status	(dpi)	areal	Lcn2- positive Gliazellen in 5 HPF	Extra- zelluläres Lcn2ª	Lcn2-mRNA- positive Zellen in 5 HPF
					I	0	0	0
					I 0 0 II 6 0 III 1 0	0		
V316/	R1-k.o.	,		00	Ш	1	1 0	0
14 ^c	-/-	-/-	BODA-1	29	IV	0	0	0
					V	V 0 0	0	0
					VI	0	0	0

dpi: Tage post infectionem (nach der BoDV-1-Infektion); HPF: high power field (Hauptgesichtsfeld, 400fache Vergrößerung); IHC: Immunhistologie; ISH: In-situ-Hybridisierung; Lcn2: Lipocalin-2; mock: mock infiziert; n. inf.: nicht infiziert; tg/tg: homozygot TNF-transgen; tg/wt: heterozygot TNF-transgen; wt/wt: homozygot Wildtyp; R1-k.o.: R1-knockout (-/-: homozygot); R2-k.o.: R2-knockout (-/-: homozygot) I: kraniales Striatum; II: kaudales Striatum; III: frontaler Cortex; IV: Hippocampus; V: Thalamus; VI: Cerebellum und Stammhirn

^a für extrazelluläres Lcn2 wurde der score angegeben (siehe auch: 4.4.1.2 und Abbildung 16) ^b vorzeitig verstorbene Tiere mit Verdacht auf bzw. Nachweis eines Krampfgeschehens (V67/14)

° vorzeitig aufgrund klinischer Symptomatik euthanasiertes Tier

Maus- linie und genet. Status	Präpara- tion	Infektions- status	Alter (dpi)	GFAP- positive Zellen	Lcn2- positive Zellen	BoDV-1- positive Zellen	Lcn2- und BoDV-1- positive Zellen
			7	200	2	3	0
	1		14	200	79	6	3
			21	200	85	5	4
		BoD\/_1	28	200	59	1	0
		000 0-1	7	200	2	1	0
	2		14	200	49	1	0
	-		21	200	35	1	0
Тg			28	200	60	0	0
(tg/tg)			7	200	0	0	0
	1		14	200	14	0	0
			21	200	68	0	0
		n inf	28	200	62	0	0
			7	200	2	0	0
	2		14	200	24	0	0
	-		21	200	positive Zellen positive Zellen BoDV-1 positive Zellen 2 3 0 79 6 3 85 5 4 59 1 0 2 1 0 2 1 0 2 1 0 2 1 0 49 1 0 35 1 0 60 0 0 62 0 0 2 0 0 2 0 0 2 0 0 44 0 0 47 0 0 47 0 0 47 0 0 10 1 0 7 2 1 2 2 0 10 1 0 2 2 0 10 1 0 <	0	
			28	200	47	0	0
			7	200	0	1	0
	1		14	200	3	1	0
			21	200	10	1	0
		BoDV-1	28	200	7	2	1
		000 1-1	7	200	2	2	0
	2		14	200	10	1	0
	2		21	200	20	2	2
Wt			28	200	45	5	1
(wt/wt)			7	200	0	0	0
	1		14	200	7	0	0
			21	200	4	0	0
		n inf	28	200	15	0	0
		11. 1111.	7	7	1	0	0
	2		14	14	6	0	0
	2		21	21	7	0	0
			28	28	11	0	0

Tabelle 42: Lcn2-Expression und BoDV-1-Infektion von murinen Astrozytenkulturen

Maus- linie und genet. Status	Präpara- tion	Infektions- status	Alter (dpi)	GFAP- positive Zellen	Lcn2- positive Zellen	BoDV-1- positive Zellen	Lcn2- und BoDV-1- positive Zellen
			7	200	0	7	0
	1		14	200	14	1	0
			21	200	20	1	0
		BoDV-1	28	200	12	1	0
			7	200	4	4	0
	2		14	200	10	2	1
R1-k o	2		21	200	28	1	0
(-/-)			28	200	13	3	0
			7	200	0	0	0
	1		14	200	0	0	0
	'		21	200	10	0	0
		n inf	28	200	13	0	0
			7	200	0	0	0
	2		14	200	2	0	0
	-		21	200	11	0	0
			28	200	8	0	0
			7	200	2	2	0
	1		14	200	11	1	0
			21	200	14	0	0
		BoDV-1	28	200	23	3	0
		DODVI	7	200	9	1	0
	2		14	200	11	3	0
	-		21	200	10	4	2
R2-k.o.			28	200	9	1	0
(-/-)			7	200	1	0	0
	1		14	200	5	0	0
			21	200	22	0	0
		n. inf.	28	200	26	0	0
			7	200	1	0	0
	2		14	200	3	0	0
			21	200	7	0	0
			28	200	2	0	0

Es wurden jeweils 200 Zellen gezählt;

GFAP: glial fibrillary acid protein (Astrozytenmarker); dpi: Tage nach der Infektion (post infectionem; gilt analog auch für Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden); Lcn2: Lipocalin-2; n. inf.: nicht infiziert; tg/tg: homozygot TNF-transgen; wt/wt: homozygot Wildtyp; R1-k.o.: R1-knockout (-/-: homozygot); R2-k.o.: R2-knockout (-/-: homozygot)

Maus-	Prä-	Infektions-	TNF-	h pi	GFAP-	Lcn2-	BoDV-1-	Lcn2- und
linie und	para-	status	Konz.		positive	positive	positive	BoDV-1-
genet.	tion		(ng/ml)		Zellen	Zellen	Zellen	positive
Status						10	1	Zellen
			0	24	200	10	1	0
			0	48	200	10	1	0
				/2	200	8	3	0
	1		10	24	200	35	2	0
	1		10	48	200	79	0	0
				12	200	70	1	0
			100	<u></u>	200	07	0	0
			100	40	200	75	1	0
		BoDV-1		24	200	75	1	0
			0	<u></u>	200	17	2	0
			0	40 72	200	36	2	0
				24	200	62	0	0
	2		10	48	200	110	3	2
	-		10	72	200	200 121 1	1	0
				24	200	56	1	0
			100	48	200	98	1	1
				72	200	132	3	2
Tg				24	200	21	0	0
(tg/tg)			0	48	200	9	0	0
			-	72	200	8	0	0
				24	200	100	0	0
	1		10	48	200	97	0	0
				72	200	69	0	0
				24	200	108	0	0
			100	48	200	86	0	0
				72	200	83	0	0
		n. inf.		24	200	12	0	0
			0	48	200	41	0	0
			Ū	72	200	13	0	0
				24	200	70	0	0
	2		10	<u></u> 18	200	120	0	0
	-		10	72	200	100	0	0
				12	200	109	0	0
			100	<u></u>	200	90	0	0
			100	48	200	122	0	U
1				72	200	131	0	0

Tabelle 43: Lcn2-Expression muriner Astrozytenkulturen nach TNF-α-Behandlung

Maus- linie und genet. Status	Prä- para- tion	Infektions- status	TNF- Konz. (ng/ml)	h pi	GFAP- positive Zellen	Lcn2- positive Zellen	BoDV-1- positive Zellen	Lcn2- und BoDV-1- positive Zellen
				24	200	36	1	0
			0	48	200	9	2	0
				72	200	8	2	0
				24	200	98	1	1
	1		10	48	200	80	1	1
				72	200	90	3	0
				24	200	92	2	2
			100	48	200	130	1	1
				72	200	101	10	10
		BODV-1		24	200	1	0	0
			0	48	200	3	0	0
				72	200	3	0	0
	2			24	200	74	0	0
			10	48	200	110	0	0
				72	200	74	0	0
				24 200 83 0	0	0		
			100	48	200	102	0	0
Wt				72	200	81	0	0
(wt/wt)				24	200	34	0	0
			0	48	200	21	0	0
				72	200	7	0	0
				24	200	121	0	0
	1		10	48	200	106	0	0
				72	200	87	0	0
				24	200	133	0	0
			100	48	200	74	0	0
		n inf		72	200	64	0	0
				24	200	2	4	0
			0	48	200	0	2	0
				72	200	12	2	1
				24	200	82	2	1
	2		10	48	200	80	6	1
				72	200	87	1	1
				24	200	87	1	1
			100	48	200	93	1	0
				72	200	94	1	0

Maus- linie und	Prä- para-	Infektions- status	TNF- Konz.	h pi	GFAP- positive	Lcn2- positive	BoDV-1- positive	Lcn2- und BoDV-1-	
Status	uon		(119/1111)		Zellell	Zenen	Zellell	Zellen	
				24	200	0	0	0	
			0	48	200	2	0	0	
				72	200	2	0	0	
				24	200	1	3	0	
	1		10	48	200	0	1	0	
				72	200	3	Lcn2- positive Zellen BoDV-1- positive Zellen 0 0 2 0 2 0 1 3 0 1 3 1 2 2 0 1 3 1 2 2 0 1 2 2 0 0 2 0 1 2 0 5 0 0 2 1 0 2 1 2 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 2 0 2 0 1 0 0 0 1 0 2 0 <tr< td=""></tr<>		
				24	200	2	4	0	
			100	48	200	2	2	0	
				72	200	2	2	1	
		BODV-1		24	200	0	0	0	
			0	48	200	2	0	0	
			72 200 1 2	2	0				
				24	200	0	5	0	
	2		10	48	200	0	0	0	
				72	200	2	1	0	
				24 200 0 2	0				
			100	48	200	1	3	0	
R1-k.o.				72	200	0	0	0	
(-/-)				24	200	1	0	0	
. ,			0	48	200	0	0	0	
				72	200	1	0	0	
				24	200	1	0	0	
	1		10	48	200	0	0	0	
				72	200	0	0	0	
				24	200	0	0	0	
			100	48	200	1	0	0	
		- 1-f		72	200	0	0	0	
		n. Inf.		24	200	1	0	0	
			0	48	200	2	0	0	
				72	200	2	0	0	
				24	200	0	0	0	
	2		10	48	200	0	0	0	
				72	200	0	0	0	
				24	200	0	0	0	
			100	48	200	0	0	0	
				72	200	0	0	0	

Maus- linie und	Prä- para-	Infektions- status	TNF- Konz.	h pi	GFAP- positive	Lcn2- positive	BoDV-1- positive	Lcn2- und BoDV-1-
genet.	tion		(ng/ml)		Zellen	Zellen	Zellen	positive
Status								Zellen
				24	200	0	1	0
			0	48	200	3	1	0
				72	200	2	3	0
				24	200	4	1	0
	1		10	48	200	3	2	0
				72	200	10	1	0
			100	24	200	4	2	0
			100	48	200	5	1	0
		BoDV-1		72	200	11	0	0
			0	24	200	0	0	0
			0	48	200	0	0	0
				12	200	0	1	0
	2		10	24	200	0	1	0
	2		10	48	200	1	4	0
				12	200	2	3	0
			100	24	200	2	2	0
				40	200	0	1	0
R2-k.o. (-/-)			0	24	200	2	0	0
				24 10	200	0	0	0
				40	200	 1	0	0
			10	24	200	3	0	0
	1			/8	200	3	0	0
				72	200	5	0	0
			100	24	200	6	0	0
				48	200	7	0	0
				72	200	6	0	0
		n inf		24	200	0	0	0
			0	48	200	1	0	0
			Ŭ	72	200	1	0	0
				24	200	0	0	0
	0		10	18	200	0	0	0
	2		10	72	200	0	0	0
				24	200	0	0	0
			100	48	200	0	0	0
				72	200	0	0	0

Es wurden jeweils 200 Zellen gezählt;

GFAP: glial fibrillary acid protein (Astrozytenmarker); hpi: Stunden nach Inkubation mit TNF-α (gilt analog auch für Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden); Lcn2: Lipocalin-2; n. inf.: nicht infiziert; tg/tg: homozygot TNF-transgen; wt/wt: homozygot Wildtyp; R1-k.o.: R1-knockout (-/-: homozygot); R2-k.o.: R2-knockout (-/-: homozygot)

Maus- linie und genet. Status	Präpara- tion	Infektions- status	Behandlung	GFAP- positive Zellen	Lcn2- positive Zellen	BoDV-1- positive Zellen	Lcn2- und BoDV-1- positive Zellen
			unbeh.		10	1	0
	1		IFN-γ +LPS		199	4	4
			IL-4		4	0	0
		BODV-1	unbeh.		7	1	0
	2		IFN-γ +LPS		195	1	1
Тg			IL-4		5	0	0
(tg/tg)			unbeh.		21	0	0
	1		IFN-γ +LPS		196	0	0
		n inf	IL-4		5	0	0
			unbeh.		12	0	0
	2		IFN-γ +LPS		192	0	0
			IL-4		5	0	0
			unbeh.	200	36	1	0
	1		IFN-γ +LPS	200	195	11	9
			IL-4	200	2	1	0
	2	BODV-1	unbeh.	200	2	4	0
Wt			IFN-γ +LPS	200	198	6	6
			IL-4	200	0	1	0
(wt/wt)		n. inf.	unbeh.	200	34	0	0
	1		IFN-γ +LPS	200	195	0	0
			IL-4	200	1	0	0
			unbeh.	200	1	0	0
	2		IFN-γ +LPS	200	190	0	0
			IL-4	200	1	0	0
	1	1 BoDV-1	unbeh.	200	0	0	0
			IFN-γ +LPS	200	146	1	1
			IL-4	200	2	0	0
			unbeh.	200	0	0	0
R1-k.o.	2		IFN-γ +LPS	200	182	1	0
			IL-4	200	0	2	0
(-/-)			unbeh.	200	1	0	0
	1	1 n. inf. 2	IFN-γ +LPS	200	138	0	0
			IL-4	200	0	2	0
			unbeh.	200	1	0	0
	2		IFN-γ +LPS	200	182	0	0
			IL-4	200	2	0	0

Tabelle 44: Lcn2-Expression muriner Astrozytenkulturen nach IFN- γ /LPS- oder IL-4-Behandlung

Maus- linie und genet. Status	Präpara- tion	Infektions- status	Behandlung	GFAP- positive Zellen	Lcn2- positive Zellen	BoDV-1- positive Zellen	Lcn2- und BoDV-1- positive Zellen
		BoDV-1	unbeh.	200	0	1	0
	1		IFN-γ +LPS	200	162	1	0
			IL-4	200	0	1	0
R2-k.o. (-/-)	2		unbeh.	200	0	0	0
			IFN-γ +LPS	200	155	4	3
			IL-4	200	0	1	0
	1	1 n. inf. 2	unbeh.	200	0	0	0
			IFN-γ +LPS	200	124	0	0
			IL-4	200	0	0	0
			unbeh.	200	0	0	0
	2		IFN-γ +LPS	200	186	0	0
			IL-4	200	1	0	0

Es wurden jeweils 200 Zellen gezählt;

GFAP: glial fibrillary acid protein (Astrozytenmarker); IFN-y: Interferon-y; IL-4: Interleukin-4; Lcn2: Lipocalin-2; LPS: Lipopolysaccharide; n. inf.: nicht infiziert; tg/tg: homozygot TNF-transgen; wt/wt: homozygot Wildtyp; R1-k.o.: R1-knock-out (-/-: homozygot); R2-k.o.: R2-knock-out (-/-: homozygot); unbeh.: unbehandelt, das heißt nur mit DMEM-Medium inkubiert

10.5 Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
Akt	Synonym für Proteinkinase B (PKB)
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BD	Borna Disease (Bornasche Krankheit)
внк	baby hamster kidney
bidest.	bidestilliert
BioStoffV	Biostoff-Verordnung
BiP	immunoglobuline binding protein
BoDV-1	Borna disease virus 1
BoDV-GP	Glykoprotein von BoDV-1
BoDV-M	Matrixprotein von BoDV-1
BoDV-N	Nukleoprotein von BoDV-1
BoDV-L	RNA-abhängige RNA-Polymerase von BoDV-1
BoDV-P	Phosphoprotein des BoDV-1
BoDV-X	X-Protein des BoDV-1
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl₂	Calciumchlorid
CT	threshold cycle
CCL	cc-chemokine ligand
cDNA	complementary DNA, komplementare DNA
cFLIP	caspase-8 homologue FLICE-inhibitory protein
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis
CXCL	c-x-motif chemokine
D	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindol
dpi	days post infectionem
DD	death domain

DEPC	Diethyldicarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Dr.	Doktor
dsDNA	doppelsträngige DNA
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EBL	endogenous borna-like elements
EBLN	endogenous borna-like nucleoproteins
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADD	Fas-associated death domain protein
FFPE	formalin-fixed and paraffin-embedded
FLIPL	${\it Fas-associated}\ death\ domain-like\ interleukine-1-\ \beta-converting\ enzyme-inhibitory\ protein$
Fw	forward
°C	Grad Celsius
g	Gramm
g	Maß der Erdbescheunigung
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GenTG	Gentechnikgesetz
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT-1	Glutamattransporter 1
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GOI	gene of interest
h	Stunde(n)
НВ	Hybridisierung
HO-1	Hämoxygenase 1
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HPF	High Power Field, Gesichtsfeld in der 400fachen Vergrößerung
iBA	inhibitor of κB
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ID ₅₀	infektiöse Dosis, die 50 % der inkubierten Zellen infiziert

IF	Immunfluoreszenz
IFN-ß	Interferon-beta
IFN-γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistologie (Synonym: Immunhistochemie)
Ікк	IĸB-kinase
IL	Interleukin
IN	intranukleär
iNOS	inducible nitric oxide synthase (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase)
IRF	interferon-regulatory factor
ISH	In-situ-Hybridisierung
ITR	inverted terminal repeat
IZ	intrazytoplasmatisch
kb	Kilobasen
КСІ	Kaliumchlorid
kDA	Kilo-Dalton
k.o.	knockout
Lcn2	Lipocalin-2
LCN2	humanes Lipocalin-2
LDL	Low Density Lipoprotein
LRP2	Low Density Lipoprotein receptor-related protein 2 (Synonym: Megalin)
LPS	Lipopolysaccharide
mМ	Millimolar
М	Molar
MBP	Myelin basic protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
МНС	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μΙ	Mikroliter
ММ	Mastermix
mRNA	messenger ribonucleic acid
Ν	Normal
NaCl	Natriumchlorid

NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NES	nuclear export signal (nukleäres Exportsignal)
NFL	neurofilament light polypeptide
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Ngal	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipoprotein (Synoym für Lipocalin-2)
NGF	nerve growth factor
NIK	NFκB-inducing kinase
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	reactive nitrogen species
NLS	nuclear localization signal (nukleäres Lokalisationssignal)
NR2B	Untereinheit des NMDA-Rezeptors
NSS	neutrales steriles Schafserum
nt	Nukleotide
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
24P3	Synonym für Lipocalin-2
24P3R	murine brain-type organic cation transporter; Rezeptor von Lipocalin-2
Р	Phosphat
p50	Polypeptid des NFkB-Proteins
p65	Polypeptid des NFkB-Proteins, siehe auch RELA
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Privatdozent
PDD	proventricular dilatation disease (neuropathische Drüsenmagenerweiterung)
PFA	Paraformaldehyd
РНВ	Prähybridisierung
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
РКВ	Proteinkinase B
pmol	Pikomol
Prof.	Professor
PRR	pathogen recognition receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog

qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RELA	nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit
RELB	Protein der NF-kappa-B-Familie
Rev	reverse
RIG-I	retinoic acid inducible gene l
RIP	receptor interacting protein
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
ROS	reactive oxygen species
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SIP24	superinducible protein 24
SSC	saline-sodium citrate buffer
ssDNA	single-stranded DNA (einzelsträngige DNA)
STAT	signal transducer and activator of transcription protein
SV-40	simian virus 40
TACE	TNF-α converting enzyme
TANK	Traf family member-associated NFκB activator
TBK-1	TANK-binding kinase-1
TBS	tris-buffered saline
tg	TNF-α-transgen
TGF-ß	transforming growth factor-ß
TLR	toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF-α _{mem}	Membran-gebundene Form von TNF- α
TNF-α _{sol}	Lösliche Form von TNF-α
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1
TNFR1-k.o.	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1-knockout
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor2
TNFR2-k.o.	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-2-knockout
TRADD	TNFR1 death domain protein
TRAF	TNF receptor associate factor
Ub	Ubiquitin

v. a.	vor allem
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEEV	venezuelan equine encephalitis virus
VSBV-1	variegated squirrel 1 bornavirus
WNV	west nile virus
wt	Wildtyp
x	-fach
Ym-1	$beta\mbox{-}N\mbox{-}acety\mbox{/}hexosaminidase\mbox{ oder auch: }chitinase\mbox{-}3\mbox{-}like\mbox{ protein}$
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZKBS	Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit

10.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomischer Aufbau, primäre Transkripte und posttranskriptional modifizierte mRNA von
BODV-1 (modifizient aus KERR (2010a), hach DE LA TORRE et al. (2002)12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des BoDV-1-Viruspartikels (nach POROMBKA (2006))15
Abbildung 3: Die Rolle von Lcn2 bei der phänotypischen Polarisierung von Astrozyten, nach JHA et al. (2016)
Abbildung 4: TNFR1 und TNFR2-Signalwege (nach NAUDE et al. (2011))
Abbildung 5: Schematischer Überblick des Tierversuches (GI 18/4 Nr. 12/2012) und der assoziierten Untersuchungsmethoden
Abbildung 6: Schema der In-vitro-Untersuchungen an primären murinen Astrozytenkulturen
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Transgen-Konstrukts der TNF-α-transgenen Mauslinie nach MARCHETTI et al. (2004)45
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts der TNFR1-k.oMäuse nach ROTHE et al. (1993)45
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts der TNFR2-k.oMäuse nach ERICKSON et al. (1994)46
Abbildung 10: Darstellung der Schnittebenen der Formalin-fixierten Mäusegehirne
Abbildung 11: Schema des Arbeitsablaufes der Sondensynthese61
Abbildung 12: Schematische Darstellung des pCR [™] 4-TOPO-Plasmidvektors (nach <i>user guide</i> des TOPO [®] Cloning [®] Kit for Sequencing; (<i>Quelle:</i>
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pcr4topo_map.pdf))64
Abbildung 13: Schema der TNF-α-Behandlung der Astrozytenkulturen75
Abbildung 14: Lcn2-Nachweis in verschiedenen Gehirnarealen eines BoDV-1-infizierten TNF-α- transgenen Tieres
Abbildung 15: Lcn2 in verschiedenen Gehirnarealen der homo- und heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse
Abbildung 16: Scoring-System zur Auswertung von sezerniertem Lcn2
Abbildung 17: Häufigkeit der verschiedenen <i>Scores</i> des sezernierten Lcn2 in den verschiedenen Gehirnarealen der homo- und heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse (42 und 49 dpi)88
Abbildung 18: Zerebrales Lcn2 eines verstorbenen BoDV-1-infzierten TNFR2-k.oTieres (V67/14)91
Abbildung 19: Endotheliales Lcn2 im Gehirn von einem vorzeitig verstorbenen BoDV-1-infiziertem TNFR2-k.oTier (V63/14)92
Abbildung 20: Lcn2 im Gehirn eines euthanasierten TNFR1-k.oTieres (V316/14)93

Abbildung 21: Immunhistologische Doppelmarkierung zum Nachweis von Lcn2 und GFAP94
Abbildung 22: Nachweis von Lcn2-mRNA95
Abbildung 23: Lcn2-mRNA-positive Astrozyten96
Abbildung 24: Lcn2-mRNA der BoDV-1-infizierten homozygot TNF-α-transgenen Mäuse98
Abbildung 25: Lcn2-mRNA der BoDV-1-infizierten heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse99
Abbildung 26: Nachweis von Lipocalin-2 und BoDV-1 in einer primären murinen Astrozyten von TNF- α-transgenen-Mäusen
Abbildung 27: Lcn2-Nachweis mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Astrozyten der Wildtyp-Mäuse 104
Abbildung 28: Lcn2-Nachweis mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Astrozyten der TNF-α-transgenen- Mäuse
Abbildung 29: Lcn2-Nachweis mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Astrozyten der TNFR1-k.o Mäuse
Abbildung 30: Lcn2-Nachweis mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Astrozyten der TNFR2-k.o Mäuse
Abbildung 31: Lcn2-Expression der nicht- und BoDV-1-infizierten Astrozyten der verschiedenen Mauslinien
Abbildung 32: BoDV-1-Infektionsrate der verschiedenen Astrozytenkulturen
Abbildung 33: Lcn2-Expression der TNF-α-behandelten Astrozyten von Wildtyp-Mäusen112
Abbildung 34: Lcn2-Nachweis in primären murinen Astrozyten nach TNF-α-Behandlung112
Abbildung 35: Lcn2-Expression der un- bzw. TNF-α-behandelten Astrozyten TNF-α-transgener Mäuse
Abbildung 36: Lcn2-Expression der un- bzw. TNF-α-behandelten Astrozyten TNFR1-k.o Mäuse114
Abbildung 37: Lcn2-Expression der un- bzw. TNF-α-behandelten TNFR2-k.oAstrozyten115
Abbildung 38: Anzahl Lcn2-positiver Astrozyten in den verschiedenen Astrozytenkulturen mit bzw. ohne TNF-α-Behandlung118
Abbildung 39: Lcn2-Expression in primären murinen Astrozytenkulturen nach IFN-γ-/LPS-Behandlung
Abbildung 40: Anzahl Lcn2-positiver Astrozyten in den verschiedenen Astrozytenkulturen mit bzw. ohne LPS/IFN-γ-Behandlung121
Abbildung 41: Anzahl Lcn2-positiver Astrozyten in den verschiedenen Astrozytenkulturen mit bzw. ohne IL-4-Behandlung

10.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primerpaare der qPCR	48
Tabelle 2: Reaktionsansatz der qPCR	48
Tabelle 3: Reaktionsschritte der qPCR	48
Tabelle 4: Verwendete Primer der Multiplex-PCR zum Nachweis des TNFR1, TNFR2 sowie de Neomycin-Resistance-Kassette	r 49
Tabelle 5: Reaktionsansatz der PCRs zur Bestimmung des TNFR1-Status	50
Tabelle 6: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR zur Bestimmung des TNFR2-Status	50
Tabelle 7: Reaktionsschritte der verschiedenen PCRs zur Genotypisierung der Mäuse	51
Tabelle 8: Übersicht der immunhistologisch untersuchten Wildtyp-Mäuse	54
Tabelle 9: Übersicht der immunhistologisch untersuchten homozygoten TNF-α-transgenen Mät	use54
Tabelle 10: Übersicht der immunhistologisch untersuchten heterozygoten TNF-α-transgenen M	läuse 54
Tabelle 11: Übersicht der immunhistologisch untersuchten TNFR1-k.oMäuse	
Tabelle 12: Übersicht der immunhistologisch untersuchten TNFR2-k.oMäuse	55
Tabelle 13: Übersicht über vorzeitig verstorbene oder euthanasierte Mäuse	55
Tabelle 14: In der immunhistologischen Untersuchung verwendete Antikörper	56
Tabelle 15: Übersicht über die Lcn2-mRNA als Ausgang der Generierung der RNA-Sonden so entsprechenden Oligonukleotide	<i>w</i> ie die 62
Tabelle 16: Reaktionsansatz der PCR zur Synthese der Sondenmatrize	63
Tabelle 17: Reaktionsschritte der PCR zur Synthese der Sondenmatrize	63
Tabelle 18: Reagenzien für die Ligation mit dem TOPO® TA Cloning® Kit	64
Tabelle 19: Reaktionsansatz der PCR zur Amplifikation der Sondenmatrizen aus dem Ligationsprodukt	65
Tabelle 20: Reagenzien der In-vitro-Transkription	66
Tabelle 21: Übersicht der mittels ISH untersuchten Wildtyp-Mäuse	67
Tabelle 22: Übersicht der mittels ISH untersuchten homozygoten TNF-α-transgenen Mäuse	68
Tabelle 23: Übersicht der mittels ISH untersuchten heterozygoten TNF-α-transgenen Mäuse	68
Tabelle 24: Übersicht der mittels ISH untersuchten vorzeitig verstorbenen oder euthanasierten	Mäuse 68
Tabelle 25: Primärantikörper der indirekten Immunfluoreszenz	77

ANHANG

Tabelle 26:	Sekundärantikörper und Kernfärbung der indirekten Immunfluoreszenz
Tabelle 27:	Parameter der Immunfluoreszenz-Auswertung79
Tabelle 28:	Tiere mit zerebraler Lcn2-Expression nach BoDV-1- Infektion83
Tabelle 29:	Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie und Gehirnareal auf den immunhistologischen Nachweis von Lcn2 in Gliazellen83
Tabelle 30:	Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen der homo- und heterozygoten TNF-α-transgenen Mäuse86
Tabelle 31:	Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie und Gehirnareal auf die Menge von sezerniertem Lipocalin-2
Tabelle 32:	Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-Sekretion in den verschiedenen Gehirnarealen der TNF-α-transgenen Mäuse
Tabelle 33:	Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie und des Gehirnareals auf die Zahl von Gliazellen mit Nachweis von Lcn2-mRNA97
Tabelle 34:	Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-mRNA-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten homozygot TNF-α-transgenen Mäuse
Tabelle 35:	: Statistische Untersuchung der Unterschiede hinsichtlich der Lcn2-mRNA-Expression in den verschiedenen Gehirnarealen der BoDV-1-infizierten heterozygot TNF-α-transgenen Mäuse (tg/wt)
Tabelle 36:	Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und Zeit auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten <i>in vitro</i>
Tabelle 37:	Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und Zeit auf die BoDV-1-Infektionsrate von Astrozyten bzw. auf die Zahl BoDV-1-infizierter Lcn2-positiver Astrozyten <i>in vitro</i>
Tabelle 38:	Vergleich zwischen den Astrozytenkulturen der TNF-α-transgenen Mäuse im Vergleich zu den Astrozyten der Wildtyp-, TNFR1-k.o sowie TNFR2-k.oMäuse: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion, Zeit und TNF-α auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten <i>in vitro</i> 119
Tabelle 39:	Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und LPS/IFN-γ auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten <i>in vitro</i> 122
Tabelle 40:	Vergleich der: Statistische Untersuchung der Einflüsse von Mauslinie, BoDV-1-Infektion und IL-4 auf die Rate Lcn2-positiver Astrozyten <i>in vitro</i>
Tabelle 41:	Ergebnisse des In-vivo-Teils (IHC und ISH)
Tabelle 42:	Lcn2-Expression und BoDV-1-Infektion von murinen Astrozytenkulturen

Tabelle 43: Lcn2-Expression muriner Astrozytenkulturen nach TNF-α-Behandlung	255
Tabelle 44: Lcn2-Expression muriner Astrozytenkulturen nach IFN-y/LPS- oder IL-4-Behandlung	J259

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mir auf dem Weg der Promotion zur Seite gestanden haben!

Meiner Doktormutter Frau Prof. Christiane Herden danke ich für die Überlassung des Themas, die Hilfestellung in verschiedensten wissenschaftlichen Fragen und ihr stets offenes Ohr.

Bei meiner langjährigen Kollegin und Freundin Dr. Manuela Hirz möchte ich mich für ihre große Unterstützung bedanken. Danke für die ganze Extra-Arbeit, die Du auf Dich genommen hast, um mir die verschiedenen Methoden beizubringen. Danke für Deine Hilfe bei verschiedensten Problemen und die zahlreichen guten Ideen!

Dr. Werner Hecht möchte ich sehr für die Bereitschaft zum Kopfzerbrechen über zunächst unlösbar erscheinende molekularbiologische Frage- und Problemstellungen und das Aufzeigen von Lösungswegen danken.

Silke Engel danke ich ganz herzlich für die Aufmunterung in Krisensituationen jeglicher Art, die musikalische Aufbesserung des Laboralltags und der Laune aller, für die vielen kleinen Gefallen und die netten Kaffeepausen!

Meinen Bürokolleginnen Jana, Leonie und Lena – samt tierischer Begleiter – möchte ich für die schöne Zeit danken – es hat viel Spaß mit euch gemacht!!!

Auch bei allen anderen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für Veterinär-Pathologie sowie Freunden und Freundinnen – der Übergang war meist fließend – möchte ich mich ganz herzlich bedanken: Sabrina, danke für deinen "Adlerblick" und den Beistand! Nadine, für deine andere Perspektive auf die Dinge! Daniel, für deine undramatische Art an die Dinge heranzugehen!

Melanie, für deine unbekümmerte Sicht auf die Welt!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren kontinuierliche moralische Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.







Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de www.doktorverlag.de

