

Aus dem

Institut für Physiologie der Universität Tübingen
Abteilung für Neurophysiologie

**Untersuchung der morphometrischen Veränderungen
kortikaler Mikroglia in mit *Trypanosoma brucei* infizierten
Mäusen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Richter, Cris
2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. O. Garaschuk
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Kahle

Tag der Disputation: 02.05.2024

Meiner AVV

Preisend mit viel schönen Reden
ihrer Länder Wert und Zahl
saßen viele deutsche Fürsten
einst zu Worms im Kaisersaal.

„Herrlich“, sprach der Fürst von Sachsen,
„ist mein Land und seine Macht.
Silber hegen seine Berge
wohl in manchem tiefen Schacht.“

„Seht mein Land in üpp'ger Fülle“,
sprach der Kurfürst von dem Rhein.
„Gold'ne Saaten in den Tälern,
auf den Bergen edler Wein!“

„Große Städte, reiche Klöster“,
Ludwig, Herr zu Bayern, sprach,
„schaffen, dass mein Land den Euern
wohl nicht steht an Schätzen nach.“

Eberhard, der mit dem Barte,
Württembergs geliebter Herr,
sprach: „Mein Land hat kleine Städte,
trägt nicht Berge silberschwer.“

Doch ein Kleinod hält's verborgen,
dass in Wäldern noch so groß
ich mein Haupt kann kühnlich legen
jedem Untertan in' Schoß.“

Und es rief der Herr von Sachsen,
der von Bayern, der vom Rhein:
„Graf im Bart, Ihr seid der Reichste!
Euer Land trägt Edelstein!“

Justinus Kerner – „Der reichste Fürst“ (1818)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	9
1.1 Relevanz neurologischer Erkrankungen.....	9
1.2 Anatomische Anmerkungen	11
1.2.1 Blut-Hirn-Schranke	18
1.2.2 Blut-Liquor-Schranke und Hirnhäute.....	21
1.2.3 Virchow-Robin-Räume	24
1.2.4 Zirkumventrikuläre Organe (ZVO).....	24
1.3 Mikrogliazellen	29
1.3.1 Historisches und Embryonalentwicklung	30
1.3.2 Beschriebene Funktionen von Mikrogliazellen	32
1.3.3 Morphologische Beschreibung von Mikrogliazellen	33
1.3.4 Wirkung peripherer Immunstimuli auf Mikrogliazellen.....	41
1.4 <i>Trypanosoma brucei</i> ssp. als Erreger der HAT	42
1.4.1 Klinischer Verlauf und Therapie der HAT	43
1.4.2 Lebenszyklus von <i>Tb ssp.</i>	46
1.4.3 Zellmorphologien von <i>Tb ssp.</i>	48
1.4.4 ZNS-Invasion im Rahmen einer Infektion mit <i>Tb ssp.</i>	50
1.4.5 Mikrogliazellen im Rahmen einer Infektion mit <i>Tb ssp.</i>	55
1.5 Zielsetzung der Arbeit	57
2 Material und Methoden	59
2.1 Material	59
2.1.1 Laborgeräte und Instrumente	59
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen.....	60
2.1.3 Primäre Antikörper	61
2.1.4 Sekundäre Antikörper	62
2.1.5 Software	62
2.1.6 Gewebe	63
2.2 Methoden	64
2.2.1 Immunhistochemische Verfahren	64
2.2.2 Zweiphotonenmikroskopie	66
2.2.3 Bildbearbeitung.....	69
2.2.4 Datenverarbeitung und -auswertung.....	73

2.2.5	Statistik	75
3	Ergebnisse	77
3.1	Zelldichte und Duplets	77
3.2	Anteil immigrierter Immunzellen	81
3.2.1	Korrigierte Zelldichte nach 30dpi	85
3.3	Morphologische Analyse	86
3.3.1	Somata	88
3.3.2	Fortsätze	91
3.3.3	Qualitative Morphologiebeschreibung von Mikrogliazellen unter quantitativen Gesichtspunkten	105
4	Diskussion	108
5	Zusammenfassung	117
6	Literaturverzeichnis	120
7	Anhang	139
7.1	Tabellen	139
7.2	Abbildungen	146
8	Erklärung zum Eigenanteil	155
9	Veröffentlichungen	156
10	Danksagung	157

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisation und schützende Strukturen des ZNS	12
Abbildung 2: Ventrikelsystem	15
Abbildung 3: Diffusionsbarrieren im ZNS	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke.....	20
Abbildung 5: Schematische topographische Darstellung der ZVO in mediosaggitaler Ansicht	28
Abbildung 6: Historisch beschriebene morphologische MG-Subtypen	32
Abbildung 7: Lebenszyklus Tb ssp.	48
Abbildung 8: Spots und Duplets	77
Abbildung 9: Zelldichte	78
Abbildung 10: Duplettdichte.....	80
Abbildung 11: Doppellabeling in Fiji	82
Abbildung 12: Säulendiagramme anti-TMEM-Zellen	83
Abbildung 13: Anteil anti-TMEM119-Zellen nach 30dpi.....	84
Abbildung 14: korrigierte Zelldichte nach 30dpi.....	85
Abbildung 15: Beispielbilder Imaris	87
Abbildung 16: Imaris Beispiel-Somata.....	88
Abbildung 17: Somagröße.....	89
Abbildung 18: Sphericity.....	91
Abbildung 19: Imaris Rekonstruktion	92
Abbildung 20: Zellrekonstruktion	93
Abbildung 21: Somakorrekturen	94
Abbildung 22: Korrektur der Fortsatzgesamtlänge	95
Abbildung 23: Fortsatzgesamtlänge	96
Abbildung 24: Imaris CHSO	97
Abbildung 25: Verhältnis Convex-hull-surface-object (CHSO) zu Surface object (SO).....	99
Abbildung 26: Fortsatzverzweigungspunkte und -endpunkte	100
Abbildung 27: Anzahl der Sholl-Intersections.....	103
Abbildung 28: area under the curve der Sholl-Intersections.....	104
Abbildung 29: Übersicht morphologischer Veränderungen im Infektionsverlauf	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte und Instrumente	59
Tabelle 2: Chemikalien.....	60
Tabelle 3: Primäre Antikörper.....	61
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper	62
Tabelle 5: Software	62
Tabelle 6: Kategorisierung	67
Tabelle 7: Vergrößerung	67
Tabelle 8: Image-Abmessungen.....	68
Tabelle 9: Einstellungen am Lasersetup	69

Abkürzungsverzeichnis

AUC	<i>area under the curve</i>
CHSO	<i>convex hull surface object</i>
ctrl	Kontrollgruppe
CX ₃ CR1	Chemokinrezeptor der Gruppe CX ₃ C, Nummer 1 (Fraktalkin). Wird von parenchymalen MG exprimiert.
dpi	<i>days post injection</i>
FO	<i>filament object</i>
HAT	Humane Afrikanische Trypanosomiasis
iba-1	<i>Ionized calcium binding adapter molecule 1</i>
infec	Infizierte Gruppe
LPA	<i>lateral preoptic area</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MG	Mikroglia(zelle)
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> (Phosphatpufferlösung)
PVR	periventrikuläre Region
ROI	<i>region of interest</i>
SO	<i>surface object</i>
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>Tbb</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
<i>Tbg</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>Tbr</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
TMEM119	<i>transmembrane protein 119</i>
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
ZVO	Zirkumventrikuläre Organe

1 Einleitung

1.1 Relevanz neurologischer Erkrankungen

Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) haben meistens einschneidende Folgen für die Betroffenen. Eenden sie nicht tödlich, gehen sie in aller Regel mit starken Beeinträchtigungen der Lebensqualität wie beispielsweise vorübergehenden oder auch anhaltenden sensomotorischen Ausfällen, Aphasie, Apraxie, Koma einher. Die Behandlung ist in den meisten Fällen rein symptomatisch. Manche Therapien, eine nachfolgende Pflege oder eventuelle Rehabilitationsmaßnahmen sind in aller Regel teuer, was Erkrankungen des ZNS nicht nur für die Patienten und ihre Angehörigen, sondern auch für Kranken-, Renten- und Pflegeversicherung und damit letztendlich auch für Politik und Steuerzahler bzw. die Sozialversicherungspflichtigen relevant macht. Laut Deuschl *et al.* (2016) lagen die Ausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung im Jahr 2004 allein für die Behandlung von Demenzerkrankungen in Deutschland bei über 5,5 Milliarden Euro.

Zu den zentralnervösen Erkrankungen gehören neben Infektionen bakterieller, viraler sowie protozoischer Erreger, auch zerebrovaskuläre (z. B. Schlaganfälle, arterielle Aneurysmen und Hirnblutungen), autoimmune (z. B. Optikusneuritis und Multiple Sklerose), neurodegenerative (z. B. Morbus Alzheimer, Morbus Huntington, idiopathisches Parkinson-Syndrom und weitere parkinsonverwandte und dementielle Erkrankungen), traumatische und (para-)neoplastische Erkrankungen oder Syndrome (Glioblastome oder sekundäre Tumore). Hinzu kommen beobachtete inflammatorische Veränderungen während des Alterungsprozesses oder metabolischer Erkrankungen, beispielsweise bei Diabetes Mellitus oder Adipositas (Nicolas, Lanzmann-Petithory und Vellas, 1999; Holloszy und Fontana, 2007; Witte *et al.*, 2009; Trepanowski *et al.*, 2011; Tremblay *et al.*, 2012; Anton und Leeuwenburgh, 2013; Golbidi *et al.*, 2017) oder bei psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen (Alboni *et al.*, 2017).

Bei nahezu all diesen (und noch vielen, teils nicht primär neurologischen, weiteren) Erkrankungen bzw. in all diesen Erkrankungsspektren konnten mittlerweile Veränderungen und/oder Reaktionen auf die pathologischen Prozesse der

Mikrogliazellen (MG) sowohl beim Menschen (Streit und Sparks, 1997; Streit *et al.*, 2005; Walker und Lue, 2015; Maxan *et al.*, 2018) als auch im Mausmodell nachgewiesen werden (Streit *et al.*, 2005; Lalancette-Hébert *et al.*, 2007; Hinwood *et al.*, 2013; Walker und Lue, 2015; Hellwig *et al.*, 2016; Alboni *et al.*, 2017; Voet, Prinz und van Loo, 2019). Auch gibt es starke Indizien dafür, dass sich Stoffwechselerkrankungen wie Adipositas und Diabetes Mellitus negativ auf die Gehirnhomöostase auswirken und die Aktivität und Morphologie von Mikrogliazellen beeinflussen (Lee, Seroogy und Mattson, 2002; Mattson und Wan, 2005; Patel *et al.*, 2005; Bachstetter *et al.*, 2015; Mattson, Longo und Harvie, 2017; Mattson *et al.*, 2018).

Laut den von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) veröffentlichten Leitlinien belaufen sich die Inzidenzen jeweils in Deutschland (jährlich pro 100.000 Einwohnern) für Demenzerkrankungen (inkl. Morbus Alzheimer) auf etwa 300 (Deuschl *et al.*, 2016), für das idiopathische Parkinsonsyndrom insgesamt auf 16 bis 20, je nach Alter und Geschlecht aber bis zu 1.800 (DGN, 2016), für Multiple Sklerose auf 16 bis 18 (Hemmer, 2021). Die genannten Inzidenzen sind als exemplarisch für drei große neurodegenerative bzw. autoimmune Erkrankungen zu verstehen. Die Aufzählung könnte für andere Erkrankungen fortgesetzt werden.

Infektionen des ZNS dagegen sind in Deutschland dank des Klimas und der fortschrittlichen Infrastruktur – insbesondere der medizinischen Versorgung – insgesamt eher selten bzw. selten tödlich, weltweit aber dennoch weiterhin ein großes Problem. Zunehmende Migration, Flüchtlingsbewegungen, Reisen im Rahmen der Globalisierung und der Klimawandel könnten die Fallzahlen in Deutschland zukünftig erheblich erhöhen. Wie von Figarella *et al.* (2020) einleitend beschrieben, leiden Milliarden von Menschen weltweit an protozoischen Infektionen, die jährlich etwa 500.000 Todesfälle bedingen. Dies beinhaltet u.a. die von dem protozoischen Erreger *Trypanosoma brucei ssp. (Tb)* ausgelöste Humane Afrikanische Trypanosomiasis (HAT; Grundlagen werden in einem späteren Kapitel erläutert), welche im Endstadium auch das ZNS befällt und nachweislich zu einer mikroglialen Reaktion führt (Chimelli, 2011; Maloba, Ngotho und Rajesh, 2012).

Dies alles impliziert, dass Mikrogliazellen in den physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in all diesen Erkrankungen eine Rolle spielen müssen. Erst wenn die Pathomechanismen dieser Erkrankungen und die immunologische Reaktion auf diese sowie alle weiteren homöostaseaufrechterhaltenden Aufgaben der MG verstanden wurden, kann auch eine nachhaltige, kausale Therapie für diese Erkrankungen entwickelt oder ggf. sogar an einer Prophylaxe gearbeitet werden.

Im Folgenden werden deshalb neben anatomischen Grundlagen und grundlegenden Kenntnissen zur mikroglialen Morphologie und (Patho-) Physiologie auch grundlegende Kenntnisse zur Afrikanischen Schlafkrankheit erläutert, die hier als Modell pathophysiologischer Prozesse herangezogen wurde, um eine quantifizierte Analyse der mikroglialen Morphologie im Infektionsverlauf vornehmen zu können.

1.2 Anatomische Anmerkungen

Das ZNS ist das vermutlich wichtigste Organsystem in Vertebraten. Es lenkt und koordiniert Bewegungen, verarbeitet Sinneswahrnehmungen und Lernprozesse, nimmt maßgeblichen Einfluss auf andere Organsysteme und ist der Sitz von Bewusstsein und Emotionen. Kurz gesagt: Alle Informationen des Körpers laufen hier zusammen, werden verarbeitet und gespeichert und ggf. wird darauf reagiert. Es initiiert und koordiniert Bewegungsabläufe. Zusätzlich ist es der Ort der ‚höheren Funktionen‘ der Großhirnrinde wie eben beispielsweise des Bewusstseins (Aumüller *et al.*, 2017; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022).

Das ZNS setzt sich zusammen aus dem Gehirn und dem Rückenmark. Ersteres befindet sich in der Schädelhöhle, zweiteres im Spinalkanal der Wirbelsäule. Hier wird bereits deutlich, wie wichtig es evolutionär gesehen war, das wichtigste der Organsysteme adäquat vor Schaden zu schützen: Das gesamte ZNS wird von knöchernen Strukturen umgeben. Hinzu kommt eine Ummantelung des gesamten ZNS mit den drei sogenannten *Meningen* (lat. für Hirnhäute). Von peripher nach zentral sind dies: die *Dura mater* (lat. für harte Hirnhaut; auch nur

Dura), die *Arachnoidea* (lat. für Spinnengewebshaut) und die *Pia mater* (lat. für weiche Hirnhaut; auch nur *Pia*). *Arachnoidea* und *Pia mater* werden häufig als *Leptomeninginx* zusammengefasst. Veranschaulicht wird dieser Aufbau in Abbildung 1. Hier findet sich auch der äußere Liquorraum (Subarachnoidalraum), der mit *Liquor (cerebrospinalis)* gefüllt ist. Neben der Versorgung mit Nährstoffen und dem Schutz vor Stößen führt das Umspülen des Gehirns mit *Liquor* dazu, dass das Gehirn in einer Art Wasserbett schwimmt, somit weich gelagert ist und durch den Auftrieb das effektive Eigengewicht auf das Parenchym vermindert wird (Korf und Schiebler, 2007; Aumüller *et al.*, 2017; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022; Trepel, 2022).

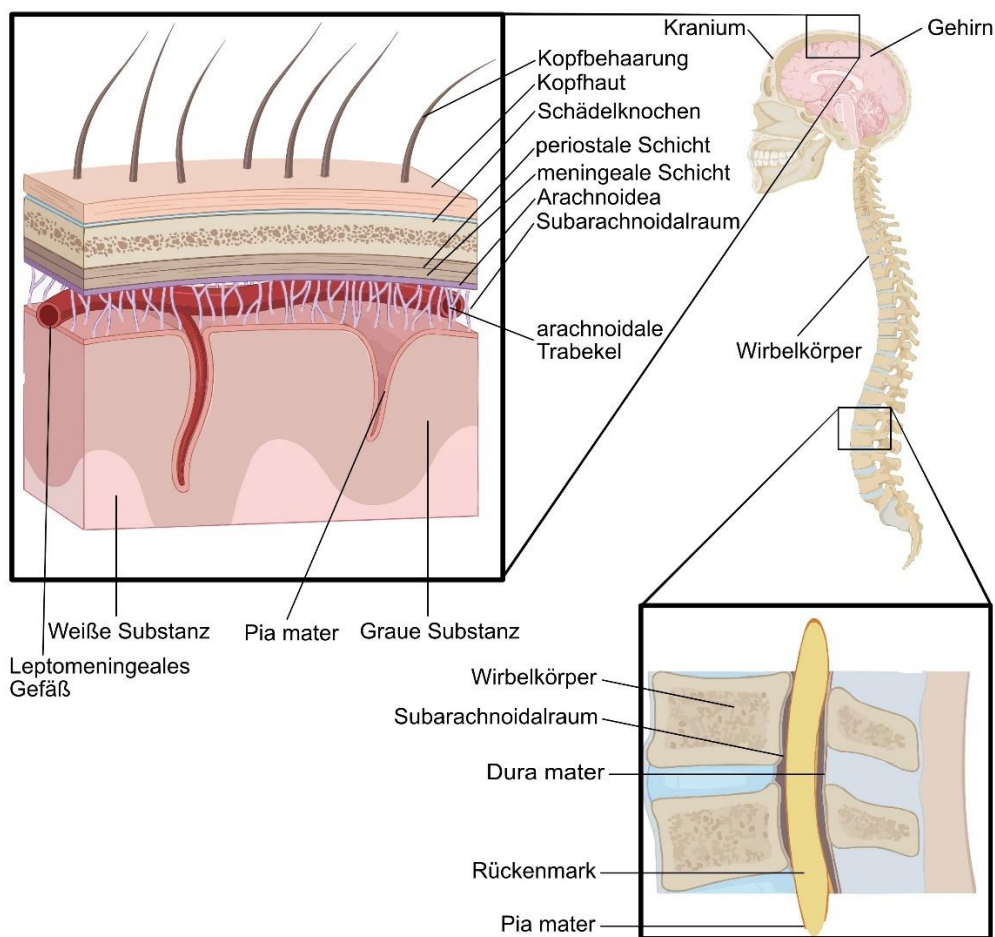


Abbildung 1: Lokalisation und schützende Strukturen des ZNS

In der Abbildung sind links schematisch die Lokalisation des ZNS in seinem knöchernen Panzer, rechts oben die ZNS-schützenden anatomischen Strukturen von peripher nach zentral im *Cranium* und rechts unten die gleiche Situation für den Spinalkanal dargestellt. Abbildung angelehnt an Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis (2020).

Die *Dura mater* ist eine ledrige, derbe Haut. Sie verfügt über ein meningeales – auf welches die *Arachnoidea* folgt – und ein periostales Blatt, welches dem Schädelknochen direkt anliegt. In den meisten Bereichen liegen diese Blätter direkt aneinander, in manchen Bereichen bilden sie aber Duplikaturen, in denen die sogenannten Gehirnsinus verlaufen. Diese *Sinus durae matris* dienen dem venösen Abfluss des Gehirns. In sie münden mittels Brückenvenen alle kleineren Venen des Gehirns (Aumüller *et al.*, 2017; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022; Trepel, 2022). Außerdem legen Veröffentlichungen der letzten Jahre nahe, dass ein meningo-lymphatisches System existiert. Diese Lymphgefäße verlaufen parallel zu den venösen Sinus in diesen Duplikaturen und drainieren in zervikale Lymphknoten (Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020).

Die *Arachnoidea* folgt direkt auf das meningeale Blatt der *Dura mater*. Unter ihr liegt der Subarachnoidalraum. Dieser verfügt über die namensgebenden spinnennetzartigen Ausläufer, die bis zur *Pia mater* ziehen. Sie werden als Trabekel bezeichnet. Der Subarachnoidalraum ist mit dem hirnversorgenden *Liquor* gefüllt. Durch den Subarachnoidalraum ziehen sich auch die sogenannten leptomeningealen Blutgefäße. Eine Diffusion zwischen *Liquor* und Blut wird durch eingeschränkte Permeabilität erschwert. Bei größeren Säugetieren lassen sich Zotten der *Arachnoidea* finden, die sich durch die *Dura mater* in die oberen Sinus ziehen und dort *Liquor* an das venöse Blut abgeben (Korf und Schiebler, 2007; Aumüller *et al.*, 2017; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022; Trepel, 2022).

Die *Pia mater* folgt unterhalb des Subarachnoidalraumes und liegt dem Gehirn direkt auf. Sie ist die letzte Struktur, die das Erreichen des eigentlichen Gehirnparenchyms verhindert. Unter der *Pia mater* folgt nämlich (zumindest im Bereich der Großhirnrinde) direkt die graue Substanz, in der die Zellkörper der Nervenzellen liegen. Die *Pia* folgt den gehirnversorgenden Arteriolen weit bis in die Nähe ihres Kapillarbett, ist im Verlauf aber immer rudimentärer ausgebildet (Korf und Schiebler, 2007; Aumüller *et al.*, 2017; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022; Trepel, 2022).

Die *Meningen* umhüllen nicht nur das Gehirn, sondern ziehen zusammen mit dem

Rückenmark durch das *Foramen magnum*. Hier trennt sich das äußere vom inneren Durablatt. Das äußere Durablatt liegt am Periost des Wirbelkanals an. Zwischen den beiden Durablättern findet sich im sogenannten Epiduralraum Fettgewebe mit einem dichten Venengeflecht. Die beiden Blätter vereinigen sich am Ende des Wirbelkanals wieder (beim adulten Menschen auf Höhe S2 – S3). Dem inneren Durablatt liegt die *Arachnoidea* direkt an. Im Bereich der Nervenwurzeln setzt sich die *Arachnoidea* in das *Perineurium* der Spinalnerven fort. Hier finden sich auch kleine Wurzeltaschen, in denen *Liquor* in das Lymphsystem abgegeben wird, sodass ein stetiger Lymphabfluss von zentral nach peripher stattfindet. Am kaudalen Ende des Rückenmarks wird der Duralsack von der *Arachnoidea* und *Dura* gebildet. Die *Pia mater spinalis* folgt dann als letzte Hirnhaut und bedeckt im Rückenmark die weiße statt der grauen Substanz, da anders als im Gehirn hier die weiße statt der grauen Substanz außen liegt. Auch im Rückenmark befindet sich im Subarachnoidalraum *Liquor* zum Schutz und zur Versorgung des Nervengewebes (Korf und Schiebler, 2007; Aumüller *et al.*, 2017; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022; Trepel, 2022). Aus dem Rückenmark treten die sogenannten Spinalnerven aus, die in die Peripherie ziehen und diese innervieren. Hier wird für gewöhnlich der Beginn des peripheren Nervensystems verortet (Korf und Schiebler, 2007; Aumüller *et al.*, 2017; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022). Die Versorgung des ZNS mit notwendigen Stoffen, wie beispielsweise Glukose und Sauerstoff, erfolgt über die arteriellen Blutgefäße und den *Liquor cerebrospinalis*. Der *Liquor* befindet sich im sogenannten Ventrikelsystem (innerer Liquorraum) und im Subarachnoidalraum (äußerer Liquorraum). Der innere Liquorraum setzt sich im Gehirn aus den beiden Seitenventrikeln (Ventrikel I und II), dem dritten und vierten Ventrikel (Ventrikel III und IV), dem *Aquaeductus mesencephali* sowie im Rückenmark aus dem Zentralkanal zusammen (s. Abbildung 2). Die Seitenventrikel stehen jeweils durch ein *Foramen interventriculare* mit dem dritten Ventrikel in Verbindung. Unterhalb der *Commissura posterior* geht der dritte Ventrikel in das *Aquaeductus mesencephali* über, welches wiederum den dritten mit dem vierten Ventrikel verbindet. Nach kaudal schließt sich an den vierten Ventrikel der Zentralkanal des Rückenmarks an. Im vierten Ventrikel steht der innere Liquorraum mit dem

äußeren über die *Apertura mediana* und zwei *Aperturæ laterales* in Verbindung und ermöglicht so den Austausch, Abfluss und die Erneuerung des *Liquors* im bzw. über den äußeren Liquorraum (Aumüller *et al.*, 2017; Schünke, Schulte und Schumacher, 2022; Trepel, 2022).

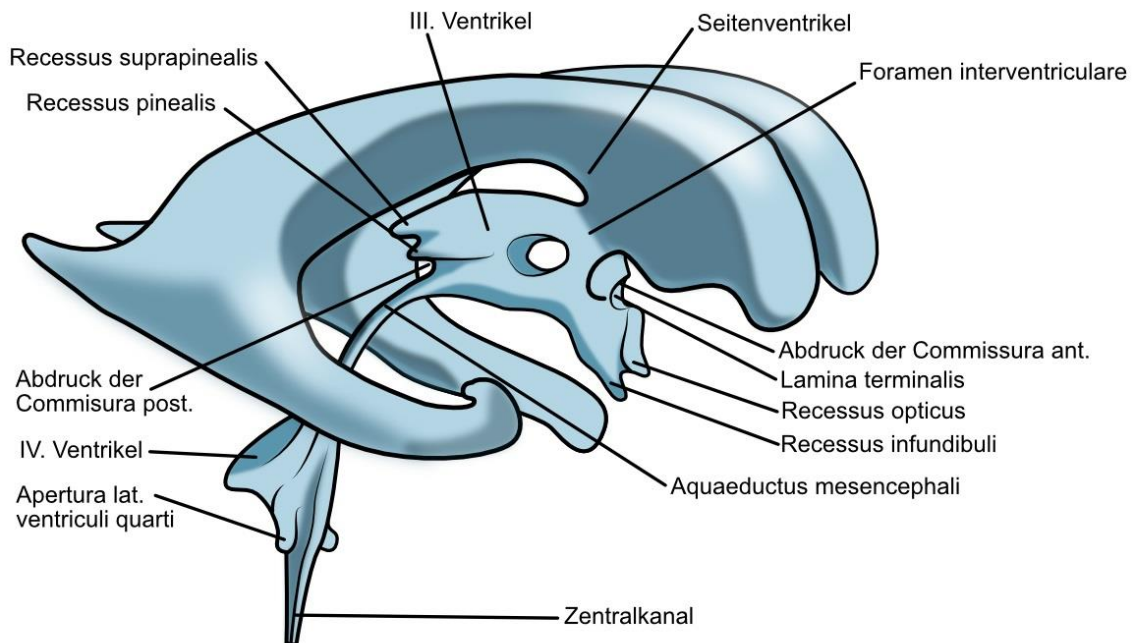


Abbildung 2: Ventrikelsystem

Die Abbildung zeigt das Ventrikelsystem des *Craniums* beim Menschen; der Zentralkanal als Liquorraum des Rückenmarks ist zervikal abgeschnitten. Gezeigt werden außerdem Berührungspunkte angrenzender anatomischer Strukturen des umliegenden Nervengewebes, beispielsweise der *Commissurae anterior et posterior*. Abbildung angelehnt an Korf und Schiebler (2007).

Der innere Liquorraum wird von einer einschichtigen Ependymzellschicht ausgekleidet. Laut Trepel (2022) gehören die Ependymzellen zu den Gliazellen und sind iso- bis hochprismatische Epithelien. Sie sind mit ihren Mikrovilli am Transport des *Liquor cerebrospinalis*, welcher von den *Plexus choroidei* der vier Ventrikel gebildet wird, beteiligt und bilden auch geringe Mengen des *Liquors* selbst. Bei den *Plexus choroidei* handelt es sich um stark vaskularisiertes Bindegewebe, auf dem spezialisierte Ependymzellen sitzen, die auf die Produktion von *Liquor* spezialisiert sind. Da die *Plexus choroidei* anatomischen Bezug zum dritten und vierten Ventrikel sowie zu einem gefensterten Kapillarendothel besitzen, werden sie manchmal zu den Zirkumventrikulären Organen (ZVO) gezählt. Allerdings verfügen sie über keine eigenen Neurone, wie die restlichen ZVO. Beim *Liquor*

handelt es sich um eine klare, farblose sowie sehr protein- und zellarme Flüssigkeit. Neben den bereits beschriebenen Zirkulations- und Resorptionsmechanismen existiert außerdem eine parazelluläre Passage des *Liquors* an den Ependymzellen vorbei in die interstitielle Flüssigkeit. Die Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke verhindern allerdings einen Übertritt in das Gehirnparenchym (Duvernoy und Risold, 2007; Korf und Schiebler, 2007; Trepel, 2022).

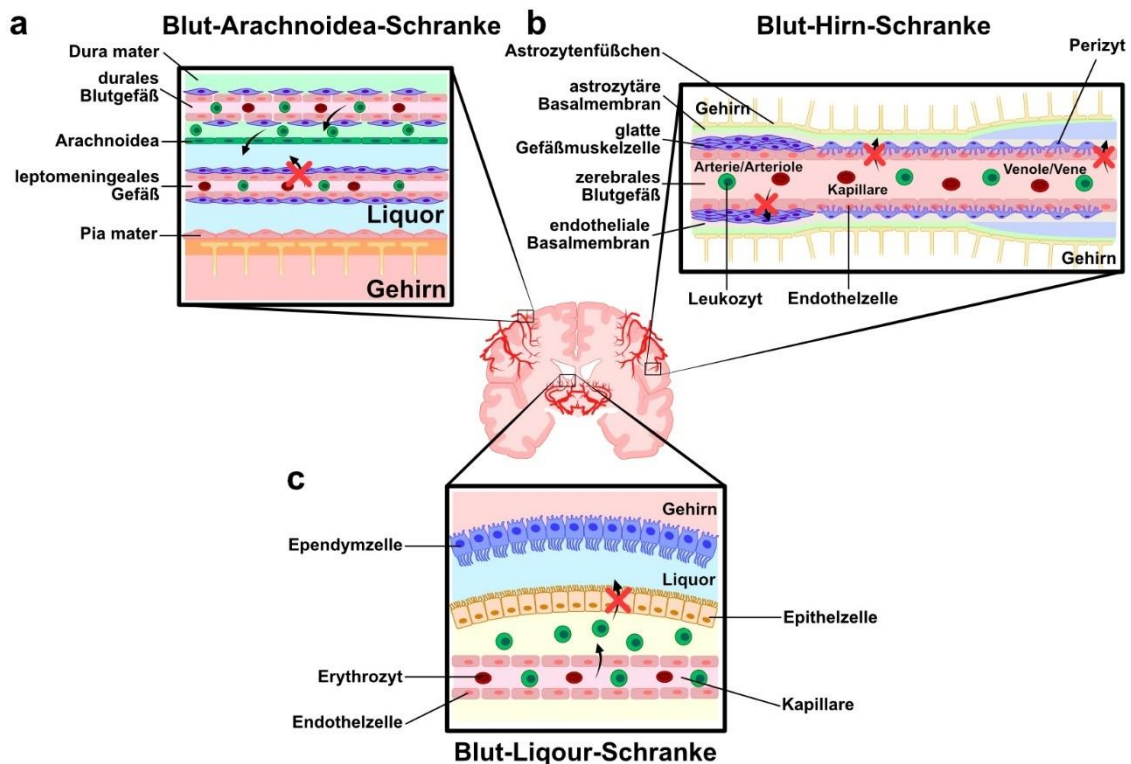


Abbildung 3: Diffusionsbarrieren im ZNS

Die Abbildung veranschaulicht schematisch die drei Barrieren im ZNS, die das Gehirnparenchym von der Peripherie abgrenzen sollen: (a) die Blut-Arachnoidea-Schranke, (b) die Blut-Liquor-Schranke und (c) die Blut-Hirn-Schranke. Die Blut-Arachnoidea-Schranke besteht aus dem Epithel der *Arachnoidea* und trennt den *Liquor cerebrospinalis* im Subarachnoidalraum (zentral) von den weiter peripher liegenden Strukturen wie beispielsweise den *Sinus durae matris* (a). Im Subarachnoidalraum verlaufen *leptomeningeale* Blutgefäße, die wie die anderen intrazerebral verlaufenden Gefäße über eine Blut-Hirn-Schranke verfügen. Die Blut-Hirn-Schranke wird von den Endothelzellen der Blutgefäße und ihren besonders dichten Zell-Zell-Kontakten gebildet und trennt das intravasale Blut vom Gehirnparenchym (c). Die Blut-Liquor-Schranke wird von Epithelzellen der *Plexus choroidei* gebildet. Sie trennen die *Plexus choroidei* vom inneren Liquorraum (b). RBC: Erythrozyt; VSMC: glatte Gefäßmuskulatur. BBB: Blut-Hirn-Schranke. BMB: Blut-Arachnoidea-Schranke. BCSFB: Blut-Liquor-Schranke. CSF: *Liquor cerebrospinalis*. Abbildung angelehnt an Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis (2020).

Es wird deutlich, wie wichtig es evolutionär ist bzw. war, das ZNS vor Schaden zu schützen. Diese Schädigung kann allerdings nicht nur auf physikalischem Wege geschehen, sondern auch auf pharmakologischem oder biochemischem

Wege. Deshalb ist es außerordentlich wichtig, dass die Homöostase im ZNS streng überwacht und reguliert wird.

An der Aufrechterhaltung der Homöostase sind daher die folgenden Barrieren maßgeblich beteiligt, deren Aufgaben darin bestehen, dass kein unkontrollierter Übertritt von Substanzen jeglicher Art aus dem Blut in das Gehirnparenchym möglich ist. Im ZNS sind drei dieser Barrieren beschrieben, die entsprechend auch den Übertritt von Erregern, Proteinen, Antikörpern, Immunzellen oder Medikamenten aus dem Blut ins Gehirnparenchym erschweren oder behindern (s. Abbildung 3): die Blut-Hirn-Schranke, die Blut-Liquor-Schranke und die Blut-Arachnoidea-Schranke. Die duralen Blutgefäße weisen Fenestrierungen auf, so dass eine solche Barriere zwischen dem Duralraum und dem äußeren Liquorraum nötig ist. Diese Aufgabe wird vom Epithel der *Arachnoidea* übernommen, welches das Blut vom subarachnoidalen *Liquor* trennt. Die Blut-Liquor-Schranke bildet dagegen die Barriere des inneren Liquorraums zwischen den Endothelzellen des *Plexus choroideus*, die den *Liquor* in die Ventrikel sezernieren, und den fenestrierten Blutgefäßen, die die *Plexus choroidei* mit Blut versorgen. Die Blut-Hirn-Schranke wiederum trennt das Blut der versorgenden Blutgefäße vom Gehirnparenchym und befindet sich überwiegend in den Blutgefäßen des Subarachnoidalraums (Abbott, Rönnbäck und Hansson, 2006; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Trepel, 2022). Interessanterweise liegen Neurone meist nicht mehr als 8 bis 20 µm von einer Kapillare entfernt, während die Entfernung zum Liquorraum auch Milli- oder Zentimeter betragen kann, was einem drei- bis vierstelligen Faktor entspräche (Abbott, Rönnbäck und Hansson, 2006).

Defizienzen im Bereich der genannten Barrieren sind charakteristisch für eine Reihe an pathologischen ZNS-Veränderungen, wie beispielsweise nach Traumata oder bei Neurodegeneration (Zlokovic, 2008). Laut Duvernoy und Risold (2007) gibt es allerdings auch ohne pathologische Prozesse im Bereich der ZVO abschnittsweise weniger strikt ausgebildete Barrieren. Auf die unterschiedlichen Barrieren und die ZVO wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2.1 Blut-Hirn-Schranke

Die sogenannte Blut-Hirn-Schranke besteht im eigentlichen anatomischen Sinne lediglich aus den mittels *tight junctions* sehr eng miteinander verbundenen Endothelzellen der Blutgefäße, insbesondere der Kapillargefäße. Sie bilden die eigentliche Diffusionsbarriere zwischen Blut und Gehirnparenchym (einschließlich der interstitiellen Flüssigkeit) und verhindern weitestgehend eine parazelluläre Passage (Trepel, 2022). Kleinere Gase wie N₂, O₂, CO₂ oder Xe und Moleküle mit einer Masse < 18 Da bzw. mit weniger als 10 Wasserstoffbindungen können allerdings frei diffundieren, dazu gehören u.a. auch lipophile Substanzen wie Barbiturate oder Ethanol (Abbott, Rönnbäck und Hansson, 2006). Die Wand der Kapillargefäße besteht aus einem durchgängigen, einschichtigen Endothel. Dieses besitzt – anders als beispielsweise in der Leber oder der Milz und ausgenommen der ZVO (s. 1.2.4) – keine Poren oder Fenster. Des Weiteren verfügen die Endothelzellen über Kanalproteine zur strikten Regulierung der Stoffaufnahme und -abgabe in das bzw. aus dem ZNS. Die Ionenkonzentrationen wie beispielsweise K⁺ werden in einem engen Bereich gehalten; Ionen mit zwei Ladungen, etwa Ca²⁺ und Mg²⁺, können kaum frei durch die Blut-Hirn-Schranke diffundieren. Den Transport größerer oder geladener Teilchen vermitteln Transportmoleküle, insbesondere um die Konzentration wichtiger Substanzen wie beispielsweise Glukose zu optimieren und (neuro-)toxische Substanzen zu eliminieren (Serlin *et al.*, 2015). Um dieser Funktion gerecht werden zu können, sind die Kapillarendothelien ähnlich peripherer Epithelzellen apikal und basolateral gegliedert (Betz, Firth und Goldstein, 1980; van Itallie und Anderson, 2006), besitzen aber einen höheren Anteil an Mitochondrien, um mittels aktiven Transportes unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) die Konzentrationsgradienten aufbauen zu können (Oldendorf, Cornford und Brown, 1977; Serlin *et al.*, 2015). In den Reviews von Abbott *et al.* (2006; 2010) wird ausführlich auf Transportwege und molekularen Aufbau der Blut-Hirn-Schranke eingegangen. Abbott *et al.* (2006) listet außerdem einige Moleküle auf, die die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke herabsetzen, darunter: ATP, Bradykinin, Histamin, Serotonin, Glutamat, Adenosin, Prostaglandine, Leukotriene, Interleukine (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-6, Tumornekrosefaktor TNF- α , freie Radikale und NO.

Die folgenden Ausführungen zur Blut-Hirn-Schranke basieren auf dem Review von *Sharif et al. (2018)*, die Primärliteratur ist diesem Review zu entnehmen:

Sharif et al. (2018) führen neben dem Kapillarendothel weitere unerlässliche Komponenten auf, die maßgeblich an beispielsweise der Angiogenese und Regulation von Homöostase und Durchblutung des ZNS sowie Aufrechterhaltung und Modulation der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Diese weiteren Komponenten scheinen auch dafür (mit-)verantwortlich zu sein, dass die besonders dichten Zell-Zell-Abstände durch die *tight junctions* in der Blut-Hirn-Schranke überhaupt erst ausgebildet werden. Zu diesen weiteren Komponenten gehören Perizyten, Immunzellen und Astrozyten sowie die Basalmembran und die Extrazellulärmatrix. Der Raum zwischen Basalmembran und den Neuronen wird Virchow-Robin-Raum genannt. In diesen befinden sich interstitielle Flüssigkeit sowie perivaskuläre Immunzellen (s. Abbildung 4). All diese Strukturen werden zusammen mit den zugehörigen Neuronen auch als Neurovaskuläre Einheiten bezeichnet.

An der abluminalen Seite werden die Endothelzellen unvollständig von Perizyten bedeckt. Diese sind etwa in einem Verhältnis von 3:1 (Endothelzelle zu Perizyt) in die Basalmembran eingebettet. Trotz der Bindungen mittels N-Cadherin, *gap* und *tight junctions* haben die Perizyten keinen vollumfänglichen Kontakt zu den Endothelzellen. Mittels langen Membranerweiterungen regulieren sie den Blutfluss. Obwohl sie nicht die komplette Endothelzell-Schicht bedecken, werden sie nach Beschädigung oder Entfernung schnell wieder erneuert, was darauf hinweist, dass sie für die Blutzirkulation im ZNS und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke wichtig und außerdem für die Angiogenese und Wartung der Blut-Hirn-Schranke-Permeabilität relevant sind.

Astrozyten gehören zu den Gliazellen, welche das Äußere der Basalmembran und der Perizyten mit ‚füßchenähnlichen‘ Ausläufern ihrer Zellmembran ummanteln. Sie stehen durch einen Dystroglycan-Dystrophin-Komplex mit der Basalmembran in Kontakt, welcher mit Agrin innerhalb der parenchymalen Basalmembran interagiert. Sie beteiligen sich an der Blut-Hirn-Schranke, indem sie die Immunregulation und die Überwachung der elektrochemischen Aktivität und des parenchymalen Wasser- und Metabolitenhaushaltes beeinflussen. Auch eine

Beteiligung in der embryonalen Entwicklung wird diskutiert (Noell *et al.*, 2011; Reemst *et al.*, 2016).

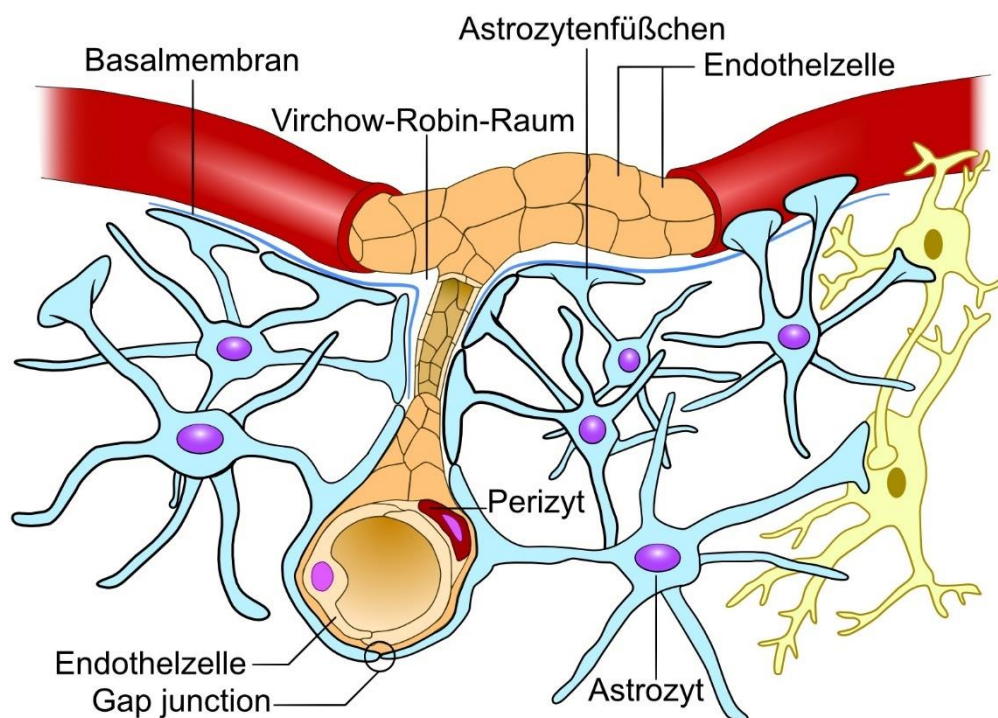


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke

In der Abbildung sind schematisch die Blut-Hirn-Schranke bildenden Endothelzellen sowie umgebende Strukturen wie die Virchow-Robin-Räume, die *Pia mater*, die *Glia limitans*, Peri- und Astrozyten und Neurone des Gehirnparenchyms dargestellt. Angedeutet sind auch Transportproteine der Blut-Hirn-Schranke (Glucosetransporter, K⁺-Kanal und Aquaporin4-Kanal). Besonders hervorzuheben sind hier der Virchow-Robin-Raum zwischen Endothelzellen und der *Pia mater* sowie die direkt zentral der *Pia mater* anliegenden ‚Astrozytenfüßchen‘. Abbildung angelehnt an Sharif *et al.* (2018).

Im Bereich der Blut-Hirn-Schranke finden sich perivaskuläre und meningeale Makrophagen sowie Mikroglia (MG). Die ersten beiden entstammen der monozytären Zelllinie. Die perivaskulären Makrophagen findet man für gewöhnlich auf der abluminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke, insbesondere innerhalb der Virchow-Robin-Räume. Ähnlich peripherer Makrophagen phagozytieren sie zelluläre Ablagerungen, Pathogene etc. Sie lassen sich entsprechend ihrer Namensgebung in der näheren Umgebung von Blutgefäßen (perivaskulär) bzw. in den Hirnhäuten (meningeal) finden. Im Bereich der *Dura mater* sind neben den meningealen Makrophagen außerdem eine große Spannweite weiterer Immunzellen (einschließlich Natürlicher Killerzellen und T-Zellen) bzw. im Bereich der *Pia mater* lediglich T-Zellen zu finden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass

perivaskuläre und meningeale Makrophagen auf periphere Immunaktivierung reagieren und somit maßgeblich an der Weiterleitung peripherer Stimuli an ZNS-Makrophagen (einschließlich MG) sein könnten.

Die MG kommen ursprünglich aus dem Dottersack und wandern während frühester Entwicklung in das Gehirnparenchym ein. Sie sind für die angeborene Immunreaktion sowie die Antigenpräsentation verantwortlich und beteiligen sich an der neuronalen Entwicklung. Die kürzliche (Wieder-)Entdeckung des meningolymphatischen Systems lässt uns die Rolle der Blut-Hirn-Schranke bei der Regulierung der erworbenen Immunität überdenken (Yuhas, 2012; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020). Die MG werden in einem eigenen Kapitel (s. 1.3) ausführlicher diskutiert.

Die Basalmembran ist eine komplexe Sammlung von Biomolekülen und formt die extrazelluläre Matrix um Blutgefäße und Perizyten. Sie befindet sich in direktem Kontakt mit den bereits beschriebenen Astrozytenfüßchen, ist etwa 30 bis 40 nm dick und enthält Moleküle wie Kollagen 4, Fibronektin, Heparinsulfatproteoglykane und Laminine. Die Basalmembran wird in die vaskuläre und die parenchymale Schicht unterteilt. Beide Schichten dienen, wie die Blut-Hirn-Schranke selbst auch, als physikalische Barriere und Schutz vor chemischen Signalen und scheinen die Einwanderung von T-Zellen zu behindern. Die vaskuläre Schicht wird durch Exkretionsprodukte der Endothelzellen und der Perizyten gebildet und enthält α 4- und α 5-Laminin. Die parenchymale Basalmembran geht auf Astrozyten zurück und enthält α 1- und α 2-Laminin (Wu *et al.*, 2009).

1.2.2 Blut-Liquor-Schranke und Hirnhäute

Im Bereich der *Plexus choroidei* und der *Dura mater* finden sich gefensterte Kapillaren mit erhöhter Permeabilität. Um zu verhindern, dass ein unregulierter Stoffaustausch zwischen Blut und *Liquor* bzw. Blut und Gehirnparenchym stattfindet, gibt es ähnlich zur Blut-Hirn-Schranke weitere Barrieren.

Im Bereich der **inneren** Liquorräume ist das die Blut-Liquor-Schranke. Sie wird von fenestriertem Kapillarendothel, der darunterliegenden Basalmembran und von spezialisierten Ependymzellen – den Epithelzellen der *Plexus choroidei* –

und ihren *tight junctions*, gebildet (Trepel, 2022). Im Bereich der **äußeren** Liquorräume bilden, wie in den Reviews von Engelhardt, Vajkoczy und Weller (2017) und Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis (2020) umfassend dargestellt, die *Arachnoidea* und die *Pia mater* eine weitere Schranke zwischen Blut und *Liquor* (Blut-Arachnoidea-Schranke) aus, die einen Übertritt von Molekülen aus dem Interstitium der *Dura* bzw. den in der *Dura* verlaufenden gefensterten Kapillaren in den Subarachnoidalraum und damit in den *Liquor* unterbindet. Die Epithelzellen der *Arachnoidea* sind mit *tight junctions* untereinander verbunden. Die leptomeningealen Gefäße, also die Gefäße, die innerhalb des Subarachnoidalraums verlaufen, besitzen wiederum eine Blut-Hirn-Schranke, also ein dichtes, ungefenstertes Gefäßendothel. Hinzu kommen weitere typische Wandschichten bei größeren Gefäßen wie die *Media* und *Adventitia*. Im Vergleich dazu besitzt die Blut-Hirn-Schranke laut Pardridge (1986) eine um den Faktor 2000 größere Austauschoberfläche als die Blut-Liquor-Schranke. Der Übertritt von Substanzen aus dem *Liquor* ins Gehirnparenchym bzw. umgekehrt ist also nicht uneingeschränkt möglich. Dies lässt sich daran belegen, dass sich die Zusammensetzung von *Liquor* und parenchymaler Extrazellulärflüssigkeit unterscheiden. Abbott *et al.* (2010) beschreiben in ihrem Review den Anteil der interstitiellen Flüssigkeit am *Liquor* zwischen 10 bis 60 %.

Im Bereich der äußeren Liquorräume liegt zwischen dem *Liquor* und dem Gehirnparenchym die *Pia mater*. Der genaue Aufbau der *Pia mater* wird in der Literatur sehr stiefmütterlich behandelt und kaum adäquat oder differenziert dargelegt. Häufig findet man eine Beschreibung des Aufbaus der *Leptomeninges*, allerdings kaum eine Differenzierung in die beiden an der *Leptomeninges* beteiligten Hirnhäute *Pia* und *Arachnoidea*. Entsprechend sind Informationen über Schichtung und Zell-Zell-Kontakte der *Pia mater cerebralis* sehr dürftig. So legt eine schematische Darstellung im anatomischen Atlas von Schünke, Schulte und Schumacher (2022) nahe, dass es sich lediglich um ein einschichtiges Epithel handelt. Über die *Pia mater spinalis* wird jedoch von Kayalioglu (2009) berichtet, dass sie drei- bis sechsschichtig sei. Die *Pia mater cerebralis* ist dagegen laut Adeeb *et al.* (2013) ein- bis zwei- und laut Hutchings und Weller (1986) ein- bis dreischichtig. Laut Alcolado *et al.* (1988) verfügt die *Pia* über Desmosomen. Desmosomen

und *Gap junctions* wurden auch von Hutchings und Weller (1986) beschrieben. Alcolado *et al.* (1988) sowie Hutchings und Weller (1986) beschreiben außerdem, dass die *Pia mater* sich je nach Spezies stark unterscheiden kann und nirgends so stark ausgeprägt zu sein scheint, wie beim Menschen. Da die *Pia mater spinalis* und die *Pia mater cerebialis* aber am *Foramen magnum* ineinander übergehen, selben embryologischen Ursprungs sind und auch tatsächlich ähnliche Aufgaben wahrzunehmen scheinen, liegt eine Ähnlichkeit im Aufbau sehr nahe – ist aber aktuell nicht zweifelsfrei zu belegen. Hinweise darauf, dass die *Pia mater* (wie die *Arachnoidea*) über eigene *tight junctions* verfügt, wurden dagegen in der durchgeführten Literaturrecherche nicht gefunden.

Die *Pia mater* steht in Verbindung mit der *Adventitia* größerer Hirnarterien oder ersetzt diese im Verlauf. Sie bedeckt die Gefäße beim Eintritt in das Gehirnparenchym, bildet dort die Virchow-Robin-Räume und grenzt diese vom Subarachnoidalraum ab (Gouveia-Freitas und Bastos-Leite, 2021; Trepel, 2022). Das Epithel der *Pia mater* ist ähnlich der Blut-Hirn-Schranke weitestgehend impermeabel, verfügt laut Alcolado *et al.* (1988) jedoch über keine *tight junctions*. In den tieferen Hirnschichten ist die gefäßbedeckende *Pia* immer rudimentärer ausgebildet. Auf kapillärem Niveau liegen dem Gefäß keine pialen Zellen mehr auf (Gouveia-Freitas und Bastos-Leite, 2021). Die zerebralen Venen scheinen lediglich von Zellinseln der *Pia* und damit nicht durchgehend bedeckt zu sein, was eine postkapilläre Extravasation von Zellen vereinfachen könnte (Alcolado *et al.*, 1988). Die *Pia mater* ist selektiv permeabel für gelöste Substanzen und manche Immunzellen, nicht aber für Erythrozyten. Hutchings und Weller (1986) konnten dies beispielsweise in menschlichem Gewebe bei Subarachnoidalblutungen und Leptomeningitis belegen. Der *Pia mater* liegt nach zentral eine Basalmembran und dann die *Glia limitans* an, die von den Endfüßchen der Astrozyten gebildet wird (Dasgupta und Jeong, 2019). Zu den unter physiologischen Bedingungen in der *Dura* gefundenen Immunzellen gehören neben (meningealen) Makrophagen auch Dendritische Zellen, T- und B- Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile, Natürliche Killerzellen. In der *Pia* wurden überwiegend Makrophagen, Dendritische Zellen, T-Zellen und Neutrophile gefunden (Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020). Cloyd und Low (1974) beschreiben, dass sich im Bereich der

inneren Liquorräume zwischen *Liquor* und Gehirnparenchym die Ependymzellschicht befindet, die die Ventrikel vollständig auskleidet. Im Gegensatz zu den Epithelzellen der *Plexus choroidei* besitzen die Ependymzellen allerdings keine *tight junctions*, sondern lediglich *Zonulae adherentes*.

1.2.3 Virchow-Robin-Räume

Bei den Virchow-Robin-Räumen handelt es sich um perivaskuläre Räume zwischen dem Gehirnparenchym und den hirnversorgenden Blutgefäßen, die teils von der *Pia* begleitet werden. Zum Gehirnparenchym hin werden die Virchow-Robin-Räume von einer Basalmembran und der *Glia limitans* abgegrenzt (vgl. Abbildung 4). Hier finden sich typischerweise auch perivaskuläre Makrophagen. Die Virchow-Robin-Räume umfassen neben dem eigentlichen Raum auch die den Raum füllende extrazelluläre Flüssigkeit und die darin liegenden Zellen. Virchow-Robin-Räume sind an der paravaskulären Drainage von Metaboliten beteiligt, scheinen am sogenannten ‚glymphatischen System‘ mitzuwirken und werden somit ebenfalls mit der perineuralen und meningealen Lymphdrainage in Verbindung gebracht (Yuhas, 2012; Alves De Lima, Rustenhoven und Kipnis, 2020; Gouveia-Freitas und Bastos-Leite, 2021; Trepel, 2022).

1.2.4 Zirkumventrikuläre Organe (ZVO)

Laut Duvernoy und Risold (2007) sind ZVO anatomische Strukturen, die mit dem dritten Ventrikel (die Neurohypophyse inkl. der *Eminentia Mediana*, *Organum vasculosum laminae terminalis*, *Organum subfornicale*, *Organum subcommissurale*, *Glandula pinealis*) bzw. dem vierten Ventrikel (*Area postrema*) assoziiert sind (vgl. Abbildung 5). Laut Trepel (2022) werden die ZVO von sogenannten Tanyzyten gebildet. Bei Tanyzyten handelt es sich um (mit den Ependymzellen verwandten) spezialisierte Gliazellen in den Ventrikelwänden. Sie können auch neuronale Aufgaben wahrnehmen und direkt mit *Liquor* und Blut in Verbindung treten (Trepel, 2022). Ein Zellpol der Tanyzyten scheint mit dem gefenserten Kapillarendothel, welches im Bereich der ZVO häufig gefunden werden kann, in Kontakt zu stehen. Der andere Zellpol der Tanyzyten steht im Kontakt mit dem Liquorraum oder dem periventriculärem Neuropil. Die Tanyzyten und die anderen Ependymzellen verfügen über *tight junctions* (Barshes, Demopoulos

und Engelhard, 2005). Laut Bentivoglio *et al.* (2018) könnte es zwischen der *Emimentia mediana* und den *Nuclei arcuati* eine Grenzzone geben, in der die Tanyzyten über keine *tight junctions* verfügen.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen über Anzahl, Funktion und strukturellen Aufbau der ZVO unterschiedlicher Spezies. Einig sind sich die Autoren darin, dass die Kapillargefäße all dieser Organe ein fenestriertes Endothel besitzen, sodass das Blut und das Nervengewebe dieser Organe leichter miteinander interagieren können, was sie stark von dem restlichen ZNS mit seiner Blut-Hirn-Schranke unterscheidet. Das Vorhandensein dieser fenestrierten Kapillaren und der Bezug zum Ventrikelsystem sind auch der Grund, warum manche Autoren die *Plexus choroidei* mit zu den ZVO zählen; andere wiederum versehen die *Plexus choroidei* mit einer Sonderstellung, da sie keine eigenen Neurone haben (Duvernoy und Risold, 2007; Korf und Schiebler, 2007; Aumüller *et al.*, 2017; Kaur und Ling, 2017; Trepel, 2022). Manchmal werden die ZVO nach ihren teils mutmaßlichen Funktionen in sekretorische (Neurohypophyse und *Glandula pinealis*) und sensorische Organe (die anderen) unterteilt. Allerdings gibt es einige Widersprüche, die dieser strikten Einteilung zumindest teilweise entgegenstehen, da auch einige sensorische ZVO Stoffe sezernieren (Duvernoy und Risold, 2007; Wong *et al.*, 2013; Ufnal und Skrzypecki, 2014; Kaur und Ling, 2017). Des Weiteren berichten Ufnal und Skrzypecki (2014), dass ZVO an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sein könnten. Auch wurden einige blutdruckwirksame Hormone als Neurotransmitter im ZNS nachgewiesen, sodass die ZVO als ‚Brücke‘ zwischen peripherem und zentralem Hormonsystem sowie integrativer Bestandteil zur Abstimmung neuronaler und humoraler Signale fungieren könnten. Die Hypophyse liegt in der *Fossa hypophysealis Sellae turcicae* und lässt sich in Adeno- und Neurohypophyse unterteilen. Die Adenohypophyse ist embryologisch gesehen kein Teil des Gehirns (Trepel, 2022). Die Neurohypophyse lässt sich wiederum in *Infundibulum* (Hypophysenstiel) und den *Lobus posterior* unterteilen. Im *Lobus posterior* treffen die Axonenden der hypothalamischen *Nuclei supraopticus et paraventricularis*, die die Hormone Vasopressin und Oxytozin synthetisieren, auf ein ausgeprägtes Kapillarsystem mit dem bereits erwähnten ZVO-typischen gefenesterten Endothel. Die Bildung und Freisetzung der Hormone in das

Blut wird über Osmorezeptoren und Afferenzen aus verschiedenen Kernen des Hirnstamms und des limbischen Systems geregelt. Der Hypophysenstiel verbindet die Hypophyse mit dem Hypothalamus. In Richtung des Hypothalamus läuft das Infundibulum verdickt aus. Diese Verdickung wird *Eminentia mediana* genannt. Die *Eminentia mediana* liegt zwischen den beiden *Ncl. arcuati* des Hypothalamus. Deshalb wird die *Eminentia mediana* zusammen mit den beiden *Ncl. arcuati* auch häufig als ‚*arcuate nucleus-median eminence complex*‘ bezeichnet. Die *Eminentia mediana* verfügt über ein Pfortadersystem, in das Steuerhormone abgegeben werden, die auf die Adenohypophyse wirken. Diese reagiert darauf wiederum mit der Ausschüttung glandotroper Steuerhormone. Dieses Pfortadersystem besitzt ein oberflächliches und ein tiefes Kapillarnetz, welche untereinander Anastomosen ausbilden, deren Funktion aber noch nicht gänzlich verstanden ist (Duvernoy und Risold, 2007; Korf und Schiebler, 2007; Kaur und Ling, 2017).

Die folgenden anatomischen und physiologischen Ausführungen zu den ZVO basieren auf den Übersichtsarbeiten von Duvernoy und Risold (2007) sowie Kaur und Ling (2017). Die eigentliche Primärliteratur ist diesen Arbeiten zu entnehmen. Ergänzungen erfolgen an den mit Zitaten gekennzeichneten Stellen mittels (neuro-)anatomischer Fachbücher und Atlanten.

Die Höhle des dritten Ventrikels wird rostral von der *Lamina terminalis* begrenzt, welche sich wiederum rostral von der vorderen Kante des *Chiasma opticum* bis dorsal zur *Commissura anterior* ausdehnt. Transversal wird die *lamina terminalis* von einer Falte begrenzt, die über dem *Chiasma opticum* den *Recessus supraopticus* bildet. In der *Lamina terminalis* liegt das ***Organum vasculosum laminae terminalis***. Es besteht aus einem Netzwerk kapillärer Gefäßschlingen, das die gesamte Falte der *Lamina terminalis* auskleidet (Schünke, Schulte und Schumacher, 2022). Bei Katzen konnte kein Kontakt des Ventrikels mit den tiefer gehenden Gefäßschlingen festgestellt werden. Insgesamt ähnelt der Aufbau des Kapillarsystems aber dem des Pfortadersystems der Neurohypophyse, welche topografisch lediglich durch das *Chiasma opticum* voneinander abgegrenzt werden. Typisch für das *Organum vasculosum laminae terminalis* sind die topografischen Beziehungen der Subarachnoidalräume der prächiasmatischen Zisterne mit dem oberflächliche Kapillarnetz sowie der Ventrikelhöhle mit dem tiefen Kapillarnetz.

Auch im *Organum vasculosum laminae terminalis* stehen die Neurone über das gefensterte Endothel im direkten Kontakt mit humoralen Substanzen. Eventuell könnte das *Organum vasculosum laminae terminalis* als Osmoregulator dienen und eine Rolle bei der Freisetzung von Vasopressin spielen. Auch bis zum *Organum vasculosum laminae terminalis* reichende hypothalamische Neuronenfasern wurden beschrieben, die Gonadoliberin-Vesikel enthalten. So könnte das *Organum vasculosum laminae terminalis* auch in die zyklische Produktion der hypophysären gonadotropen Hormone involviert sein (Duvernoy und Risold, 2007; Kaur und Ling, 2017).

Das ***Organum subfornicale*** ist eine kleine, median gelegene Struktur, die unterhalb des namensgebenden *Fornix* auf Höhe der rechten und linken Fornixsäule zu finden ist (Schünke, Schulte und Schumacher, 2022). Interessanterweise treffen hier die Seitenventrikel auf den dritten Ventrikel. Der Gefäßaufbau ähnelt dem der anderen ZVO. Das verflochtene Kapillarnetz bildet große Maschen aus, von denen einige Schlingen in der Nähe des Ventrikels gefunden werden können. Embryologisch scheinen das *Organum subfornicale* und das *Organum vasculosum laminae terminalis* aus der primitiven *Lamina terminalis* hervorzugehen und ähnliche Funktionen zu haben. Sie werden dann während der Entwicklung durch die *Commissura anterior* getrennt. Aufgrund der erhöhten Permeabilität in den Kapillaren des *Organum subfornicale* können dessen Neurone auf die Plasmaspiegel von Angiotensin II reagieren. Viele der Neuronenfasern ziehen zu den *Nuclei paraventricularis et supraopticus* und könnten somit die Freisetzung von Vasopressin (mit-)regulieren. Es scheint, als könnte das *Organum subfornicale* für das Durstgefühl bei Dehydratation verantwortlich sein (Duvernoy und Risold, 2007; Kaur und Ling, 2017).

Das ***Organum subcommisurale*** besteht aus großen kuboiden Ependymzellen, die die vordere und untere Fläche der hinteren Kommissur bedecken. Es liegt oberhalb der Öffnung des *Aquaeductus mesencephali* und bildet das Dach des Aquäduktkanals bis zum *Recessus mesocoelicus* (Schünke, Schulte und Schumacher, 2022). Das *Organum subcommisurale* wurde bisher in allen Vertebraten beschrieben, allerdings verschwinden die Vaskularisierung und der *recessus mesocoelicus* beim Menschen während der Embryonalentwicklung.

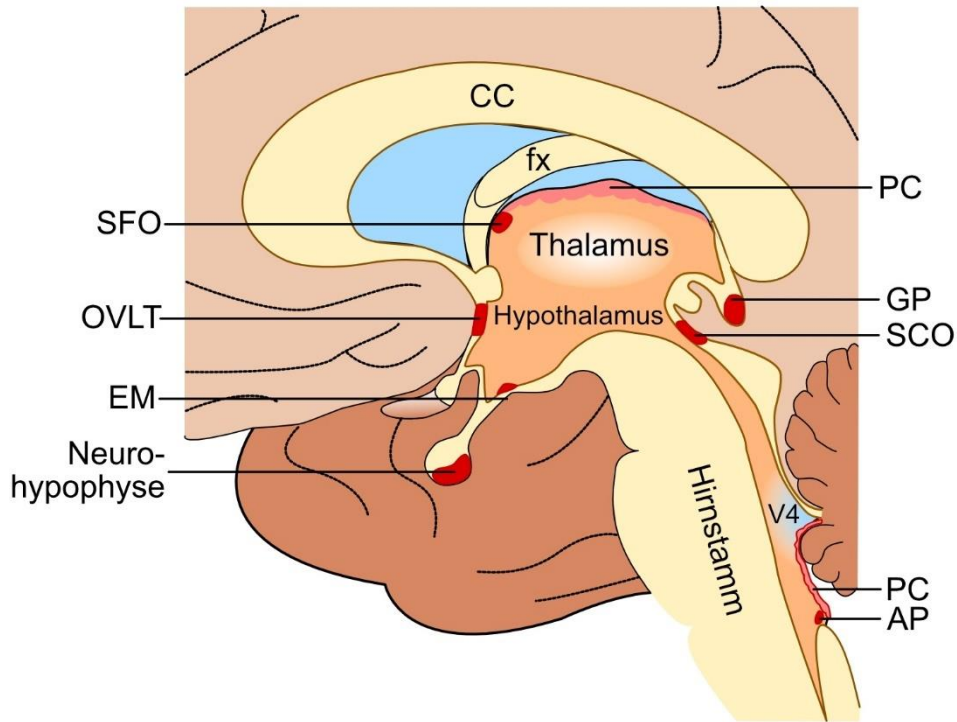


Abbildung 5: Schematische topographische Darstellung der ZVO in mediosagittaler Ansicht

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der topographischen Verhältnisse im Bereich des dritten und vierten Ventrikels und der Lage der ZVO sowie des Plexus choroideus, der in der Literatur manchmal zu den ZVO gezählt wird. EM: Eminentia mediana; OVL: Organum vasculosum laminae terminalis; SFO: Organum subfornicale; GP: Glandula pinealis; SCO: Organum subcommisurale; PC: Plexus choroideus; AP: Area postrema; V4: vierter Ventrikel; cc: Corpus callosum; fx: Fornix cerebri. Angelehnt an Bentivoglio, Kristensson und Rottenberg (2018).

Bei Katzen besteht die Durchblutung dagegen aus einem ausgedehnten und anastomosierenden Netzwerk zwischen der Ependymschicht und der *Commissura posterior*. Auch hier zeigen sich wieder zahlreiche Kapillarschlingen. Die Ausprägung der Vaskularisierung variiert stark zwischen den Spezies. Im Unterschied zu anderen ZVO hat dieses Organ allerdings eine normale Blut-Hirn-Schranke und kein gefenstertes Gefäßendothel. Die Ependymzellen sezernieren ein Glykoprotein, welches die Reissner-Fasern bildet. Diese Fasern ziehen am gesamten Aquädukt entlang bis zum vierten Ventrikel. Dem *Organum subcommisurale* wurden bereits einige Funktionen zugeschrieben, allerdings bislang ohne experimentelle Evidenz (Duvernoy und Risold, 2007; Kaur und Ling, 2017).

Die ***glandula pinealis*** wird häufig nicht zu den ZVO gezählt, da sie als primär melatoninproduzierende Drüse vor allem aus Pinealozyten gebildet wird. Beim

Menschen steht die *Glandula pinealis* über die *Recessus pinealis et suprapinealis* des dritten *Ventrikels* mit diesem in Kontakt. Ihre Kapillaren bilden ein dichtes, großkalibriges und anastomosierendes Netzwerk. Das Kapillarendothel ist weitestgehend charakteristisch für ZVO, allerdings abhängig von der untersuchten Spezies. Beim Menschen können wiederum diverse Areale unterschieden werden; beispielsweise können in zentralen und dorsalen Teilen typische Läppchen mit für ZVO charakteristischen Kapillarschlingen und gleichzeitig in den unteren Anteilen eine diffuse Sammlung von Pinealozyten mit kleinkalibrigen Kapillaren und erhaltener Blut-Hirn-Schranke gefunden werden. Die *Glandula pinealis* ist maßgeblich an der Regulation des zirkadianen Rhythmus beteiligt (Duvernoy und Risold, 2007; Aumüller *et al.*, 2017; Kaur und Ling, 2017; Trepel, 2022).

Die ***Area postrema*** bildet zusammen mit den *Ncll. Tractus solitarii* das Brechzentrum (Aumüller *et al.*, 2017; Trepel, 2022). Die *Area postrema* befindet sich am kaudalen Ende des Gehirns am Übergang der *Medulla oblongata* zum Rückenmark in der Rautengrube (Schünke, Schulte und Schumacher, 2022) und ist damit das kaudalste der ZVO. Sie besteht aus einem rechten und linken Anteil, die am Boden des vierten Ventrikels auf dem *Obex* miteinander in der Medianlinie verbunden sind. Die *Area postrema* steht in Verbindung zur Öffnung des Zentralkanals im vierten Ventrikel. Ihre Vaskularisierung ist charakteristisch für ZVO: ein dichtes Netzwerk großkalibriger, anastomosierender und gefensterter Kapillargefäße mit zahlreichen Gefäßschleifen. Zusammen mit den *Nuclei tractus solitarii et dorsalis nervi vagi* bildet die *Area postrema* das dorsomediale Mark bzw. den vagalen Komplex, welches bzw. welcher ein wichtiger Bestandteil des autonomen Nervensystems darstellt und eine Rolle bei der kardiovaskulären und respiratorischen Regulation spielt (Duvernoy und Risold, 2007; Kaur und Ling, 2017).

1.3 Mikrogliazellen

Neben den Nervenzellen existieren einige weitere Zellgruppen im ZNS, die als Neuroglia zusammengefasst werden. Zu diesen gehören beispielsweise Astro- und Oligodendroglia, welche neuroektodermalen Ursprungs sind (Aumüller *et al.*, 2014). Garaschuk und Verkhratsky (2019) legen in ihrem Review ausführlich dar,

dass Pio del Rio Hortega im frühen 20. Jahrhundert erstmals zusätzlich zu diesen Gliazellen die Mikrogliazellen (MG) beschrieb, welche, wie wir heute wissen, allerdings von erythromyeloischen Vorläuferzellen aus dem Dottersack (Ginhoux *et al.*, 2010; Ginhoux und Prinz, 2015) und nicht von neuroektodermalen abstammen. Zusätzlich konnten Lawson *et al.* (1990) zeigen, dass die mikrogliale Zelldichte stark zwischen grauer und weißer Substanz bzw. je nach untersuchtem Gehirnnareal variiert. MG gelten traditionellerweise als ‚Immunzellen‘ des ZNS. Hinzu kommen laufend ‚neu-entdeckte‘ Funktionen sowohl im Bereich der Immunologie als auch im Bereich der Homöostaseerhaltung.

1.3.1 Historisches und Embryonalentwicklung

Ursprünglich galten Gliazellen nur als sogenannte Stützzellen; heute wissen wir, dass sie maßgeblich an der Homöostase, der Immunabwehr (z. B. MG) und der elektrischen Isolation von Nervenzellen (Oligodendrozyten) beteiligt sind (Aumüller *et al.*, 2014). MG sind Immunzellen des Gehirns und stammen von fetalen Makrophagen ab, die während der frühesten Embryonalentwicklung noch vor Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke aus dem Dottersack in das Neuralrohr einwandern. Bei Mäusen findet dies typischerweise um den achten Tag der Embryonalentwicklung (E8) statt (Ginhoux *et al.*, 2010; Kierdorf *et al.*, 2013; Ginhoux und Prinz, 2015), während die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke in Mäusen notwendigerweise später (ab E9,5 post conceptionem) beginnt (Hogan *et al.*, 2004).

Ginhoux und Prinz (2015) zeigten in ihren Parabioseexperimenten, dass sich Monozyten und vom Knochenmark abstammende Zellen nicht an der Erneuerung der mikroglialen Population beteiligen. In Zusammenschau mit den Arbeiten von Ajami *et al.* (2007), Ginhoux *et al.* (2010), Goldmann *et al.* (2013), Hashimoto *et al.* (2013) und Yona *et al.* (2013) lässt sich also sagen, dass die aus dem Dottersack eingewanderten mikroglialen Vorläuferzellen im physiologischen Zustand als ihr eigenes Stammzellreservoir dienen und selbst die bei Pathologien auftretende Mikrogliose nahezu ausschließlich aus der im ZNS ansässigen Population stammt. Jedoch kann eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke eine Einwanderung von Immunzellen in das ZNS ermöglichen. Während kurz lebende Monozyten unter diesen pathologischen Umständen nur vorübergehend ins ZNS

rekrutiert werden, können sich länger lebende, vom Knochenmark abstammende, nicht-monozytäre Zellen auch langfristig im ZNS ansiedeln und Funktionen ähnlich den MG übernehmen (Ajami *et al.*, 2007, 2011).

Die eben beschriebenen Vorläuferzellen aus dem Dottersack wandeln sich nach ihrer Migration ins ZNS zu überwachenden Immunzellen um. Diesen Zustand nennt man heute u.a. *surveillance state*. Sogenannte *surveillant* (überwachende) oder *ramified* (verzweigte) MG besitzen die Fähigkeit, ihre Ausläufer sehr schnell von einem Ort zum anderen zu bewegen und chemotaktische Signale und Homöostase zu monitoren (Kreutzberg, 1996; Stollg und Jander, 1999). Als Ableger peripherer Immunzellen verfügen MG über ‚klassische‘ Immunrezeptoren myeloischer Zelllinien. Darüber hinaus exprimieren MG auch Rezeptoren für Neurotransmitter und -modulatoren und besitzen dadurch die Fähigkeit, ihre Umgebung auf molekularer Ebene zu überwachen (Pocock und Kettenmann, 2007; Kettenmann *et al.*, 2011; Brawek und Garaschuk, 2013; Kettenmann, Kirchhoff und Verkhratsky, 2013). Lalancette-Hébert *et al.* (2007) konnten außerdem in einem Schlaganfall-Mausmodell zeigen, dass die Anwesenheit von MG neuroprotektiv wirken muss, da die Kontrollgruppe nach Verschluss der mittleren Gehirnarterie deutlich weniger Gewebeuntergang verzeichnete als die Gruppe mit reduzierter MG-Anzahl (Herpes-Simplex-Virus-Thimidin-Kinase-mutante Mauslinie nach Ganciclovirgabe).

Garaschuk und Verkhratsky (2019) beschreiben ausführlich, dass bereits Hortega morphologische Variationen der MG auffielen (s. Abbildung 6), welche über Verkürzung und Ausdünnung der Verzweigung bis hin zum quasi fortsatzfreien makrophagenähnlichen Phänotyp reichen (s. Abbildung 6). Die Beschreibung der MG geht laut ihnen aber nicht nur auf Hortega zurück. Sie erwähnen auch weitere namhafte Neurowissenschaftler und -anatomen, die an der Erforschung der MG beteiligt waren. Laut Ihnen gehörten zu diesen beispielsweise Carl Frommann, Franz Nissl, Ludwig Merzbacher und Alois Alzheimer. Diese gehören zu den früheren Beschreibern pathologieassoziierten Veränderungen der MG. Schon Carl Frommann beschrieb laut Garaschuk und Verkhratsky (2019) einen Rückgang und eine Verkürzung der mikroglialen *Processus* sowie eine folgende Mikroglie während pathologischer Prozesse, sodass er dies miteinander in

Verbindung brachte. Nissl, Alzheimer und Merzbacher benannten laut Garaschuk und Verkhratsky (2019) dagegen wohl erstmals pathologisch-morphologisch veränderte MG als ‚Stäbchenzellen‘ (*rod cells*), ‚Gitterzellen‘ (*grid cells*) und ‚Ab-räumzellen‘ (*clearance cells*).

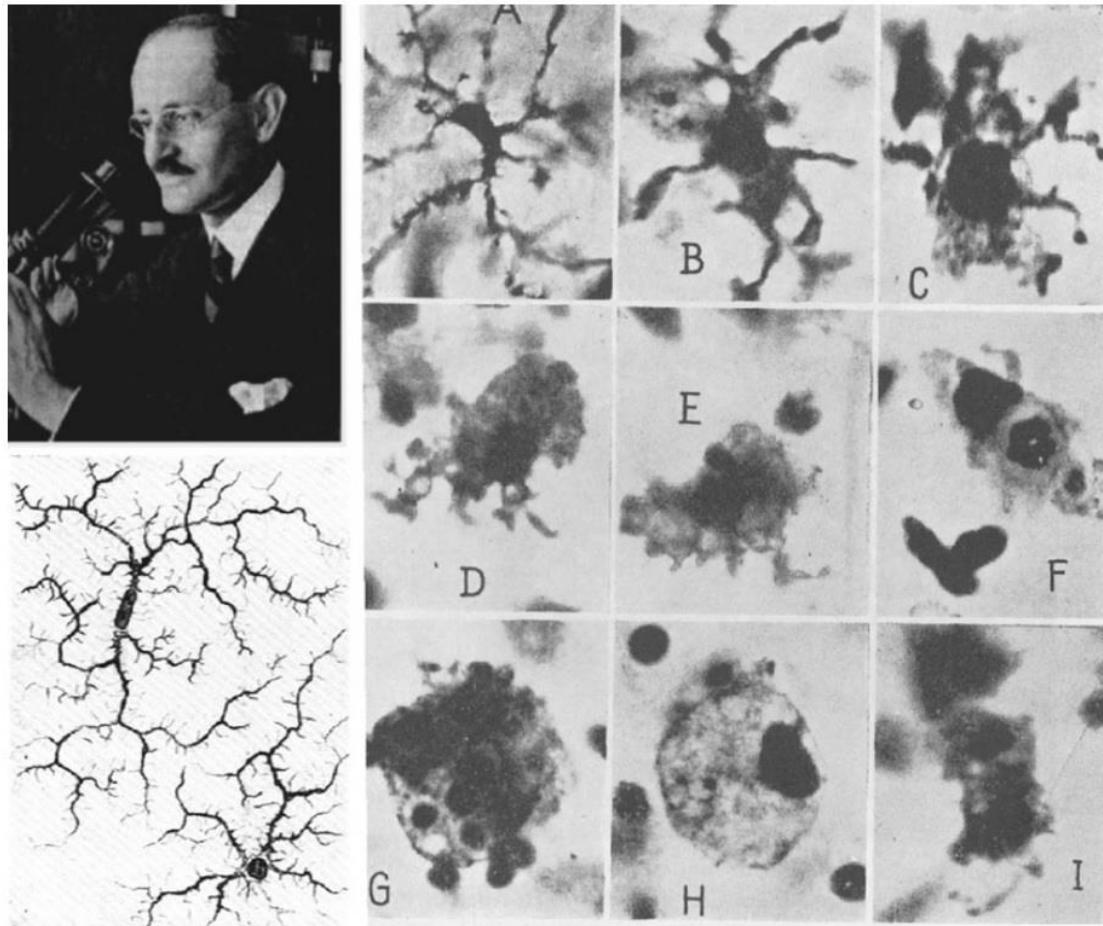


Abbildung 6: Historisch beschriebene morphologische MG-Subtypen

Oben links ist ein Portrait Pio del Rio-Hortega zu sehen, unten links eine Zeichnung Hortegas von Mikrogliazellen. Rechts sind Mikrogliazellen unterschiedlicher Morphologie zu sehen. (a) MG mit dicken, verrohten Fortsätzen; (b) MG mit kurzen Fortsätzen und vergrößertem Soma; (c) hypertrophe MG mit Pseudopodien; (d, e) amöboide und pseudopodische Form; (f) MG mit phagozytiertem Leukozyt; (g) MG mit zahlreichen phagozytierten Erythrozyten; (h) MG mit eingeschlossenen Fett-Granula; (i) MG in Mitose. Abbildung und Abbildungsüberschrift übernommen von Garaschuk und Verkhratsky (2019), modifiziert nach Rio-Hortega (1932).

1.3.2 Beschriebene Funktionen von Mikrogliazellen

Die Morphologie der MG, die in einem späteren Kapitel ausführlicher erörtert wird, scheint allein nicht ausreichend zu sein, um die Funktion von MG im

gesunden oder kranken ZNS ausreichend darlegen oder verstehen zu können. Kombiniert man die Morphologiebeschreibung mit weiteren Methoden, kann die Morphologie aber zumindest teilweise Aufschluss über das zu erwartende Verhalten geben (Norden *et al.*, 2016). Alboni *et al.* (2017) zeigten außerdem im Falle einer Fluoxetinbehandlung von Mäusen, dass auch Umwelteinflüsse morphologische Veränderungen hervorrufen können und diese, im Rahmen dieser Studie, lediglich durch Fluoxetin moderiert werden. Dies galt sowohl für ‚stressreichere‘ als auch ‚stressfreiere‘ Umgebungen.

Wie von der Übersichtsarbeit von Reemst *et al.* (2016) dargestellt, fällt die Besiedlung des ZNS durch die mikroglialen Vorläuferzellen in etwa auf den Zeitraum der ersten Neuro- und Synaptogenese. Diese Übersichtsarbeit bietet zusammen mit den Reviews von Tay *et al.* (2017) und Mosser *et al.* (2017) einen ausführlichen Überblick über die große Anzahl an Hin- und Nachweisen, laut denen MG auch an der Entwicklung des ZNS und der Synaptogenese, an neuronaler Plastizität, der Synapsenprozessierung, der Angiogenese und Vaskularisierung des ZNS maßgeblich beteiligt sind. Ergänzend dazu konnten Hagemeyer *et al.* (2017) einen erheblichen Einfluss auf die Myelinisierung von Neuronen und Hefendehl *et al.* (2014) auf Alterungsprozesse sowie Homöostaseüberwachung und -aufrechterhaltung des ZNS nachweisen. Eine Vielzahl von Publikationen belegt außerdem, dass MG auch an pathologischen Prozessen bzw. an der körpereigenen Antwort auf diese beteiligt sind (Streit *et al.*, 2005, 2009; Xue *et al.*, 2010; Bachstetter *et al.*, 2015; Bisht, Sharma, Lacoste, *et al.*, 2016; Shobin *et al.*, 2017; Mrdjen *et al.*, 2018). Für einen Großteil dieser Funktionen ist eine frühe Besiedlung des ZNS unabdingbar. Kurzum: Die Funktionen der MG sind äußerst vielfältig und es werden stetig mehr beschrieben. Auch beschränken sie sich keineswegs auf immunologische Prozesse.

1.3.3 Morphologische Beschreibung von Mikrogliazellen

In der Biologie wird häufig ein Prinzip herangezogen, laut dem sich Funktion und Morphologie bedingen bzw. determinieren. Tatsächlich sind für MG viele unterschiedliche Funktionen und Morphologien bekannt; manchen Morphologien

werden sogar spezielle Funktionen zugeschrieben, die bei anderen Morphologien (bisher) nicht oder kaum beobachtet wurden. Da es schon zahlreiche, sehr gute Arbeiten gibt, die sich mit den unterschiedlichen Morphologien der MG befassen, und die qualitative Einteilung der MG nach Morphologie für die vorliegende Arbeit kaum eine Bedeutung hat, folgen nun eher kurze Ausführungen zu diesem Thema, um einen groben Überblick zu geben. Genauer kann beispielsweise den Arbeiten, **an die sich die folgenden Ausführungen des Kapitels 1.3.3 stark anlehnen**, von Savage *et al.* (2019), Boche *et al.* (2013) oder Tay *et al.* (2017) entnommen werden.

Die Morphologie der MG scheint stark vom Alter des jeweiligen Organismus, aber auch vom (Aktivierungs-)Zustand abzuhängen, was beispielsweise von Boche *et al.* (2013) ausführlich diskutiert wird. Aktiviert muss hierbei aber nicht zwangsläufig als Reaktion auf Erreger mit konsekutiver Abtötung dieser Erreger verstanden werden. Beispielsweise wurde von Vinet *et al.* (2012) neuroprotektives Verhalten von MG beschrieben, ohne dass anhand der mikroglialen Morphologie auf eine Aktivierung zu schließen war. Darüber hinaus sollte auch die untersuchte Spezies immer berücksichtigt werden, da nicht auszuschließen ist, dass es zwischen den unterschiedlichen Spezies Unterschiede in Morphologie und Funktion geben könnte, was Gorse und Lafrenaye (2018) zumindest teilweise belegen konnten. Auch scheinen manche Morphologien in physiologischen Prozessen genauso vorzukommen wie in pathophysiologischen, wobei hier die Funktion in den Fokus zu rücken ist und nicht zwangsläufig nur die (morphologische) Aktivierung. Im Rahmen des sogenannten *synaptic pruning* (ein Prozess, der für die Neuroplastizität während der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt) zeigen MG beispielsweise häufig eine amöboide Morphologie (Perez-Pouchoulen, Vanryzin und McCarthy, 2015), während der Neuro- und Synaptogenese (Hagemeyer *et al.*, 2017) und im ausgewachsenen Alter sind *ramified* Morphologien dagegen sehr weit verbreitet (Nimmerjahn, Kirchhoff und Helmchen, 2005; Vinet *et al.*, 2012). Während pathologischer Prozesse *können* sich die MG dann wiederum zu hypertropher (Hellwig *et al.*, 2016) oder amöboider Morphologie hin verändern oder sogar dystroph werden (Streit *et al.*, 2009; Bouvier *et al.*, 2016), wobei eine amöboide

Morphologie, wie eben erwähnt, ja auch während der Embryonalentwicklung als physiologisch beschrieben wurde. Dies deutet viel mehr darauf hin, dass die amöboide Morphologie immer dann anzutreffen ist, wenn Phagozytose stattfindet – unabhängig davon, ob von eigenem oder fremdem Material. Den Umstand, dass eine Morphologie nicht unbedingt nur für eine Funktion stehen kann oder in unterschiedlichen Situationen auftritt oder die Benennung einer Morphologie häufig dazu führt, dass man einer Zelle aufgrund ihrer Benennung weitere Funktionen abspricht, wird von Paolicelli *et al.* (2022) ausführlich diskutiert. Sie schlagen vor, weniger suggerierende und implizierende Beschreibungen zu verwenden, um dieses Problem zukünftig zu vermeiden. So sollte statt von einer ‚aktivierten MG‘ zukünftig von einer ‚auf Reiz x reagierenden MG‘ gesprochen werden, um deutlich zu machen, weswegen die MG aktiviert ist, und der Zelle nicht weitere Funktionen abzusprechen. Ähnlich verhält es sich mit der ‚Überwachungsfunktion‘ der *ramified* MG. Während *ramified* eine rein morphologische Beschreibung ohne implizierende Funktion ist, spricht eine Unterteilung in *surveillant* und *activated* MG den ‚aktivierten MG‘ jegliche Überwachungsfunktion ab; dass aber auch hypertrophe MG auf Umgebungsreize reagieren, geht in dieser Einteilung verloren.

Entsprechend soll hier nur eine rudimentär geartete Vorstellung der unterschiedlichen Morphologien geboten werden, um ansatzweise der Vielzahl an Funktionen und der damit verbundenen Morphologien gerecht zu werden. Genaueres kann, wie bereits erwähnt, beispielsweise in den ausführlichen Reviews von Boche *et al.* (2013), Tay *et al.* (2017) und Savage *et al.* (2019) nachgelesen werden. Die für die vorliegende Arbeit aufgenommenen MG sollen auch nicht aufgrund ihrer Morphologie stereotyp einer mikroglialen Subpopulation zugeordnet, sondern vielmehr das Ausmaß ihrer inflammatorischen Aktivität anhand quantitativer Parameter beschrieben werden.

Neben den bereits erwähnten *ramified* MG dürften während der Auswertung vermeintlich die *amoeboid* (amöboide), *dystrophic* (dystrophe) und *hypertrophic* (hypertrophe) Morphologien angetroffen worden sein, da diese am ehesten den bei der Sichtung der mikroskopischen Aufnahmen angetroffenen Morphologien ähneln. Auch entspräche dies am ehesten den in der Literatur für diese Subtypen

beschriebenen Funktionen. Über diese hinaus führen Savage *et al.* (2019) weiterhin *rod cells* (Stäbchenzellen), *satellite MG* (Satelliten-MG) sowie *dark MG* (dunkle MG) und die *gitter-like MG* (Gitterzellähnliche MG) auf. Die im vorangegangenen Kapitel erwähnten ‚Abräumzellen‘ werden von Savage *et al.* (2019) beispielsweise nicht mehr aufgeführt, finden sich aber in anderer Literatur durchaus noch, was wiederum unterstreicht, wie wichtig es für diesen Forschungsbereich ist, sich zeitnah auf einheitliche Benennungen zu einigen.

Die heute für gewöhnlich als ***ramified MG*** bezeichneten MG sind von langen, stark verzweigten Fortsätzen, kombiniert mit einem relativ kleinen und rundlichen Soma geprägt. Jinno *et al.* (2007) gaben für die Projektionsfläche des Zellkörpers $A = 49,5 \mu\text{m}^2$ an. Bei einem näherungsweise kugelförmigen Zellkörper entspräche dies einem Radius von $r_{\text{Soma}} = 3,9 \mu\text{m}$, und unter der Annahme, dass die Fortsätze auch näherungsweise ein kugelförmiges Gebilde aufspannen, entspräche der Radius der ‚Fortsatzkugel‘ $r_{\text{Fortsätze}} = 32,2 \mu\text{m}$ (Jinno *et al.*, 2007). Wie bereits erwähnt, sind diese Fortsätze nicht statisch, sondern in der Lage, schnell ihre Position und Verzweigung zu verändern, was sie zu ihrer vermeintlichen Überwachungsfunktion ermächtigen sollte (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn, Kirchhoff und Helmchen, 2005). Nimmerjahn *et al.* (2005) kamen anhand ihrer Untersuchungsergebnisse zu dem Schluss, dass die mikrogliale Population einmal alle paar Stunden Kontakt mit dem gesamten Gehirnparenchym aufnimmt und dabei aktiv in Kontakt zu anderen Gliazellen, Neuronen und Blutgefäßen tritt. Laut Tremblay *et al.* (2010) kann auch Kontakt zu mehreren Elementen gleichzeitig stattfinden. Aus den Experimenten von Nimmerjahn *et al.* (2005) und Davalos *et al.* (2005) geht auch hervor, dass MG schnell auf Verletzungen des Neuropils oder auf erhöhte ATP-Konzentrationen (im Sinne eines chemotaktischen Signals) reagieren, indem sie ihre Fortsätze zur entsprechenden Lokalisation zu bewegen versuchen. Auch im Falle multipler oder sich außer Reichweite befindender Signale wurde entsprechend reagiert. Tremblay *et al.* (2010; 2012) konnten außerdem zeigen, dass *ramified MG* auch Phagozytoseaktivität aufweisen. Darüber hinaus scheint diese Subpopulation auch an synaptischer Übertragung und Plastizität beteiligt zu sein. Die Ergebnisse von Vinet *et al.* (2012) legen ebenfalls nahe, dass die *ramified MG* ‚nicht nur überwachen‘. Sie konnten unter

exzitotoxischen Kulturbedingungen zeigen, dass MG aktiv neuroprotektiv wirken können, ohne ihre Morphologie zu ändern. Dies ist mitunter ein Grund, warum – wie von Paolicelli *et al.* (2022) gefordert – vermehrt auf den Begriff *ramified* als morphologische Beschreibung statt *inactive* oder *surveillant* als Aktivitäts- oder funktionelle Beschreibung zurückgegriffen werden sollte.

Savage *et al.* (2019) vergleichen **amöboide MG** morphologisch mit Makrophagen des restlichen Organismus. Entsprechend verfügen sie über kaum bzw. keine Fortsätze – geschweige denn eine komplexe Verzweigung. Hinzu kommen vergleichsweise große Somata. Trotzdem lassen sich elektronenmikroskopisch kleine filopodienartige Fortsätze nachweisen (Tremblay *et al.*, 2013), was dem Vergleich mit herkömmlichen Makrophagen aber eher unterstützen dürfte. Eine makrophagische Morphologie lässt allerdings ebenfalls nicht automatisch auf einen aktivierten Zustand im Sinne eines pathologischen Prozesses schließen, was wiederum die Forderung von Paolicelli *et al.* (2022) nach einer rein morphologischen Nomenklatur stützt. So konnten Hagemeyer *et al.* (2017) zeigen, dass der amöboide Subtyp für die Induktion oligodendrozytischer Vorläuferzellen relevant ist und damit konsekutiv auch für die folgende Myelogenese durch diese Vorläuferzellen. Die Homöostase dieser Zellen im adulten Gehirn ist ebenfalls abhängig von funktionalen MG. Entsprechend sollte dieser Subtyp bei der Erforschung demyelisierender Erkrankungen – wie beispielsweise der Multiplen Sklerose – nicht außer Acht gelassen werden. Im murinen Gehirn herrscht der *ramified* Subtyp in den meisten Regionen aber ab P10 bis P15 vor (Perez-Pouchoulen, Vanryzin und McCarthy, 2015; Bennett *et al.*, 2016; Hagemeyer *et al.*, 2017). Passend dazu konnten Parakalan *et al.* (2012) nachweisen, dass amöboide MG eher makrophagentypische Gene exprimieren, die beispielsweise Migration, Phagozytose und Zellzyklus betreffen, während *ramified* MG eher Gene exprimieren, die mit Neuronenreifung, Synapsenübertragung und Antigenpräsentation assoziiert sind. Natürlich findet sich die amöboide Morphologie aber auch als Reaktion auf akuten Gewebeuntergang, was darauf hinweisen könnte, dass sich MG als Ganzes (also inklusive Soma) in amöboider Form über weitere Strecken schneller fortbewegen können (Boche, Perry und Nicoll, 2013). Darauf aufbauend konnten Davalos *et al.* (2005) und Nimmerjahn *et al.* (2005) bei adulten

Mäusen *in vivo* zeigen, dass MG ihre *Processus* (und damit ihre Morphologie) innerhalb von 30 bis 60 Minuten stark verändern können, um sie auf eine fokale Verletzung oder ein chemotaktisches ATP-Signal zuzubewegen. Diese Experimente könnten nahelegen, dass ein Wechsel der Morphologie von verzweigt zu amöboid in der gleichen Zeit möglich sein könnte, da in den Experimenten Fortsätze teilweise vollständig zurückgebildet und gegenüberliegend neue in vergleichbarer Größe ausgebildet wurden. Entsprechend der beschriebenen Funktionen konnten amöboide MG in unterschiedlichen Spezies und Hirnregionen im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse gefunden werden (Lawson *et al.*, 1990; Bachstetter *et al.*, 2015; Bouvier *et al.*, 2016; Shobin *et al.*, 2017; Maxan *et al.*, 2018; Barger *et al.*, 2019).

In der Literatur werden **hypertrophe MG** auch als *active* oder *reactive* bezeichnet. Laut Paolicelli *et al.* (2022) sollte die Beschreibung als reaktiv nicht auf die gesamte Zelle oder den gesamten Zelltyp bezogen werden; vielmehr sollte man anfangen, die Zellen als ‚auf den Reiz x reagierend‘ zu bezeichnen, um der Zelle durch ihren Namen nicht die Möglichkeit, andere Funktionen wahrzunehmen, abzusprechen. Boche *et al.* (2013) beschreiben die hypertrophen MG (verglichen mit den *ramified* MG) mit deutlich kürzeren und verdickten Fortsätzen, aber mit noch stärker ausgeprägter Verzweigung. Eine Unterscheidung ist in der aktuellen Forschung schwierig und erfolgt weitestgehend über die Morphologie, da keine geeigneten Biomarker bekannt sind, die zur eindeutigen Differenzierung herangezogen werden könnten. Ob eine verstärkte Verzweigung und die raus resultierende höhere Anzahl an Fortsatzenden auch mit einer erhöhten Kommunikation mit dem umliegenden Gewebe einhergeht, ist noch ungeklärt. Teilweise wurde jedoch eine Hochregulation von *triggering receptor expressed by myeloid cells-2* (TREM2) und des *cluster of differentiation-Molekül 33* (CD33) im Rahmen pathologischer Prozesse beschrieben (Guerreiro *et al.*, 2013; Jonsson *et al.*, 2013; Bachstetter *et al.*, 2015; Walker und Lue, 2015; Bouvier *et al.*, 2016; Keren-Shaul *et al.*, 2017). TREM2 ist mit morphologischen Veränderungen assoziiert (Walker und Lue, 2015). CD33 dagegen gilt als Risikofaktor für die Entstehung von Morbus Alzheimer und korreliert mit einer verminderten Phagozytoseaktivität (Griciuc *et al.*, 2013; Malik *et al.*, 2013). Der hypertrophe Subtyp wurde im Rahmen vieler

unterschiedlicher, nicht nur das ZNS betreffender, pathologischer Prozesse beschrieben (Streit und Sparks, 1997; Hinwood *et al.*, 2013; Walker und Lue, 2015; Zanier *et al.*, 2015; Hellwig *et al.*, 2016; Maxan *et al.*, 2018) und scheint als proinflammatorischer Stimulus aufzutreten (Raj *et al.*, 2014; Walker und Lue, 2015). Der erste Kontakt zu solch einem Stimulus könnte als Priming fungieren, sodass es zu Proliferation und Veränderung der Genexpression kommt. Beim zweiten Kontakt erfolgt als Reaktion auf den Stimulus die Ausschüttung hoher proinflammatorischer Zytokinspiegel (Norden und Godbout, 2013; Perry und Holmes, 2014).

Dystrophe MG werden auch als seneszente MG bezeichnet. Seneszente Zellen sind Zellen, die sich nicht mehr teilen und ihren eigentlichen Aufgaben nicht mehr oder nicht mehr ausreichend gerecht werden (Collado, Blasco und Serrano, 2007; Hayat, 2014). Da sie auch im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses beschrieben wurden (Streit *et al.*, 2014) und nicht nur im Rahmen pathologischer Prozesse (Fendrick, Xue und Streit, 2007; Xue *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2011; Maxan *et al.*, 2018), lässt sich auch bei diesem Subtyp zeigen, dass die Forderung nach einer morphologischen Beschreibung sinnvoll ist (Paolicelli *et al.*, 2022). Morphologisch sind die Fortsätze der dystrophen MG – wiederum verglichen mit *ramified* MG – kurz, durchtrennt, nicht- oder dysfunktional. Des Weiteren werden in der Literatur ein dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum, rundliche Verdickungen und Lipofuszinablagerungen (als Zeichen unvollständigen lysosomalen Abbaus, lysosomalen Stresses sowie lysosomaler Überladung) beschrieben (Streit *et al.*, 2014). Streit *et al.* (2009) zeigten *ex vivo*, dass diese MG nur verzögert oder gar nicht auf proinflammatorische Stimuli reagieren, weshalb sie darauf aufbauend die dystrophen MG als morphologisches und funktionelles Gegenstück der hypertrophen MG bezeichnen. Streit *et al.* (2014) und Tischer *et al.* (2016) zu Folge exprimieren diese MG inhomogene Spiegel von *Ionized calcium binding adapter molecule 1* (*iba-1*), sodass keine durchgehende Kontinuität der Fortsätze mit dem rundlichen Soma mehr festzustellen ist und lediglich lose, kleine, punktförmige Zytoplasmaansammlungen perisomatisch zu finden sind. Ultrastrukturell konnten Tischer *et al.* (2016) allerdings kleine ‚Zytoplasmabrücken‘ finden und diese Diskontinuität damit etwas

relativieren. Diese Funde unterstützen die Hypothese, dass diese seneszenten Zellen keine neuroprotektiven oder phagozytotischen Aufgaben mehr wahrnehmen (Bachstetter *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2017). Zusätzlich konnten Safaiyan *et al.* (2016) sowie Thériault und Rivest (2016) zeigen, dass ein mikroglia-spezifischer Rab7-knockout in Mäusen zur Ansammlung hoher unlöslicher Myelin-spiegel im lysosomalen System der MG führt, was mit reduzierter Phagozytosekapazität und einer dystrophen Fortsatzmorphologie korreliert.

Stäbchenzellen besitzen wenige oder keine radiären Fortsätze (Tam und Ma, 2014), sind eher länglich mit bipolaren Fortsätzen (Taylor *et al.*, 2014) und für gewöhnlich in der Nähe neuronaler Bestandteile zu finden (Ziebell *et al.*, 2012); Graeber (2010) vermutete deshalb eine Beteiligung am *synaptic pruning*. Im Alter nimmt die Zahl der Stäbchenzellen zu. Auch scheinen sie mit einigen pathologischen Prozessen assoziiert zu sein (Jørgensen *et al.*, 1993; Wirenfeldt *et al.*, 2009; Lambertsen *et al.*, 2011; Ziebell *et al.*, 2012), wobei ihre Bedeutung im Rahmen dieser Prozesse weitestgehend unbekannt ist (Bachstetter *et al.*, 2015, 2017). Auch Satelliten-MG sind nicht selten mit kortikalen Neuronen assoziiert (Baalman *et al.*, 2015) und verfügen über Membran-Membran-Kontakte zu diesen Neuronen (Wogram *et al.*, 2016). Die elektrische Aktivität der Satelliten-MG kann unabhängig vom assoziierten Neuron erfolgen (Wogram *et al.*, 2016).

Neben lichtmikroskopischen Methoden kommen auch elektronenmikroskopische und immunhistochemische Methoden zur Beschreibung und Unterscheidung der MG zum Einsatz. Ultrastrukturell lassen sich die bereits beschriebenen ‚typischen‘ MG eindeutig erkennen. Von diesen lassen sich ultrastrukturell dunkle MG und gitterzellähnliche MG unterscheiden (Savage *et al.*, 2018). Die Ultrastruktur kann allerdings ebenfalls um weitere Methoden (beispielsweise immunhistochemische) erweitert werden, wodurch die Interaktion kleinster Fortsätze mit dem Neuropil beschrieben werden konnte (Almolda, González und Castellano, 2013; Savage *et al.*, 2018). Tremblay *et al.* (2010) zeigten, dass 94% der mikroglialen Fortsätze in der murinen Sehrinde mit anderen Zellen in Kontakt treten.

Gitterzellähnliche MG wurden von Tremblay *et al.* (2012) im Kontext altersbedingten Verlustes sensorischer Funktionen in muriner Hirnrinde beschrieben. Sie sind mit zellulären Ablagerungen gefüllt, die wie Fettgranula aussehen. Deshalb

äußerten sie den Verdacht, dass es sich bei diesen Zellen um das elektronenmikroskopische Äquivalent der bereits beschriebenen seneszenten bzw. dystrophen MG handeln könnte. **Dunkle MG** wurden aufgrund ihrer hohen Elektronendichte so benannt. Neben erhöhten Markern für oxidativen und metabolischen Stress sind sie für den – eigentlich mikrogliatypischen – purinen Rezeptor P2RY₁₂ negativ. Auch verfügten CX₃CR1-GFP-Mäuse über niedrige Level von *iba-1* und *green fluorescent protein*. Es wird vermutet, dass die Zellen am Synapsenverlust im Rahmen chronischer Degeneration beteiligt sind, mit der sie assoziiert zu sein scheinen (Bisht, Sharma, Lecours, *et al.*, 2016; Wai Hui *et al.*, 2018).

1.3.4 Wirkung peripherer Immunstimuli auf Mikrogliazellen

Bereits Elmquist *et al.* (1997) zeigten, dass MG bzw. ZNS-nahe Makrophagen auf periphere Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) – die typisch für gramnegative bakterielle Zelloberflächen sind – reagieren, beispielsweise indem sie ihre Cyclooxygenase-2-Expression erhöhten, was wiederum zur vermehrten Bildung von Prostaglandinen führte. Darüber hinaus konnten Norden *et al.* (2016) zeigen, dass MG auf periphere LPS-Gabe mit Erhöhung von diversen Zytokinspiegeln reagierten. Diese Reaktion konnte morphologisch auch verzögert (24 bis 48 Std.) in immunhistochemischen Verfahren (*iba-1*) gezeigt werden. Interessanterweise lassen die Daten von Norden *et al.* (2016) vermuten, dass MG vor den Astrozyten auf die peripheren Immunstimuli reagieren. Der Review von Dilger und Johnson (2008) diskutiert die Interaktion zwischen Gehirn und Immunsystem bzw. peripherem Stimulus und zentraler Wirkung ausführlich, auch beispielsweise in Abhängigkeit vom Alter. Darüber hinaus zeigten Hoogland *et al.* (2015) in einer Metaanalyse von 51 tierexperimentellen Studien, dass eine periphere Immunreaktion eine systemische Inflammation und damit einhergehend eine Aktivierung der zentralnervösen Immunzellen nach sich ziehen kann. Unterschiedliche Injektionsregime mit sowohl LPS-Molekülen als auch mit lebenden und abgetöteten Bakterien wurden in den unterschiedlichen Arbeiten angewandt. Gleichzeitig wurden in einem Großteil der untersuchten Studien Hinweise darauf gefunden, dass proinflammatorische Stimuli im ZNS neurodegenerative Entwicklungen fördern. Chemokine scheinen für diesen Zusammenhang eine Schlüsselrolle zu spielen. So wurde vermehrte Expression von TNF- α , Toll-like Rezeptoren (TLR-2 und

TLR-4) und von IL-1 β häufig beobachtet. Die Erhöhung einer der beiden ging jeweils mit mikroglialer Aktivierung einher; allerdings erschienen manche MG auch ohne IL-1 β -Erhöhung als ‚reaktiv‘. Fourrier *et al.* (2017) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Verabreichung von Docosahexaensäure (bzw. einem Derivat) nach LPS-Gabe die IL-6- bzw. ggf. auch die IL-1 β -Produktion sowie Rezeptorexpression deutlich reduzieren kann, was die These stützt, dass IL-1 β eine Rolle bei der zentralnervösen Reaktion auf periphere Immunstimuli zu spielen scheint. Cunningham (2013) schildert in seinem Review, dass IL-1 intrazelluläre Signalwege wie den NF- κ B, die mitogen-aktivierte Protein-Kinase etc. aktiviert. Die hochregulierten Signalwege sind für die Induktion einiger Reaktionsmechanismen verantwortlich, beispielsweise der induzierbaren NO-Synthase, der an der Prostaglandinsynthese beteiligten Cyclooxygenasen, NADPH-Oxidase sowie einiger Proteasen, einschließlich Matrix-Metalloproteasen und Plasminogenaktivatoren. Bezogen auf die im nächsten Kapitel dargelegte Trypanosomiasis sind hier unter anderem die Arbeiten von Figarella *et al.* (2018) – die induzierbare NO-Synthase betreffend – bzw. von Speidel *et al.* (2022) – die Metalloproteasen betreffend – zu erwähnen, wobei Speidel *et al.* (2022) noch keine Metalloprotease identifizieren konnten (s. 1.4.4).

1.4 *Trypanosoma brucei* ssp. als Erreger der HAT

Die Afrikanische Schlafkrankheit (oder auch Humane Afrikanische Trypanosomiasis, HAT) – sowohl die west- als auch die ostafrikanische Form – ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die durch die den Menschen befallenden protozoischen Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*Tbr*, ostafrikanische Form) und *Trypanosoma brucei gambiense* (*Tbr*, westafrikanische Form) ausgelöst wird. Für tierische Wirte gibt es noch eine Vielzahl weiterer Arten (beispielsweise *Trypanosoma brucei brucei* [*Tbb*]). Als Vektor dient die in Afrika südlich der Sahara endemische Tsetse Fliege (*Glossina palpalis* spp.). Die beiden o.g. Formen sind geografisch entlang des Great Rift Valley streng getrennt. Für *Tbr* stellen Tiere den Haupt- und der Mensch lediglich einen Nebenwirt dar, wobei die ostafrikanische Form beim Menschen seltener auftritt, dafür aber einen deutlich

fulminanteren Verlauf nimmt. Dies ist auf eine bedeutend schlechtere Anpassung an den Menschen als Wirt zurückzuführen. Der Verlauf der ostafrikanischen Variante lässt sich als akute Erkrankung, die unbehandelt mit dem Tod innerhalb einiger Wochen bis Monate endet, entsprechend gravierender als die westafrikanische beschreiben. Die westafrikanische Form verläuft eher chronisch, langsam über Jahre progredient, endet aber unbehandelt ebenfalls tödlich (Brun und Stich, 2010; Aebischer *et al.*, 2011; Schlüter, 2019).

1.4.1 Klinischer Verlauf und Therapie der HAT

Die HAT verläuft nach einer lokalen Entzündungsreaktion und Erreichen des Blutkreislaufes des Wirts via Lymphbahnen in zwei klinischen Stadien. Einige Wochen nach Übertragung des Erregers durch einen Biss der Tsetsefliege treten Symptome des hämatolymphatischen Stadiums (Stadium 1) wie Kopf- und Gliederschmerzen, Abgeschlagenheit, Hautausschlag, Hepato- und Splenomegalie, Juckreiz, Ödeme, Lymphadenopathie, Schüttelfrost und Fieber auf. Im meningoenzephalitischen Stadium (Stadium 2) stehen zentralnervöse Symptome im Rahmen einer Meningoenzephalitis im Vordergrund, beispielsweise Verwirrtheit, Umkehr des Schlaf-Wach-Rhythmus, Krampfanfälle, Kataplexie bis hin zum Koma. Unbehandelt beträgt die Letalität 100% (Brun und Stich, 2010; Aebischer *et al.*, 2011; Schlüter, 2019). Der Erregernachweis erfolgte früher mittels Blutaussstrich oder Lymphknotenpunktion; eine zerebrale Beteiligung wird mittels Liquordiagnostik nachgewiesen (Aebischer *et al.*, 2011). Auch wurden seit 2012 mehrere Antigenschnelltests zur Diagnose von *Tbg*-HAT entwickelt, welche aber nach wie vor der parasitologischen Bestätigung bedürfen. Darüber hinaus existieren serologische Verfahren (Trypanolyse, ELISA, Immunfluoreszenz) sowie molekulargenetische Testungen (World Health Organization, 2021). Die Therapie erfolgte bis vor kurzem mangels besserer Alternativen mit sehr nebenwirkungsreichen Medikamenten – abhängig von Subspezies der Erreger und Krankheitsstadium sowie abhängig von patientenspezifischen Faktoren – überwiegend intravenös (i.v.), intramuskulär (i.m.) und selten *per os* (p.o.) (World Health Organization, 2019). Zur Behandlung von *Tbg* wurden bisher die Medikamente Eflornithin (i.v.), Melarsoprol (i.v.), Nifurtimox (p.o.) und Pentamidin (i.m.)

sowie für die Behandlung von *Tbr* Melarsoprol (i.v.), Pentamidin (i.m.) und Suramin (i.v.) eingesetzt, wobei die *Tbr*-HAT bei verzögerter Behandlung innerhalb weniger Wochen zu Multiorganversagen führen und in das Stadium 2 voranschreiten kann. Die Patienten im Stadium 1 sind dabei mit weniger nebenwirkungsreichen Therapieregimen bedacht worden als Patienten im Stadium 2; allerdings zeigten diese Therapien auch kaum bis keine Wirkung bei Patienten im Stadium 2. Umgekehrt waren die Nebenwirkungen der Therapieregime für das Stadium 2 zu gravierend, um ihren Einsatz bei Erkrankungen im Stadium 1 zu rechtfertigen. Entsprechend galt Pentamidin i.m. für *Tbg* im Stadium 1 und eine Nifurtimox-Eflornithin-Kombinationstherapie i.v. im Stadium 2 als Erstlinientherapie. Eflornithin- oder Melarsoprolmonotherapien (Zweit- und Drittlinientherapie) wurden kaum genutzt (World Health Organization, 2019).

Ergänzend zur gerade geschilderten Therapie und ihren Nebenwirkungen, wurde 2019 Fexinidazol (p.o.) als erste rein orale Therapie in die Behandlungsleitlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Behandlung der *Tbg*-HAT in Stadium 1 und weniger schwer verlaufenen Fällen des Stadiums 2 aufgenommen; die Behandlung der *Tbr* bleibt davon vorerst unberührt (World Health Organization, 2019). Dabei basiert die Auswahl der Therapie auf Alter und Körpergewicht des Patienten sowie Liquorbefund. Für Patienten ab 6 Jahren und ab 20 kg Körpergewicht (kg KG) gilt bei weniger als 100 Leukozyten pro μl *Liquor* Fexinidazol als Erstlinientherapie, bei nicht durchführbarer Liquoruntersuchung oder mehr als 100 Leukozyten pro μl *Liquor* eine Nifurtimox-Eflornithin-Kombinationstherapie. Bei Patienten unter 6 Jahren oder unter 20 kg KG wird bei unter fünf Leukozyten pro μl *Liquor* und nicht nachweisbaren Trypanosomen Pentamidin empfohlen. Bei mehr als 5 Leukozyten pro μl *Liquor* oder nachweisbaren Trypanosomen sowie bei nicht durchführbarer Liquoruntersuchung eine Nifurtimox-Eflornithin-Kombinationstherapie.

Zu den häufigeren, teils lebensbedrohlichen, Nebenwirkungen von **Pentamidin** gehören Anaphylaxie, Blutbildveränderungen, Elektrolyt- und Stoffwechsel- sowie Blutdruckentgleisungen, Azotämie, Diabetes Mellitus, Hyp- und Parästhesien, Pankreas- und Leberentzündungen, Hämaturie, akutes Nierenversagen, Stevens-Johnson-Syndrom, Rhabdomyolyse, Übelkeit und Erbrechen sowie

Schmerzen, sterile Abszesse oder Nekrosen an den Injektionsstellen (*Fachinformation zu Pentacarinat ® 300 mg*, 2013; World Health Organization, 2019).

Bei **Melarsoprol**, einem arsenhaltigen Medikament, sind letale hämorrhagische Enzephalitiden, Übelkeit und Erbrechen, Diarrhoe, Fieber, Juckreiz, Kopfschmerzen, Krampfanfälle bis zum Koma, neurologische Störungen, Wesensveränderungen, Hepatotoxizität, Pruritus, exfoliative Dermatitis, Herz- und Nierenversagen als Nebenwirkungen bekannt (World Health Organization, 2019).

Eflornithin ist ein Ornithin-Decarboxylase-Inhibitor, der lediglich intravenös verfügbar ist. Eflornithin ist in Kombination mit Nifurtimox eine der aktuellen Standardtherapien der *Tbg*-HAT und sollte auch als Kombinationstherapie verabreicht werden. Nebenwirkungen sind Phlebitiden, Abszesse, Sepsis, Knochenmarktoxizität (Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie), Fieber, Husten, Kopf- und Bauchschmerzen, Pruritus, Hypertonie, Übelkeit und Erbrechen, Diarrhoe, therapierefraktäre Krampfanfälle und Koma. Die Knochenmarktoxizität sowie lokale und systemische Infektionen wurden – passend zur reduzierten Eflornithin-Dosis – unter Nifurtimox-Eflornithin-Kombinationstherapie deutlich seltener beschrieben als unter Eflornithin-Monotherapie (WHO Expert Committee on the Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis.,2013; World Health Organization, 2019). Darüber hinaus wurden Resistenzen des Erregers beschrieben (Kennedy, 2013).

Zu den Nebenwirkungen von **Nifurtimox** (p.o.) gehören Gewichtsverlust und Magersucht, Schwindel, Krampfanfälle, Vergesslichkeit, Orientierungslosigkeit, Depressionen, Reizbarkeit, Schläfrigkeit, Insomnie, Parästhesien sowie gastrointestinale Störungen wie Durchfall und Erbrechen. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf Teratogenität während der Schwangerschaft (Coura und de Castro, 2002; Castro, de Mecca und Bartel, 2006; World Health Organization, 2019).

Obwohl **Suramin** zahlreiche Enzyme inhibiert (beispielsweise RNA-Polymerase und -Kinasen, Thymidinkinase, Urease, Hexokinase, Fumarase, Trypsin, reverse Transkriptasen etc.), woraus sich eine Vielzahl an Nebenwirkungen ableiten ließe und auch lebensbedrohliche sowie tödliche Verläufe beschrieben wurden, gilt Suramin als sicherste Therapie der HAT. Als häufige Nebenwirkungen werden Fieber und Nephrotoxizität beschrieben. Des Weiteren sind Urtikaria,

Kreislaufdysregulationen, exfoliative Dermatitis, hämolytische Anämien, periphere Neuropathien, Knochenmarktoxizität (Agranulozytose, Thrombozytopenie) und reaktive Enzephalopathien beschrieben (WHO Expert Committee on the Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis, 2013).

Fexinidazol ist ein Nitroimidazol-Derivat, das ab sechs Jahren und 20 kg KG als orales Medikament zur Behandlung der *Tbg*-HAT zur Verfügung steht. Die Einnahme sollte zu einer ausreichend großen und fettreichen Mahlzeit stattfinden. Zu den somatischen Nebenwirkungen gehören Übelkeit, Erbrechen, Kraftlosigkeit, Appetitverlust, Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Tremor, Schwindel, QT-Zeitverlängerungen sowie Neutropenie. Hinzu kommen Nebenwirkungen wie Halluzinationen, Agitation, Logorrhö, Verhaltensveränderungen sowie Angst- und psychotische Störungen (World Health Organization, 2019).

Es wird also deutlich, dass aufgrund der vielseitigen, schweren und häufigen Nebenwirkungen sowie der teils obligat intravenösen oder intramuskulären Anwendung (Eflornithin, Pentamidin, Melarsoprol, Suramin) und den damit verbundenen Risiken (Infektion, Blutung etc.) sowie der Resistenzentwicklung (Eflornithin, Melarsoprol) und der Erregerspezifität (Eflornithin, Nifurtimox) lange keine gute Therapie (im Sinne der Verträglichkeit und Anwendung sowie der nötigen Infrastruktur) für die HAT zur Verfügung stand.

Die Situation wurde durch die Einführung von Fexinidazol zumindest teilweise verbessert. Bezüglich der fulminanten Krankheitsverläufen, den ausgeprägten Nebenwirkungsprofilen, der für die Therapien teilweise notwendigen Infrastruktur sowie der *Tbr*-HAT besteht allerdings weiterhin ein erheblicher Forschungsbedarf.

1.4.2 Lebenszyklus von *Tb ssp.*

Abbildung 7 dient als Schaubild für den komplexen Lebenszyklus von *Tb ssp.* und veranschaulicht die unterschiedlichen Lebensphasen in den unterschiedlichen Wirten (Tsetsefliege und Säuger) sowie die damit verbundenen Phasen der Entwicklung des Erregers. Der Mensch kann als Wirt je nach Subspezies des Parasiten Haupt- oder Nebenwirt sein. Als Zwischenwirt dienen sechs *Glossina*-Subspezies, wobei sowohl männliche als auch weibliche Fliegen als Überträger

dienen. Abhängig von der Art des Zwischenwirtes, Temperatur und Umwelt dauert der intravektorielle Lebenszyklusabschnitt 25 bis 50 Tage. Die Fliegen bleiben ihr Leben lang, also zwei bis drei Monate, infektiös (Despommier, Gwadz und Hotez, 1995). Noch ausführlicher kann der Zyklus beispielsweise bei Mogk (2014) nachgelesen werden.

Der gesamte Lebenszyklus findet extrazellulär statt. Nach Infektion während einer Blutmahlzeit (1) einer Tsetsefliege wandern die Erreger über die Lympheflüssigkeit in den Blutkreislauf und entwickeln sich zu sog. Blutform-Trypanosomen (2). Über den Blutkreislauf werden sie im ganzen Körper verteilt und erreichen so auch andere Körperflüssigkeiten wie beispielsweise den *Liquor*, aber auch andere Organe, etwa Herz, aber insbesondere das ZNS. *Tbr* invadiert den *Liquor* innerhalb weniger Wochen; *Tbg* kann im Schnitt nach 300 bis 500 Tagen im ZNS nachgewiesen werden (WHO Expert Committee on the Control und Surveillance of Human African Trypanosomiasis, 2013). Die Fortpflanzung erfolgt mittels Zellteilung (3). Im Verlauf der Infektion entwickeln sich einige sog. *long slender*-Erreger zu sog. *short stumpy*-Erregern weiter. Diese sind im aktuellen Wirt nicht mehr teilungsfähig, aber infektiös für Fliegen. Sie sind nicht lange überlebensfähig im Blutkreislauf des Wirtes und sterben intermittierend ab, während die *long slender* sich weiterhin teilen können (WHO Expert Committee on the Control und Surveillance of Human African Trypanosomiasis, 2013). So entsteht eine oszillierende Parasitämie im Blutkreislauf des Wirtes (Hamm *et al.*, 1990; Hesse *et al.*, 1995; Reuner *et al.*, 1997; Kubata *et al.*, 2000); s. auch **1.4.3**. Bei der nächsten Blutmahlzeit einer Tsetsefliege nimmt diese die Erreger auf (4, 5), und die zweite Hälfte des Zyklus beginnt. Im Mitteldarm der Fliege entwickeln sich die Erreger zu prozyklischen Trypanosomen und vermehren sich weiter mittels Zellteilung (6). Dann verlassen sie den Mitteldarm und entwickeln sich zu Epimastigoten (7). Diese infiltrieren die Speicheldrüse der Fliege und setzen die Zellteilung fort (8). Hier wandelt sich ein Teil der Erreger in metazyklische trypomastigote Zellen um. Nun kann sich der Kreislauf wiederholen (WHO Expert Committee on the Control und Surveillance of Human African Trypanosomiasis, 2013; CDC - Parasites - African Trypanosomiasis - Biology, 2022). Sexuelle Reproduktion ist nicht obligatorisch, kommt bei Trypanosomen aber vor. Diese

findet offenbar zwischen dem Mitteldarm und der Speicheldrüse im Fliegenwirt unter der Bildung klassischer haploider Gameten statt (WHO Expert Committee on the Control und Surveillance of Human African Trypanosomiasis, 2013).

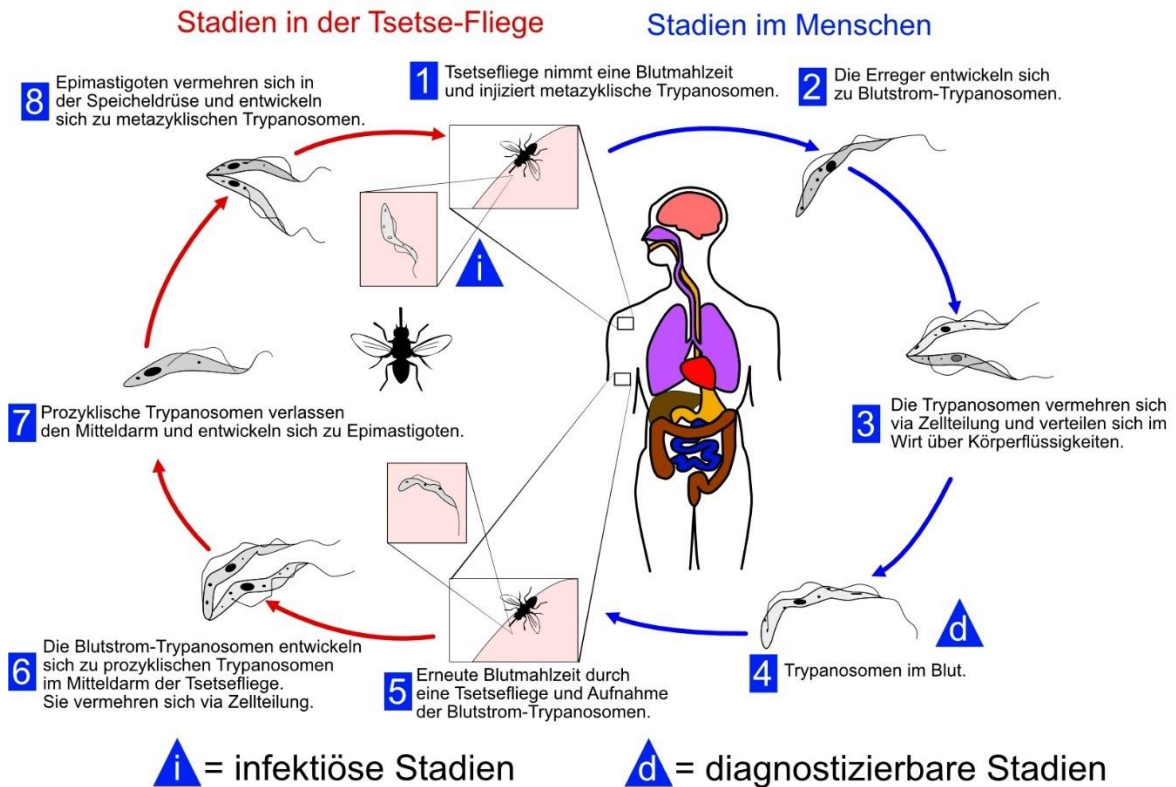


Abbildung 7: Lebenszyklus *Tb ssp.*

Die Abbildung zeigt den Lebenszyklus von *Tb ssp.* Nach Infektion während einer Blutmahlzeit (1) einer Tsetsefliege wandern die Erreger über die Lymphflüssigkeit in den Blutkreislauf des menschlichen Wirtes und entwickeln sich zu sog. Blutstrom-Trypanosomen (2). Es erfolgt eine ungeschlechtliche Fortpflanzung mittels Zellteilung (3). Durch die Blutmahlzeit infizieren sich Fliegen beim Menschen (4, 5). Im Fliegenwirt passen sich die Parasiten an den Fliegenwirt an, vermehren sich mittels Zellteilung (6), bereiten sich auf die Transfektion auf den Menschen vor (7) und wandern in die Speicheldrüse der Fliege ein (8). Von hier an kann der Kreislauf neu beginnen. Abbildung angelehnt an ‚Centers for Disease Control und Prevention‘ (2022).

1.4.3 Zellmorphologien von *Tb ssp.*

Wie von Mogk (2014) in seiner Dissertation bzw. seiner Arbeitsgruppe (Mogk, Meiwes, Boßelmann, *et al.*, 2014; Mogk, Meiwes, Shtopel, *et al.*, 2014; Mogk *et al.*, 2017) ausführlich beschrieben, handelt es sich bei afrikanischen Trypanosomen um einzellige, eukaryote, geißeltragende Protozoen. Ihre Länge variiert zwischen 10 und 40 µm. Es werden trypomastigote und epimastigote Formen

unterschieden. Die Unterscheidung erfolgt anhand der Positionen von Geißel und Zellkern zueinander. Bei der trypomastigoten Form liegt die Geißelbasis posterior des Zellkerns, bei der epimastigoten Form anterior. Die Trypomastigoten werden weiterhin in eine längliche (*long slender*) und eine kürzere Form (*short stumpy*) unterschieden. Zwischen der *long slender*- und *short stumpy*-Form existieren weitere intermediäre Varianten. Ein funktionelles Korrelat der unterschiedlichen Trypomastigoten-Morphologien ist nicht bekannt, allerdings wird vermutet, dass die länglicheren Formen besser an das Leben in den Meningen angepasst sind, da sie im Blut überwiegend *intermediate*- und *short stumpy*-Formen nachweisen konnten (Mogk, Meiwes, Shtopel, *et al.*, 2014).

Kubata *et al.* (2000) fanden heraus, dass Prostaglandine nicht nur von den Wirtsorganismen produziert, sondern auch von den Trypanosomen produziert werden und das Prostaglandin $F_{2\alpha}$ als Wachstumsfaktor für die Trypanosomen fungieren könnte. Figarella *et al.* (2005, 2006) konnten darüber hinaus nachweisen, dass Prostaglandin D_2 Apoptose in den Blutstrom-Trypanosomen auslöst und dieser Prozess oxidativen Stress einschließt. Interessanterweise lösen die Parasiten über Prostaglandin D_2 Apoptose in der eigenen *short stumpy*-Population aus (Figarella *et al.*, 2005). Die *short stumpy*-Formen sterben dann binnen vier Tagen ab, wenn sie nicht durch einen Wirt aufgenommen werden. Die Infektion wird dann über Zellteilung der *long slender*-Form im menschlichen Wirt aufrechterhalten (s. 1.4.2). Bereits Ross und Thomson (1910) beschrieben eine oszillierende Parasitämie. Dieser Oszillation liegen nicht nur die oszillierenden und populationsregulierenden Prostaglandinspiegel zu Grunde, sondern insbesondere auch der Umstand, dass die Zellmembran der Blutform-Trypanosomen einer dichten Schicht von *variant surface glycoprotein* (VSG) umgeben ist (Cross, 1975). Der VSG-Mantel umgibt den gesamten Parasiten, einschließlich der Geißel und der Geißeltasche. Gegen dieses VSG bildet das wirtseigene Immunsystem Antikörper, um den Parasiten zu eliminieren (Figarella *et al.*, 2020). Allerdings verändert sich die Zusammensetzung der VSG-Antigene im VSG-Mantel der unterschiedlichen protozoischen Individuen schneller als das Immunsystem passende Antikörper produzieren kann (Cross, Wirtz und Navarro, 1998). Laut Overath und Engstler (2004) sind Endo- und Exozytose auf den Bereich der Flagellumtasche

beschränkt, was die Undurchlässigkeit des dichten VSG-Mantels für Antikörper gegen tiefer liegende Zielproteine unterstreicht. Durch die VSG-Variation kommt es also auch zu einer Variation der gegen das VSG gerichteten Antikörper und konsekutiv zu einer unzureichenden, aber anhaltenden Immunreaktion. Das Immunsystem ist quasi dauerstimuliert und kann die Infektion trotzdem nicht adäquat beherrschen (Figarella *et al.*, 2020). Diese andauernde Stimulation des Immunsystems dürfte seinerseits wiederum zur Ausschüttung immunstimulierender körpereigener Substanzen führen, welche prinzipiell auch Auswirkung auf das zentralnervöse Immunsystem haben können (s. **1.3.4**).

1.4.4 ZNS-Invasion im Rahmen einer Infektion mit *Tb ssp.*

Wie genau der Parasit im Rahmen der Infektion in das ZNS bzw. ZNS-assoziierte Strukturen gelangt, ist nach wie vor nicht oder nur teilweise geklärt. Prinzipiell muss aber mindestens eine anatomische Barriere (Blut-Hirn- / Blut-Liquor- oder Blut-Arachnoidea-Schranke) überwunden werden oder die Invasion über eine anatomische Struktur stattfinden, in der diese Barriere nicht oder nicht so stark ausgebildet ist, etwa entlang der Virchow-Robin-Räume, über fenestrierte Kapillare oder über die ZVO, die zum einen eng mit dem Liquorraum und fenestrierten Kapillaren in Verbindung stehen, zum anderen auch erheblich für die Physiologie des zirkadianen Rhythmus mit verantwortlich sind. Der zirkadiane Rhythmus wird im meningoenzephalitischen Stadium der HAT maßgeblich beeinflusst. Für das Überwinden der jeweiligen Barriere selbst kommen ebenfalls zwei Varianten in Frage: transzellulär oder parazellulär (Wolburg *et al.*, 2012).

Wie oben beschrieben, wäre ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke also ein prinzipiell denkbarer Infektionsweg. Einige Studien scheinen diese Möglichkeit zu bestätigen, auch wenn der Mechanismus unklar ist (Masocha *et al.*, 2004; Amin *et al.*, 2010, 2012). Frevert *et al.* (2012) berichtet über ein direktes ‚unphysiologisches‘ Eindringen der Parasiten in das Gehirnparenchym, wenn die Infektion der Mäuse mit einer hohen Parasitendichte, die während eines normalen Infektionsverlaufs aber für gewöhnlich gar nicht erreicht wird. Entgegengesetzt dazu waren in anderen Studien Blutform-Trypanosomen nicht fähig, länger im

Gehirnparenchym oder *Liquor* zu überleben oder sich zu teilen (Bafort, Schmidt und Molyneux, 1987; Wolburg *et al.*, 2012; Mogk, 2014). Bei Mogk (2014) führte eine Injektion der Erreger in die Seitenventrikel regelmäßig zur Parasitämie und in den *Ventrikeln* sowie den Meningen konnten dann große Mengen an Erregern nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Protozoen vom inneren Liquorraum aus, die gesamte Peripherie des Wirtsorganismus befallen können. Eine Kokultivierung von *Tbb* mit Astrozyten führte dagegen zu einer Verkürzung der Lebensdauer von *Tbb*. Darüber hinaus fand Mogk (2014) neben den gewöhnlichen *long slender*- und *short stumpy*- Formen im Blut eine vermeintlich weitere *slim*-Form, die noch dünner und länger als die *long slender*-Form war, nach ihrer Entdeckung dann aber auch im Blut nachgewiesen werden konnte. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass diese *slim*-Form eine mögliche morphologische Variante sein könnte, die nötig ist, um das ZNS zu invadieren. Anhand der in den *Plexus choroidei* nachgewiesenen Dichte an Trypanosomen bewertete Mogk (2014) die Lebensbedingungen eher als limitiert. Die meisten Parasiten konnten in dieser und anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe in der *Pia mater* nachgewiesen werden. Entsprechend wäre ein Überwinden der Blut-Liquor-Schranke und eine darauffolgende Verbreitung über den *Liquor* des Ventrikelsystems sowie eine Besiedlung der *Pia mater* ebenfalls ein denkbarer Infektionsweg (Wolburg *et al.*, 2012; Mogk, 2014; Mogk, Meiwes, Boßelmann, *et al.*, 2014). Da in diesem Stadium noch keine Enzephalitis im eigentlichen Sinne beobachtet wurde, empfahlen Wolburg *et al.* (2012) eine Unterscheidung des zweiten klinischen HAT-Stadiums in eine meningeale/meningitische und ein enzephalitisches Stadium, wobei nicht alle Tiere das enzephalitische Stadium vor ihrem Tod erreicht haben. Diesen Umstand griffen Mogk *et al.* (2017) auf und benannten dieses rein meningeale Stadium ‚*ventricular meningeal stage*‘, also etwa ‚ventrikulomeningeales‘ Stadium. Der Übergang des meningealen Stadiums kann nach einer langen Zeitdauer erfolgen oder ausbleiben. Das vorgeschlagene dritte Stadium der Enzephalitis erfolgt aufgrund massiver Infiltration der Trypanosomen in das Gehirnparenchym. Eine Repopulation des Blutes im typischen oszillierenden Verlauf könnte entsprechend von der *Pia mater* ausgehen (Wolburg *et al.*, 2012; Mogk, 2014; Mogk, Meiwes, Shtopel, *et al.*, 2014).

Die an die *Pia mater* angrenzende *Glia limitans superficialis* scheint ein unmittelbares Eindringen der Parasiten in das Gehirnparenchym zu verhindern. Stattdessen könnte der Parasit den Virchow-Robin-Räume entlang der gehirnversorgenden Blutgefäße folgen, um tiefere Regionen zu erreichen. Entweder schafft der Erreger es irgendwann über die *Glia limitans superficialis* (unterhalb der *Pia mater* und in der Region der Virchow-Robin-Räume) oder er infiltrierte das Gehirnparenchym über die Blut-Hirn-Schranke (Speidel *et al.*, 2022).

Die Population der Parasiten wird durch Ausschüttung von Prostaglandin D₂ durch die Parasiten selbst reguliert. Es werden auch weitere Prostaglandine (E₂, F_{2α}) sezerniert. Erhöhte Prostaglandin-D₂-Spiegel führen dann zur Apoptose, überwiegend der *short stumpy*-Formen (Figarella *et al.*, 2005, 2006; Duszenko *et al.*, 2006). Metabolite und Prostaglandine werden dann vermutlich über Abgabe in den *Liquor* entsorgt. In späteren Erkrankungsstadien können auch erhöhte Prostaglandinspiegel im *Liquor* nachgewiesen werden (Pentreath *et al.*, 1990), diese könnten aber ebenso wirtseigene Prostaglandine sein (Jennings *et al.*, 1979; Figarella *et al.*, 2005). Diese erhöhten Prostaglandinspiegel könnten mitverantwortlich für die zentralnervösen Symptome im Krankheitsverlauf sein, da insbesondere die ZVO in Ventrikelnähe liegen und mit dem prostaglandinreichen *Liquor* in Kontakt treten könnten; gleichzeitig wird insbesondere die Invasion der ZVO durch die Parasiten beschrieben. Wie bereits erwähnt, sind die ZVO entscheidend an der Regulation des zirkadianen Rhythmus beteiligt (Kristensson *et al.*, 2010). Akanuma *et al.* (2020) konnten zeigen, dass die Elimination von Prostaglandin D₂ im ZNS während inflammatorischer Prozesse deutlich reduziert wird und dass diverse Kanalproteine in der Blut-Hirn-Schranke für die Elimination relevant zu sein scheinen. Des Weiteren treten im Rahmen einer Infektion mit *Tb ssp.* auch weitere Organbesiedlungen auf, beispielsweise der Hoden. Ähnlich der Blut-Hirn-Schranke verfügt die von den Sertoli-Zellen gebildete Blut-Spermien-Barriere über *tight junctions*, die mithilfe von Claudin-11-Molekülen gebildet wird, weswegen eine Interaktion mit Claudin-11 zur Disposition gestellt wurde (Wolburg *et al.*, 2012).

Die Morphologie der Trypanosomen könnte für die Invasion des ZNS bzw. in ZNS-nahen Strukturen eine große Rolle spielen (Mogk, 2014; Mogk, Meiwes,

Boßelmann, *et al.*, 2014; Speidel *et al.*, 2022). Speidel *et al.* (2022) untersuchten *in vitro* einen möglichen Infektionsweg über die Epithelzellen der *Plexus choroidei*. Sie hielten ein parazelluläres Eindringen im Bereich der *Plexus choroidei* für wahrscheinlicher als ein transzelluläres, da die Zellgrößen von *Tbb* und den Epithelzellen der *Plexus choroidei* vergleichbar sind. Für eine transzelluläre Passage durch die Zellen der jeweiligen Barriere wäre ein intrazelluläres Stadium der Parasiten notwendig; in den Lehrbüchern wird *Tbb* allerdings als obligat extrazellulär ohne jegliche intrazelluläre Phase beschrieben. Bonnet *et al.* (2017) warfen die Frage auf, ob es dennoch ein intrazelluläres Stadium geben könnte, indem sie ein Bild zeigten, auf dem ein Trypanosom innerhalb einer CMH-5-MG unter *in vitro* Bedingungen zu sehen war und interpretierten dies so, dass der verwendete *Tb*-Stamm die Fähigkeit besitzt, das Zytoplasma menschlicher MG zu infiltrieren. Auch einige wenige andere Studien konnten bereits afrikanische Trypanosomen innerhalb anderer Zellen, beispielsweise in Epithelzellen der *Plexus choroidei* oder Astrozyten, nachweisen (Ormerod und Venkatesan, 1971; M O Abolarin *et al.*, 1982; Abolarin, Stamford und Ormerod, 1986; Stoppini *et al.*, 2000). Abolarin *et al.* (1986) interpretieren ihre Ergebnisse sogar dahingehend, dass *Tb* aktiv die Ependymzellen invadieren und innerhalb dieser Zellen weiterleben. Stoppini *et al.* (2000) identifizierten lebende intrazelluläre Trypanosomen innerhalb von Astrozyten. Allerdings ist unklar, ob diese intrazellulären Trypanosomen sich teilen konnten oder auch wieder in den Extrazellularraum gelangen könnten. Sie gaben aber auch zu bedenken, dass *T. cruzi*, der Erreger der südamerikanischen Chagas-Krankheit, ein intrazellulärer Erreger und mit *Tb* verwandt ist. Wolburg *et al.* (2012) konnten elektronenmikroskopisch Erreger im Stroma der *Plexus choroidei* und im Ventrikelsystem nachweisen, nicht jedoch zwischen oder innerhalb der Epithelzellen der *Plexus choroidei*. Auch bei Figarella *et al.* (2018) gibt es keinen Hinweis auf intrazelluläre Trypanosomen. Dies schließt eine transzelluläre Passage zwar nicht aus, macht sie aber unwahrscheinlicher. Allerdings können auch Leukozyten teilweise trotz ihrer Größe transzellulär immigrieren (Steinmann *et al.*, 2013), was die Immigrationsfähigkeit abhängig von der Größe zumindest relativiert.

Für eine parazelluläre Passage stellen die *tight junctions* der Epithelzellen ein zu

überwindendes Hindernis dar. Speidel *et al.* (2022) fanden *in vitro* heraus, dass die Zerstörung der *tight junctions* die Transmigrationseffizienz über eine artifizielle Membran um den Faktor 10 erhöht. *In vivo* sind einige Mechanismen bekannt, für die Metalloproteasen zur Überwindung der *tight junctions* verwendet werden (Kleiner und Stetler-Stevenson, 1999). In der Arbeit von Speidel *et al.* (2022) konnte zwar noch keine beteiligte Metalloprotease identifiziert werden, allerdings wurde eine mögliche mechanische Öffnung des interzellulären Spalts mittels der Geißeln oder zumindest eine mechanische Komponente zur Öffnung der *tight junctions* ebenfalls zur Disposition gestellt, da Scherkräfte die Funktion von *tight junctions* beeinflussen können (Citi, 2019).

Bentivoglio *et al.* (2018) beschreiben eine Invasion der *Eminentia mediana*. Dafür mussten die Erreger die durch *tight junctions* verbundenen Tanyzyten überwinden. Zwar wäre hier das Kapillarendothel auch gefenestert, allerdings sind sowohl die Trypanosomen als auch Leukozyten deutlich größer als die Kapillarfenestierungen (60 nm) oder die schlitzförmigen Poren (5 nm), sodass sie eher über postkapilläre Venolen einwandern könnten. Die gefenesterten Kapillaren können ihre Fenestrierungen auf metabolische Signale hin auch vergrößern, aber ob dies im Rahmen der Inflammation erfolgt, ist nicht bekannt. Von der *Eminentia mediana* ausgehend scheinen die Erreger die angrenzenden *Ncl. arcuati* zu invadieren. Da die Blutgefäße hier über eine Blut-Hirn-Schranke verfügen, könnte das Eindringen mutmaßlich über eine Grenzzone erfolgt sein, in der die Tanyzyten keine *tight junctions*, sondern nur über adhärente Verbindungen in Kontakt stehen sollen.

Im enzephalitischen Stadium scheinen Chemo- und Zytokine sowie Interferone (IFN) oder Tumornekrosefaktoren (TNF) eine direkte oder indirekte Rolle zu spielen (beispielsweise CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ). Trypanosomen können Immunzellen dazu bewegen, solche Stoffe (CXCL-10, IFN- γ) zu sezernieren (Kristensson *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2012; Laperchia *et al.*, 2017). Gleichzeitig wurde auch eine IFN- γ -abhängiges Überwinden der *Glia limitans* von sowohl T-Lymphozyten als auch von Trypanosomen beschrieben (Masocha *et al.*, 2004). Zusätzlich können TNF- α und IFN- γ die Transkription der induzierbaren NO-Synthase und damit die NO-Synthese verstärken. NO

wiederum erhöht die Phagozytoseaktivität von MG (Figarella *et al.*, 2018). Im Kapitel 1.2.1 wurden einige dieser und weitere Moleküle bereits als permeabilitätsbeeinflussend genannt (Abbott, Rönnbäck und Hansson, 2006). Rodgers *et al.* (2015) konnten darüber hinaus zeigen, dass das antiinflammatorische IL-10 in ihrem murinen HAT-Modell während der enzephalitischen Phase zu einer Reduktion der Parasitenlast, einer deutlich verbesserten Klinik, geringerer Ausprägung der Enzephalitis führte. Auch senkte die IL-10-Gabe die Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α .

1.4.5 Mikrogliazellen im Rahmen einer Infektion mit *Tb ssp.*

Die Auswahl an Literatur, die sich mit morphologischen Veränderungen der MG im Rahmen einer Infektion mit *Tb ssp.* beschäftigt, ist sehr begrenzt. Zwar wurde gelegentlich über eine diffuse Astrozytose und Mikrogliose sowie über eine ‚mikrogliale Hyperplasie‘ und die Bildung ‚mikroglialer Knötchen‘ berichtet (Chimelli, 2011; Maloba, Ngotho und Rajesh, 2012), aber eine weiterführende morphologische Beschreibung wurde kaum vorgenommen. Chianella *et al.* (1999) berichteten darüber hinaus über morphologische Veränderungen der MG nach Infektion von Ratten mit *Tbb*. Die mikrogliale Morphologie wurde nach zwei Wochen als noch mit den Kontrolltieren vergleichbar beschrieben. Dies könnte damit zusammenhängen, dass ein eher qualitativer Beschreibungsansatz unter teils geringer lichtmikroskopischer Vergrößerung gewählt wurde. Ab der dritten Woche wurde ein Großteil der untersuchten Gewebe als auffällig beschrieben, da es (1) zum Anstieg der Zellzahl und (2) zur Veränderung hin zur hypertrophen Morphologie kam. Hypertrophe MG wurden in der Großhirnrinde, insbesondere in der *Area piriformis* und der ‚Geruchsrinde‘ sowie in periventrikulär und ventral zum Hypothalamus liegenden Regionen beschrieben. Dieses Gebiet erstreckt sich von der präoptischen Region des anterioren Hypothalamus bis zur präammillären Region des posterioren Hypothalamus. Hier war die immunhistochemische Markierung insbesondere in der retrochiasmatischen Region sowie im Bereich der Ncl. arcuati und der hinteren, periventrikulären Kerngebiete sehr stark ausgeprägt. Abgesehen von Chianella *et al.* (1999) konnten in der

Literaturrecherche keine weiteren Arbeiten, insbesondere keine neueren inklusive modernerer Methoden, gefunden werden, die sich mit der mikroglialen Morphologie nach Infektion mit *Tb ssp.* beschäftigen.

Dennoch gibt es Arbeiten, welche die Reaktion der MG auf die Trypanosomen untersucht haben. Beispielsweise konnte *in vitro* gezeigt werden, dass MG die Protozoen phagozytieren können (Figarella *et al.*, 2018). Tatsächlich scheinen die MG dies für gewöhnlich bei Kontakt zu *Tb ssp.* auch *in vivo* zu tun (Bafort, Schmidt und Molyneux, 1987; Wolburg *et al.*, 2012; Mogk, 2014; Mogk, Meiwes, Boßelmann, *et al.*, 2014; Mogk, Meiwes, Shtopel, *et al.*, 2014), was die Frage aufwirft, wieso dies – gemessen an der nachweislich steigenden vitalen Protozoenzahl im Gehirnparenchym – in fortgeschrittenen Krankheitsstadien nicht mehr oder nicht mehr in gewohntem bzw. ausreichendem Ausmaß zu geschehen scheint (Kristensson *et al.*, 2010) oder warum es andererseits auch letale Krankheitsverläufe ohne Invasion des Gehirnparenchyms gibt (Schmidt, 1983). Von Mogk *et al.* (2017) wird in diesem Zusammenhang auch eine Aufteilung des meningoenzephalitischen Stadiums in ein lymphatisches und ein enzephalitisches Stadium vorgeschlagen und diskutiert. Denkbar wäre eine Schwächung des Wirtes durch die systemische Infektion, ggf. verbunden mit Unterernährung bzw. mangelhafter Nährstoffaufnahme und damit einhergehend auch eine Schwächung des Immunsystems oder aber eine direkte Beeinflussung der Immunreaktion durch die Parasiten selbst, beispielsweise durch Ausschüttung hemmender Substanzen. Denkbar wäre auch eine Kombination von beiden. Interessanterweise scheint eine proinflammatorische Systemreaktion die ZNS-Invasion zu begünstigen, wobei u.a. IFN- γ eine große Rolle zu spielen scheint. Gleichzeitig korreliert die ZNS-Invasion der Parasiten offenbar mit der ZNS-Invasion von Lymphozyten (Masocha *et al.*, 2004; Amin *et al.*, 2012). Diese lymphozytäre ZNS-Invasion findet laut Owen *et al.* (2008) vorwiegend im Bereich der postkapillären Venolen statt. MG scheinen nach Kontakt zu den Trypanosomen vermehrt NO zu produzieren, was vermutlich auf eine erhöhte Expression der induzierbaren NO-Synthase zurückzuführen ist (Girard *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 2000; Figarella *et al.*, 2018). Auch bei der Bekämpfung anderer protozoischer Infektionen durch MG – beispielsweise einer Leishmaniose – wurde eine erhöhte Expression

der induzierbaren NO-Synthase aufgrund erhöhter TNF- α -Spiegel beschrieben und diskutiert (Ramos *et al.*, 2014). Dies würde auch mit dem im Kapitel 1.4.3 bereits erwähnten erhöhten oxidativen Stress übereinstimmen. Im Laufe der Zeit wird die mikrogliale Reaktion auf die Infektion immer stärker, was die Infektprogression begünstigen könnte. Quintana *et al.* (2022) veröffentlichten kürzlich die Analyse eines mikroglialen Transkriptomprofils mit der Hochregulation proinflammatorischer Gene und Chemokine, welche auch für neurodegenerative Erkrankungen beschrieben wurden. Gleichzeitig scheint IL-10 die Infektprogression eher zu verlangsamen (Rodgers *et al.*, 2015).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Neurologische Störungen treten in verschiedenen Formen auf und haben fast immer einen erheblichen sozialen, aber auch finanziellen Einfluss auf das Leben der Betroffenen. In entwickelten Ländern umfassen diese Störungen hauptsächlich neurodegenerative, autoimmune und vaskuläre Krankheiten, während infektiöse Krankheiten weltweit immer noch eine bedeutende Rolle spielen. Einige Erreger infizieren das Nervensystem und können Entzündungsreaktionen der Hirnhäute (Meningitis, häufig durch Bakterien) oder des Gehirns (Enzephalitis, meistens durch Viren) auslösen. Bei der Humanen Afrikanischen Trypanosomiasis (HAT), auch bekannt als Afrikanische Schlafkrankheit, handelt es sich um eine parasitäre Erkrankung, die im fortgeschrittenen Stadium eine Meningo-enzephalitis hervorruft. Der Erreger, *Trypanosoma brucei* (*Tb*), induziert eine Aktivierung von Mikrogliazellen (MG).

Zahlreiche wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass MG, ursprünglich als reine makrophagische Immunzellen beschrieben, an fast allen homöostaseerhaltenden Prozessen des Zentralen Nervensystems beteiligt sind. Daher sind sie nicht nur bei der Bekämpfung von Krankheitserregern involviert, sondern auch an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Zusammenhang mit den genannten Pathologien. Ein anerkanntes Prinzip in der Biologie ist es, dass Morphologie und Funktion von Zellen und anatomischen Strukturen eng koordiniert sind und man zumindest teilweise von der einen auf die

andere schließen kann. Daher ist es nicht überraschend, dass sich MG je nach den derzeitigen Reizen oder Reaktionen, auf die sie reagieren, mit unterschiedlichen Morphologien präsentieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die morphologische Veränderungen der Mikroglia während der experimentellen Infektion mit *T. brucei* zu charakterisieren. Dabei wurde die Reaktion der Mikrogliazellen sowohl morphologisch als auch hinsichtlich ihrer Proliferation quantitativ beschrieben. Es wurde eine zuverlässige Methode entwickelt, die auf der dreidimensionalen Rekonstruktion mithilfe von Imaris Bitplane basiert. Aufbauend auf dieser Methode wurde eine weitere Methode zur quantitativen morphologischen Analyse der Mikrogliazellen entwickelt. Durch diese Forschungsarbeit wird ein Beitrag zur Erforschung der morphologischen Veränderungen in Mikrogliazellen bei parasitären Infektionskrankheiten des ZNS geleistet. Die entwickelten Methoden ermöglichen eine detaillierte quantitative Analyse der Mikrogliazellen und tragen so zum Verständnis der zugrunde liegenden pathologischen Prozesse bei.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die Tabelle 1 bis Tabelle 5 geben einen Überblick über die verwendeten Laborgeräte, Instrumente, Software, Chemikalien und Antikörper.

2.1.1 Laborgeräte und Instrumente

Tabelle 1: Laborgeräte und Instrumente

In der Tabelle sind alle verwendeten Laborgeräte und Instrumente aufgeführt.

Gerätename	Hersteller	Modell
Gefrierschrank -80°C	ThermoScientific	Forma 900 Series
Gefrierschrank - 20°C	Liebherr	Liebherr Comfort
Inkubator	Heidolph	Titramax 100
Kühlschrank 4°C	Liebherr	PremiumFrost
Kryostat	Leica	Cryostat CM 1950
Lichtokular, WF 10x/21B	Wild Heerbrugg (Leica Plc.)	Leica 10447160
Magnet-Heiz-Inkubator	Heidolph	MR 3001
MembraPure-Astacus	membraPure GmbH	MembraPure-Astacus
Mini-Zentrifuge	Labnet International Inc	SN 1104 1604
Pipetten	Eppendorf	2,5 µl / 10 µl / 20 µl / 100 µl / 200 µl und 1000 µl
Vortex Gene 2	Scientific Industries	G560E
Waage	Swiss Quality	Precisa 185 AM-FR
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft GmbH Dresden	WB 5mT 8344102
Zwei-Photonenmikroskop mit verbauten PMTs	Olympus	Olympus BXS1WI
	Olympus	FV 300 Laser Scanning Confocal System
Laser	MaiTai (Spectra Physics)	
40x-Objektiv	Nikon Japan	NIR ApO 40x/0.80

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Chemikalien

In der Tabelle sind alle verwendeten Medien, Puffer, Lösungen und weitere Chemikalien aufgeführt.

Produktname	Hersteller	Bestellnummer	Chargennummer
Bovines Serumalbumin	SERVA	11930	200084
Eselnormalserum	Jackson Immuno Research	017-000-121	148302 148577 149841
Kryogel	Leica	39475237	22816
MembraPure	entnommen via MembraPure-Astacus		
NaCl	VWR Chemicals	27810.295	20B184138
NaH ₂ PO ₄	Roth	K300.1	478274044
Na ₂ HPO ₄	Roth	P030.1	476250920
Natriumcitratpuffer (10 mM)	vierwöchentliche Herstellung, siehe unten		
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	wöchentliche Herstellung, siehe unten		
Prolong Gold Antifade Mounting Medium	Invitrogen	P36930	2184480 2204416
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth	4088.1	067250905
Tissue Tek	Sakura	4583	2005702829
Triton X – 100	Sigma	T9284	053K00262V
Tween 20	Sigma	P9416	SLCB0668

Natriumcitratpuffer (10 mM)

Es wurden 2,941 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat in 990 ml MembraPure-Aqua gelöst.

Danach wurde mit ca. 4 ml 1 M HCL auf pH 6,0 ad 1000 ml eingestellt. Dann wurden 0,5 ml Tween 20 unter stetigem Rühren (Magnetrührer) zugegeben. Der Puffer wurde bei 4° C gelagert und innerhalb von vier Wochen verbraucht.

Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4 (PBS)

Zuerst wurde ein Liter einer zehnfachkonzentrierten PBS-Lösung hergestellt. Hierfür wurden in etwas MembraPure-Aqua nacheinander 2,6 g NaH₂PO₄ (Molekulargewicht 137,99 g/mol), 11,36 g Na₂HPO₄ (Molekulargewicht 11,36 g/mol) und 87,5 g NaCl (Molekulargewicht 58,44 g/mol) gegeben und gelöst. Nach Überführung in einen Messkolben wurde auf 1000 ml aufgefüllt und mittels Magnetrührer inkubiert. Über einen Faltenfilter wurde die zehnfache PBS-Lösung filtriert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Für die einfache PBS-Lösung wurden 900 ml Membra Pure Wasser mit 100 ml der zehnfachen PBS-Lösung vermischt und anschließend der pH-Wert gemessen. Die pH-Einstellung auf pH 7,4 erfolgte mittels 2 M NaOH (Ausgangs-pH ca. 6,6 - 7,3; der Verbrauch an 2 M NaOH lag bei ca. 100 - 150 µl).

2.1.3 Primäre Antikörper

Tabelle 3: Primäre Antikörper

In der Tabelle sind alle verwendeten primären Antikörper aufgeführt.

Antikörper	Wirtspe- zies	Hersteller	Bestell- nummer	Chargennum- mer(n)
Anti-CD68	Rat	BioRAD - AbD Serotec	MCA1957	1807
Anti-iba-1	Goat	Fujifilm Wako Chemicals	CAF1113	011-27991
Anti-TMEM119	rabbit	abcam	Ab209064	GR3211941-22 GR3211941-23

2.1.4 Sekundäre Antikörper

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

In der Tabelle sind alle verwendeten sekundären Antikörper aufgeführt.

Antikörper	Wirt	Produktname	Wellenlänge	Hersteller	Bestellnummer	Chargennummer
anti-goat	donkey	Alexa Fluor 488	488 nm	Invitrogen	A11055	2134018
Anti-goat	donkey	Alexa Fluor 594	594 nm	Invitrogen	A11058	2045324
Anti-rabbit	donkey	Alexa Fluor 488	488 nm	Invitrogen	A21206	2045215
anti-rat	donkey	Alexa Fluor 594	594 nm	Invitrogen	A21209	2160060

2.1.5 Software

Tabelle 5: Software

In der Tabelle sind alle verwendeten Softwareprogramme aufgeführt.

Softwarename	Entwickler	Version
Fiji (ImageJ)	open source	
Fluoview	Olympus	5.0
GraphPad Prism	GraphPad Software	8.0.2
Imaris x64	Bitplane AG	9.6.0
Spectra-Physics Mai Tai	Spectra-Physics	0454-8260 Rev E

Zur Bedienung des Zwei-Photonen-Mikroskops wurde die Software Spectra-Physics Mai Tai und zur Sichtung sowie Einstellung, Justierung und Aufnahme die Software Fluoview benutzt. Die Bildbearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen wurde je nach Fragestellung entweder mit Fiji (ImageJ) bzw. Imaris Bitplane durchgeführt (siehe Methoden). Die Auszählung der mit Fiji bearbeiteten Bilder erfolgte mittels Microsoft Powerpoint. Die Datenverarbeitung und eine ggf. notwendige Korrektur (siehe Methoden) wurden mittels Microsoft Excel

vorgenommen. Die grafische und statistische Aufarbeitung und Analyse der exportierten und ggf. korrigierten Daten erfolgte durch GraphPad Prism (siehe Methoden).

2.1.6 Gewebe

Das Institut stellte mir das nötige Gewebe aus einem früheren, von der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen finanzierten Projekt zur Verfügung (Fortüne Program, Projektnummer 2465-0-0, Titel: *The role of microglia for controlling parasite invasion of the central nervous system: in vivo analysis in a mouse model of African Trypanosomiasis*, Beginn: April 2018), sodass Injektion/Infektion, Opferung, Perfusion der Mäuse und Entnahme sowie Fixierung des Gewebes bereits erledigt waren. Entnommen wurde das Gewebe zwischen Oktober 2018 und Juni 2019. Gelagert wurde das fixierte Gewebe bei einer Temperatur von -80 °C. Das genannte Gewebe wurde für die vorliegende Arbeit im Zeitraum von Juni bis Oktober 2020 verwendet.

Gewebeart

Bei dem untersuchten Gewebe handelt es sich um Gehirne (ohne *bulbi olfactorii*) von 30 ausgewachsenen, weiblichen und vier bis sechs Monate alten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Die Tiere wurden unter als ‚*Specific-pathogen-free*‘ klassifizierten Bedingungen in einem 12-stündlich wechselnden Tag-/Nachtrhythmus mit *ad libitum* Zugang zu Wasser und Nahrung in Raum 11 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Wilhelmstr. 56, 72074 Tübingen) für das Tübinger Institut für Neurophysiologie gehalten. Bis zum Abschluss der Vorbereitungen wurden die Tiere zusammen, danach (*post infectionem*) einzeln gehalten. Das Wohlbefinden der Tiere wurde mittels eines Scoring-Systems täglich kontrolliert und dokumentiert.

Untersuchungs- und Kontrollgruppen

Die Mäuse wurden in sechs Gruppen mit jeweils fünf Tieren aufgeteilt: jeweils eine Gruppe, die zehn (10dpi), zwanzig (20dpi) oder dreißig Tage (30dpi) nach intraperitonealer Infektion (infec) mit *Trypanosoma brucei brucei* ([*Tbb*], Stamm: GVR 35 m-Cherry) geopfert wurden, sowie die jeweiligen Kontrollgruppen (ctrl),

die zehn (10dpi), zwanzig (20dpi) bzw. dreißig Tage (30dpi) nach intra-peritonealer Injektion einer PBS-Lösung geopfert wurden.

Gehirnareale

Es wurden der periventrikuläre Raum (PVR), die *lateral preoptic area* (LPA) und der Kortex untersucht, da in der Literatur bezüglich dieser Regionen eine Anfälligkeit für parasitäre Invasion beschrieben wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemische Verfahren

2.2.1.1 Schneiden des Gewebes

Das Gewebe wurde im Kryostaten bei -20 °C mit 50 µm Schnittdicke koronar geschnitten. Die ersten ‚Anschnitte‘ wurden verworfen, dann wurde weiter geschnitten, bis die oben genannten Hirnareale im Schnitt mithilfe von Anatomieatlanten (Paxinos und Franklin, 2007; Franklin und Paxinos, 2008) unter dem Lichtokular aufzufinden waren und anschließend wurden diese vorsichtig mit einem Pinsel in mit PBS gefüllte Well-Platten überführt. Abschließend folgten fünf Waschgänge mit PBS.

2.2.1.2 Labeling

Angefertigt wurden von jeder Maus jeweils mindestens drei Objektträger sowie jeweils Negativkontrolle, Kontrolle zum Primärantikörper und Kontrolle zum Sekundärantikörper.

Zur Färbung wurden zwei Labeling-Protokolle verwendet: ein anti-iba-1-/anti-CD68-Protokoll und ein anti-TMEM119-/anti-iba-1-Protokoll. Den Tabelle 3 und Tabelle 4 können alle Informationen zu den primären und sekundären Antikörpern entnommen werden. Verwendete Instrumente und Chemikalien sind in den Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgelistet.

2.2.1.2.1 anti-iba-1-/anti-CD68-Labeling

Für das anti-iba-1-/anti-CD68-Protokoll wurden die Schnitte zunächst für zwei Stunden in einer PBS-Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Diese

bestand aus PBS mit einem Zusatz von 10% Eselnormalserum sowie 1% Triton X – 100. Danach wurde das Gewebe für 24 Stunden mit der antikörperhaltigen Lösung bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung bestand aus PBS mit einem Zusatz von 10% Eselnormalserum, 1% Triton X – 100 sowie den primären Antikörpern goat-anti-iba-1 (1:500) und rat-anti-CD68 (1:1000). Nach dieser Inkubation erfolgten fünf Waschgänge mit PBS. Danach wurden die Schnitte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für zwei Stunden in einer anderen Antikörperlösung inkubiert. Diese bestand dieses Mal aus PBS und enthielt 2% Bovines Serumalbumin sowie die sekundären Antikörper donkey-anti-rat Alexa Fluor 594 sowie donkey-anti-goat Alexa Fluor 488 jeweils im Anteil von 1:1000. Eine weitere Auswertung des CD68-Labeling erfolgt in dieser Arbeit nicht, da eine ähnliche Auswertung am Institut bereits kürzlich durchgeführt wurde (Güçer, 2019) und lediglich das gleiche Protokoll verwendet wurde.

2.2.1.2.2 anti-TMEM119-/anti-iba-1-Labeling

Für das anti-TMEM119-/anti-iba-1-Protokoll wurde zunächst ein Antigen-Retrieval durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in Natriumcitratpuffer (10 mM) überführt, die Wellplatten wasserdicht verschlossen und für 15 Minuten bei 95°C im Wasserbad inkubiert.

Sobald die Schnitte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden die Schnitte für zwei Stunden in einer PBS-Blockierlösung inkubiert. Diese bestand aus PBS mit einem Zusatz von 10% Eselnormalserum sowie 1% Triton X – 100. Nach dieser Inkubation erfolgten fünf Waschgänge mit PBS. Danach wurde das Gewebe für 72 Stunden mit der antikörperhaltigen Lösung bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung bestand aus PBS mit einem Zusatz von 10% Eselnormalserum, 1% Triton X – 100 sowie den primären Antikörpern rabbit-anti-TMEM119 (1:400) und goat-anti-iba-1 (1:500).

Nach dieser Inkubation erfolgten wiederum fünf Waschgänge mit PBS. Danach wurden die Schnitte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für zwei Stunden in einer anderen Antikörperlösung inkubiert. Diese bestand dieses Mal aus PBS und enthielt 2% Bovines Serumalbumin sowie die sekundären Antikörper donkey-anti-rabbit Alexa Fluor 488 sowie donkey-anti-goat Alexa Fluor 594 jeweils im Anteil von 1:1000.

2.2.1.3 Montieren

Daraufhin erfolgten abermals fünf Waschgänge mit PBS. Dann wurden die Schnitte auf einem Objektträger montiert. Nachdem die Schnitte korrekt ausgerichtet und leicht angetrocknet waren, wurde ein Tropfen Prolong Gold Antifade Mounting Medium auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden mit einem passenden Deckglas bedeckt und die Ränder mit einem farblosen, handelsüblichen Nagellack aus einem örtlichen Drogeriemarkt versiegelt. Die bestückten Objektträger wurden nach der Montage lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Zweiphotonenmikroskopie

Je nach zugrundeliegender Fragestellung wurden unterschiedliche Labeling-Protokolle, Hirnareale und unterschiedliche Einstellungen am Laser bzw. in der Fluoview-Software verwendet. Tabelle 6 gibt Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Fragestellung und verwendetem Labelingprotokoll bzw. die verwendeten Antikörper sowie die jeweils untersuchten Hirnareale. Auch wird jedem Zweck eine Kategorie (A, B oder C) zugewiesen. Auf diese Kategorisierung wird später (u.a. in weiteren Tabellen) immer wieder Bezug genommen. Für die 30dpi Aufnahmen der Kategorie A ist des Weiteren zu erwähnen, dass sie nicht selbst aufgenommen und ausgewertet wurden, sondern dies im Rahmen der Masterarbeit von Speidel (2020) geschah, die in Kooperation des Instituts für Neurophysiologie und des Interfakultären Instituts für Biochemie (beide Universität Tübingen) verfasst wurde.

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mittels Zweiphotonenmikroskopie (Hersteller Olympus, s. Tabelle 1: Laborgeräte und Instrumente) in den Hirnarealen Kortex, PVR und LPA. Lediglich für Kategorie C wurden ausschließlich Aufnahmen des Kortex gemacht. Für diese Aufnahmen der Kategorie C wurden eine höhere Auflösung und ein höheres Zoom gewählt, um für die Rekonstruktionen eine bessere Bildqualität zu erhalten. Tabelle 7 zeigt die unterschiedlichen Einstellungen für Vergrößerung, Zoom und Auflösung, Tabelle 8 stellt die Abmessungen der Bilderstapel über die Bildgröße der jeweiligen Kategorie. Das Volumen V in μm^3 eines Bilderstapels entspricht dem Produkt aus x , y und z (Maße entnommen aus Tabelle 8). Entsprechend wurden alle Bilder mit 400-facher

optischer Gesamtvergrößerung aufgenommen. Hinzu kommt ein zwei- bzw. vierfacher Digitalzoom.

Tabelle 6: Kategorisierung

In dieser Tabelle ist jeder Fragestellung eine Kategorie zugeordnet und die jeweils untersuchten Hirnareale und das verwendete Labeling aufgeführt. Die Kategorisierung wird später immer wieder aufgegriffen.

Kategorie	Ziel des Labelings	primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Hirnareale
A	Bestimmung des Anteils TMEM71/IBA-1 ⁺	rabbit-anti-TMEM119 & goat-anti-iba-1	donkey-anti-rabbit Alexa Fluor 488 & donkey-anti-goat Alexa Fluor 594	Kortex, PVR, LPA
B	Bestimmung der Zelldichte und Anzahl der Duplets	goat-anti-iba-1 & rat-anti-CD68	donkey-anti-goat Alexa Fluor 488 & donkey-anti-rat Alexa Fluor 594	Kortex, PVR, LPA
C	Rekonstruktionen der Somata und Fortsätze	goat-anti-iba-1 & rat-anti-CD68	donkey-anti-goat Alexa Fluor 488 & donkey-anti-rat Alexa Fluor 594	Kortex

Tabelle 7: Vergrößerung

Die Tabelle gibt einen Überblick über Zweck, Vergrößerung und Auflösung der aufgenommenen Images aus den jeweiligen Kategorien.

Kategorie	Vergrößerung (Okular)	Vergrößerung (Objektiv)	Zoom (Software)	Auflösung	Z-Achse (Tiefe)
A	10x	40x	2x	512 x 512	25 µm
B	10x	40x	2x	512 x 512 640 x 480	25 µm
C	10x	40x	4x	1024 x 1024	25 µm

Tabelle 8: Image-Abmessungen

Die Tabelle stellt die Abmessungen der Bilderstapel der jeweiligen Kategorien dar.

Kategorie	Auflösung	Maße		
		x [μm]	y [μm]	z [μm]
A	512 × 512	177,173	177,173	25
B	512 × 512	177,173	177,173	25
	640 × 480	200,156	150,156	
C	1024 × 1024	177,173	177,173	25

Zu Beginn einer Aufnahme wurden die jeweiligen Areale unter hundertfacher Vergrößerung mittels eines Lichtokulars und Anatomieatlanten (Paxinos und Franklin, 2007; Franklin und Paxinos, 2008) aufgesucht und grob voreingestellt. Die sekundären Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 800 nm angeregt und das emittierte Signal durch einen Strahlenteiler (580 nm) geleitet. Um das emittierte Licht selektiv zu übertragen, wurde ein BP510/84-Filter für den grünen Kanal (iba-1 oder TMEM119) und ein LP568-Filter für den roten Kanal (iba-1 oder CD68) benutzt. Anschließend wurden unter zweiphotonenmikroskopischer Sicht ein aufzunehmender Bereich gesucht und der Schnitt unter Sicht in Z-Ebene durchgefächert, um zu gewährleisten, dass das Labeling tief genug in das Gewebe eingedrungen ist. Dabei wurden die Grenzen der Z-Ebene in der Fluoview-Software definiert. Danach wurde in Mikrometerschritten eine automatisierte Aufnahme des definierten Bereichs durch die Software durchgeführt (für die Aufnahmen der Kategorie C ist zu beachten, dass bei jeder Aufnahme jeweils lediglich eine Zelle im Fokus lag, sodass hier sichergestellt werden musste, dass diese Zelle in allen drei Ebenen mittig liegt). Bei allen Aufnahmen wurde ein Kalman-Filter-Algorithmus von vier in der Fluoview-Software eingestellt, um Rauschen oder andere Ungenauigkeiten zu filtern.

Danach wurden die Aufnahmen des Bilderstapels auf Vollständigkeit, Qualität und Verwendbarkeit überprüft, die Lasereinstellungen dokumentiert und der Bilderstapel gespeichert. Dieser Vorgang wurde für jede Aufnahme wiederholt. Tabelle 9 zeigt, welche Einstellungen für die beiden im verwendeten Lasersystem

integrierten *photomultiplier tubes* (PMT), die Laserintensität usw. für die jeweiligen Kategorien gewählt wurden.

Tabelle 9: Einstellungen am Lasersetup

Die Tabelle gibt einen Überblick, welche Einstellungen am Lasersetup für die jeweiligen Kategorien getroffen wurden.

Kategorie	Intensität	PMT (488nm)	PMT (594 nm)	Offset (488 nm)	Offset (594 nm)
A	300	660 bis 760	610 bis 660	2 bis 8	0
B	250 bis 270	700	630	0	0
C	250 bis 300	660 bis 700	660	0 bis 4	0

Auch die Anzahl der aufgenommenen Bilder pro Maus bzw. Hirnareal variierten abhängig von ihrer Kategorie und damit von der dahinterstehenden Fragestellung. Für die Kategorien A und B wurden für jede Maus drei Schnitte und pro Schnitt drei Aufnahmen für jeweils jedes der drei Hirnareale gemacht, sodass für jedes Areal in jeder Untersuchungsgruppe $5 * 3 * 3 = 45$ Aufnahmen ausgewertet wurden. Eine Untersuchungsgruppe umfasst die Aufnahmen von jeweils fünf Mäusen aus einem Areal. Entsprechend wurden für die Kategorien A und B insgesamt (also sechs Untersuchungsgruppen á fünf Mäusen und drei untersuchte Areale) $45 * 6 * 3 = 810$ Bilderstapel aufgenommen. Wie bereits erwähnt, wurden für die Kategorie A keine eigenen 30dpi-Aufnahmen angefertigt (Speidel, 2020).

Für die Kategorie C wurden mindestens 15 Aufnahmen aus mindestens drei Schnitten pro Maus angestrebt, um $5 * 15 = 75$ Aufnahmen pro Untersuchungsgruppe (alle im Kortex) zu erhalten. Tatsächlich ergaben sich 12 bis 18 Aufnahmen pro Maus.

2.2.3 Bildbearbeitung

Bildbearbeitung mittels Fiji ImageJ

Mittels Fiji ImageJ (imagej.net/Fiji, NIH, v.1.53) wurden die 26 Einzelschnitte in einem Abstand von 1 μ m der anti-TMEM119-/anti-iba-1-Aufnahmen (Kategorie

A) zu einem *Z-Stack* gestapelt, und die beiden Kanäle übereinandergelegt (*merge*) und in ihrer Intensität normiert. Die Normierung der Intensität erfolgte mittels der Fiji-eigenen Histogramme. Für den anti-iba-1-Kanal wurde eine Intensität von 1000 – 4000 und für den anti-TMEM119-Kanal von 100 – 3000 gewählt. Je nach Intensität des Labelings musste im anti-TMEM119-Kanal leicht variiert werden, sodass die Intensität teilweise auch auf 100 – 2000 eingestellt werden musste. Danach kam mittels ‚GECIquant‘-Erweiterung ein sogenannter *background subtraction* Filter zur Anwendung, um die Zellen leichter vom Hintergrundbild unterscheiden zu können. Pro Maus wurden drei Aufnahmen pro Gewebeschnitt und mindestens drei unterschiedliche Gewebeschnitte geimaged, sodass pro Maus $3 * 3 = 9$ bzw. pro Gruppe $3 * 3 * 5 = 45$ Bilderstapel aufgenommen und untersucht wurden. Gezählt wurden nur Zellen, deren Somata vollständig im Bilderstapel aufgenommen waren. Abhängig von Gehirnareal und Gruppenzuteilung wurden so für 10dpi und 20dpi zwischen 50 und 193 Zellen gezählt und ausgewertet. Im Vergleich stehen nach 30dpi abhängig von Gruppenzuteilung und Gehirnareal lediglich 13 – 83 Zellen zur Verfügung, da Speidel (2020) nur 1/3 der Schnitte ausgewertet hat.

Die so entstandenen Bilder wurden in eine Powerpointpräsentation überführt, die einzelnen Zellen gezählt und in Microsoft Excel notiert. Hierbei wurden zwei Gruppen angelegt: anti-TMEM119⁺/anti-iba-1⁺, d. h. Zellen, die sowohl mit anti-TMEM119 als auch anti-iba-1 markiert wurden, und anti-TMEM119⁻/anti-iba-1⁺, d.h. Zellen, die mit anti-iba-1, nicht aber mit anti-TMEM119 markiert wurden. Der Anteil der anti-TMEM119⁻ / anti-iba-1⁺-Zellen berechnet sich dann entsprechend aus dem Verhältnis $\frac{n(\text{anti-TMEM119}^-)}{n(\text{anti-iba-1}^+)}$.

Bildbearbeitung mittels Imaris Bitplane

Die Auswertung der Aufnahmen der Kategorien B und C erfolgten durch Imaris Bitplane (Version 9.6):

In den Aufnahmen der Kategorie B wurden Zellkörper mit der *Spot*-Funktion manuell identifiziert und deren Abstand zum nächsten gemessen. Analog zur Neubauer-Zählkammer wurde dabei versucht, angeschnittene Zellen dreier Seiten nicht mitzuzählen und die angeschnittenen Zellen der drei jeweils

gegenüberliegenden Seiten schon. So konnte eine Zellzahl pro Bilderstapel und der Abstand zum jeweiligen nächsten Nachbarn (*distance to nearest neighbour*) exportiert und mit Microsoft Excel weiterverarbeitet werden.

In den Aufnahmen der Kategorie C wurden die Zellkörper der einzelnen Zellen mit dem *Surface*-Algorithmus rekonstruiert, um *area* (Objektoberfläche der *Surface*-Objekte), *volume* (Volumen) und *sphericity* (‚Kugelförmigkeit‘) zu bestimmen. Um die Berechnungsdauer zu verkürzen, wurde grob optisch eine *region of interest* (ROI) definiert (die Zelle von Interesse war immer in der Mitte des Bilderstapels). Alle weiteren Variablen und Einstellungen wurden weitestgehend bei den von der Software empfohlenen Standardeinstellungen belassen, um die Ergebnisse des Algorithmus objektiv und vergleichbar zu halten. Dies bedeutet, dass das Glätten der Objektoberfläche auf einem Detaillevel von 0,173 µm und das *Thresholding* des Algorithmus auf *absolute intensity* mit automatischer Begrenzung belassen wurde. Es folgte eine akribische Überprüfung der Ergebnisse auf ihre Richtigkeit, worauf sie exportiert und mit Microsoft Excel weiterverarbeitet wurden. Insgesamt wurden jeweils 13 bis 28 SO pro Tier ausgewertet, die genaue Anzahl kann Anhangstabelle 6 entnommen werden.

Danach folgte die Berechnung der mikroglialen Fortsätze und deren Verzweigung mittels des *filaments*-Algorithmus. Hier wurde ebenfalls zur Verkürzung der Berechnungsdauer grob visuell eine ROI (auch hier befand sich die Zelle von Interesse in der Mitte des Bilderstapels) definiert, die für die Fortsätze deutlich größer ausfiel als für die Zellkörper. Auch beim *filaments*-Algorithmus wurde versucht, alle weiteren Variablen und Einstellungen weitestgehend bei den von der Software empfohlenen Standardeinstellungen zu belassen, um die Ergebnisse des Algorithmus objektiv und vergleichbar zu halten. Allerdings war hier der Bedarf an manuellen Korrekturen, insbesondere an den Enden der Fortsätze, deutlich größer als beim *surface*-Algorithmus. Ein *Starting Point* definiert das Zentrum einer Fortsatzrekonstruktion und sollte entsprechend mittig im Zellkörper liegen. Die Rekonstruktion der Fortsätze erfolgt dann entlang einer Kette von *Seed Points*. Bei der Kalkulation der *Starting Points* soll der größte Durchmesser eines Fortsatzes angegeben werden. Allerdings verwendeten wir den Somadurchmesser, da wir für die Rekonstruktionen alle Fortsätze in einem Objekt haben wollten.

Die Werte für den Somadurchmesser beliefen sich bei den Kontrollgruppen auf 4 bis ca. 7 μm , bei den infizierten Gruppen konnten diese Werte höher ausfallen. Die Kalkulation der *Seed points* basiert auf dem Diameter des dünnsten Fortsatzes, beispielsweise am Fortsatzende. Dies wurde bei der Standardeinstellung von 0,259 μm belassen. Die *Thresholds* für *Starting* und *Seed Points* wurden nicht oder nur geringfügig abgeändert. Der Algorithmus unterstützt des Weiteren die Funktionen *Remove Seed Points Around Starting Point(s)* und *Remove Disconnected Segments*, welche beide verwendet wurden. Der Standardwert für *Remove Seed Points Around Starting Point(s)* war das doppelte des angegebenen größten Diameters für *Starting Points*. Der Standardwert für *Remove Disconnected Segments* war standardmäßig bei 0,259 μm bzw. der Einstellung des Diameters des dünnsten Fortsatzes eingestellt (was in diesem Fall zum gleichen Ergebnis führt). Der *Threshold (Absolute Intensity)* und die *Max Gap Length* (5,18 μm) für die *Remove Disconnected Segments*-Funktion wurden nicht verändert. Der *Threshold (local contrast)* für die Berechnung der *Dendrite Diameter* (hier in der Realität mikrogliale Fortsätze und keine Dendriten) wurde ebenfalls nicht verändert, insbesondere wurde das Volumen oder der Fortsatzdurchmesser nicht ausgewertet. Der Algorithmus wird mit *all done* beendet, um nicht das restliche Bild außerhalb der ROI im Nachhinein mitzuberechnen.

Wie bereits erwähnt, mussten insbesondere die Enden der Fortsätze auf ihre Richtigkeit überprüft und ggf. manuell korrigiert werden. Die Korrektur erfolgte anhand des visuellen Signals der jeweiligen Zelle. Gelöscht wurde dann ein Fortsatzabschnitt an der vorgesehenen Stelle, dann erst erfolgte das Löschen des ggf. übriggebliebenen fälschlichen Restfortsatzes, um zu verhindern, dass die Korrektur zu groß ausfällt.

Da es zu Variationen im Labeling der unterschiedlichen Bilderstapel kam, wurde für die Aufnahmen der Kategorie C der Imaris-eigene *background subtraction*-Filter angewandt, um die Bildqualität auszugleichen (*Filter width* 22,1 μm).

Nach Anwendung des Filters musste der Algorithmus erneut durchgeführt werden. Hierfür wurde die erste Rekonstruktion dupliziert, danach wurde der Algorithmus für das Duplikat wiederholt. Das Vorgehen blieb das gleiche. Die erste Rekonstruktion diente als Plausibilitätsvorlage bei den manuellen Korrekturen

der zweiten Rekonstruktion. Insgesamt wurden jeweils 12 bis 18 FO pro Tier rausgewertet. Die genaue Anzahl kann der Anhangstabelle 7 entnommen werden.

Da der *filaments*-Algorithmus keine Zellkörper berücksichtigt und deswegen Verzweigungen der Fortsätze innerhalb des Zellkörpers berechnet, wurde die zweite Rekonstruktion abermals dupliziert und an den visuellen Schnittpunkten mit dem *surface*-Objekt abgeschnitten, sodass lediglich eine Rekonstruktion der Fortsätze übrigblieb, die sich visuell innerhalb des jeweiligen *surface*-Objektes befand. Abschließend wurden die Daten exportiert und in Microsoft Excel weiterverarbeitet. Von Interesse waren für den *filaments*-Algorithmus die gesamte Fortsatzlänge (in μm), die Anzahl der Verzweigungs- und Endpunkte sowie die Anzahl der *Sholl-Intersections* (*filament length sum, no. of branch points, no. of terminal points, no. of Sholl-Intersections*).

Abschließend wurde eine Kopie der Imaris-Dateien mit den Zellen der Kategorie C angelegt. In dieser Kopie wurde die Auflösung von 1024×1024 Pixeln Grundfläche auf 512×512 reduziert. Die Daten der rekonstruierten Objekte ändern sich nach der Reduktion der Auflösung nicht. Die Reduktion war nötig, um den in Imaris integrierten MatLab-Algorithmus *convex hull* im Programm ausführen zu können, da dieser keine hohen Auflösungen unterstützte. Dieser Algorithmus generiert ein polyedrisches *Surface*-Objekt, dessen Oberfläche sich über alle Endpunkte des zugrundeliegenden *Filaments*-Objekts überspannt. Dieses Objekt kann als Maß für den von der Zelle überwachten Raum herangezogen werden. Abschließend wurden die Daten exportiert und in Microsoft Excel weiterverarbeitet. Das Vorgehen wurde für jede Zelle der Kategorie C wiederholt.

2.2.4 Datenverarbeitung und -auswertung

Alle Daten wurden nach Generierung bzw. Export zuallererst in Microsoft Excel überführt und für eine statistische sowie graphische Aufbereitung vorbereitet. Die Daten der zur Kategorie A gehörenden Aufnahmen umfassten lediglich manuelle Zählungen und mussten entsprechend nicht weiter ver- oder bearbeitet werden. Es wurden Bilderstapel aus drei Hirnarealen (Kortex, LPA und PVR) erstellt. Pro

Maus wurden pro Hirnareal jeweils drei Aufnahmen aus drei Gewebeschnitten erstellt. Entsprechend erhält man bei fünf Mäusen pro Untersuchungsgruppe $3 * 3 * 5 = 45$ Bilderstapel pro Untersuchungsgruppe und Hirnareal. Abhängig von Gehirnareal, Infektionsdauer und Gruppenzuteilung wurden so zwischen 44 – 282 Zellen bzw. 0 – 21 Duplets gezählt. Konsekutiv errechnet sich damit ein Anteil an Duplets von 0% – 73,20%. Mithilfe von Microsoft Excel wurde dann zunächst das Gesamtvolumen der untersuchten Bilderstapel pro Maus und Hirnareal berechnet. Dieses Gesamtvolumen entspricht der Summe der einzelnen Bilderstapel pro Maus und Gehirnareal. Das Volumen eines Bilderstapels entspricht dem Produkt aus den Abmessungen in x, y und Z-Richtung. Die Z-Ausdehnung wurde für jeden Bilderstapel überprüft und ggf. korrigiert, wenn das Labeling dieses Bilderstapels nicht die vorgesehenen 25 μm ausreichend markiert hat. In Microsoft Excel wurde dann die Zelldichte als $\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Volumen}}$ und die Duplettdichte als $\frac{\text{Dupletzahl}}{\text{Volumen}}$ jeweils in $\frac{1}{\mu\text{l}}$ berechnet.

Das Volumen der zur Kategorie B gehörenden Aufnahmen wurde aus den in Table 8 genannten Daten für jede Aufnahme individuell berechnet (zwei unterschiedliche Aufnahmeformate bzw. -auflösungen). Die Qualität des Labelings in den Bilderstapeln wurde kontrolliert und für die Volumenberechnung, wenn nötig, angepasst, wenn die vorgesehenen 26 Bilder analysiert werden konnten.

Die Zelldichte ergab sich aus Zellzahl pro Volumen. Der Abstand zwischen zwei am nächsten zueinander liegenden Zellen (*distance to nearest neighbour*) wurde direkt aus Imaris exportiert und diente als Maß für die Anzahl der Duplets. Als Duplet wurden alle Zellen mit einem Zell-Zell-Abstand kleiner 20 μm gewertet. Entsprechend treten „Duplets“ immer mindestens zu zweit pro Bilderstapel auf. Analog zur Gesamtzelldichte konnten so Duplets pro Volumeneinheit (Duplettdichte) und der Anteil an Duplets an der Gesamtzellzahl ermittelt werden.

Die Daten der zur Kategorie C gehörenden Aufnahmen lassen sich nach dem zugrunde liegenden Algorithmus (*surface*, *filament* und *convex hull*) unterteilen:

Für den *surface*-Algorithmus wurden die Daten *area* (Objektoberfläche in μm^2), *volume* (Objektvolumen in μm^3) und *sphericity* („Kugelförmigkeit“) bestimmt. Diese *surfaces* (im Folgenden SO) wurden als annähernde Darstellung der Zellkörper interpretiert.

Für die konvexen Hüllen des *convex hull*-Algorithmus wurde ebenfalls das Volumen des berechneten *surface*-Objekts (im Folgenden CHSO) bestimmt. Dieses dient als Maß des von der zugehörigen Zelle überwachten Volumens. Nach der (nachfolgend erklärten) vollständigen Rekonstruktion wurden dann die Volumina der CHSO und der SO für die jeweiligen Zellen in ein Verhältnis gesetzt und der Faktor für den Größenunterschied von überwachtem Volumen zu Somavolumen bestimmt.

Für den *filaments*-Algorithmus wurden *filament length sum* (Fortsatzgesamtlänge in μm), *no of branch points* (Anzahl der Verzweigungspunkte), *no. of terminal points* (Anzahl der Endpunkte) sowie *no. of Sholl-Intersections* (Anzahl der Sholl-Schnittpunkte, abhängig von der Entfernung zum *Starting Point* in μm) bestimmt. Diese *filaments* (im Folgenden FO) wurden als annähernde Darstellung der Fortsatzverzweigung interpretiert.

Die Werte *filament length sum*, *no. of branch points* und *no. of Sholl-Intersections* wurden jeweils um die Werte des *filaments* korrigiert (subtrahiert), das sich lediglich innerhalb des *surface*-Objektes befindet; die *no. of terminal points* wurden unkorrigiert übernommen, da sie keiner Korrektur analog den vorgenannten Korrekturen bedürfen. Für die *no. of Sholl-Intersections* wurde eine *area under the curve* (AUC) berechnet und dargestellt.

Anschließend wurden die Daten aus Microsoft Excel in GraphPad Prism überführt, statistisch getestet und graphisch mittels Box Plots dargestellt.

2.2.5 Statistik

Die statistische Testung wurde mittels GraphPad Prism 8.0.2 durchgeführt. Für sämtliche statistischen Analysen wurde $n = 5$ (Anzahl der Mäuse pro Untersuchungsgruppe) festgelegt.

Zuerst wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test in einem Konfidenzintervall von $\alpha = 0,05$ auf Normalverteilung geprüft. Bei

normalverteilten Daten erfolgte die statistische Testung dann mittels unpaarigem T-Test (one-tailed), bei nicht normalverteilten Daten mittels Mann-Whitney-Test (one-tailed). Eine two-tailed Testung war nicht erforderlich. Bei der Duplettdichte wurde statt dem T-Test eine ANOVA-Testung durchgeführt, da nicht alle Untersuchungsgruppen normalverteilt waren.

Ob die Verteilungen der jeweiligen Gruppen ($n = 5$) normalverteilt sind oder nicht, kann graphisch auch mit einem QQ-Plot dargestellt werden. Anhangsabbildung 1 zeigt stellvertretend für alle erwähnten Tests auf Normalverteilung einen QQ-Plot für die Zelldichte in der LPA der Kontroll- und infizierten Gruppe nach 30dpi. Liegen die Messpunkte auf oder nahe an der Eichgeraden, ist die Wahrscheinlichkeit für Vorliegen einer Normalverteilung hoch. Entsprechendes gilt für die dort gezeigte Verteilung.

3 Ergebnisse

3.1 Zelldichte und Duplets

Zur Feststellung der Zell-Zell-Abstände und der Zelldichte wurden die Positionen der Zellkörper der anti-iba-1⁺ Zellen mittels *Spots* in Bilderstapeln der Kategorie B in Imaris Bitplane bestimmt und der Parameter *distance to nearest neighbour* exportiert. Dieser Parameter gibt den kleinsten gemessenen Zell-Zell-Abstand in Mikrometern an (für Rohdaten vgl. [Anhangsabbildung 3](#) bis [Anhangsabbildung 5](#)). Als Duplet wurde ein Zellpaar mit einem Zell-Zell-Abstand unter 20 µm eingestuft. [Abbildung 8](#) zeigt exemplarisch *Spots* aus Aufnahmen der LPA eines Kontroll- und eines infizierten Tieres.

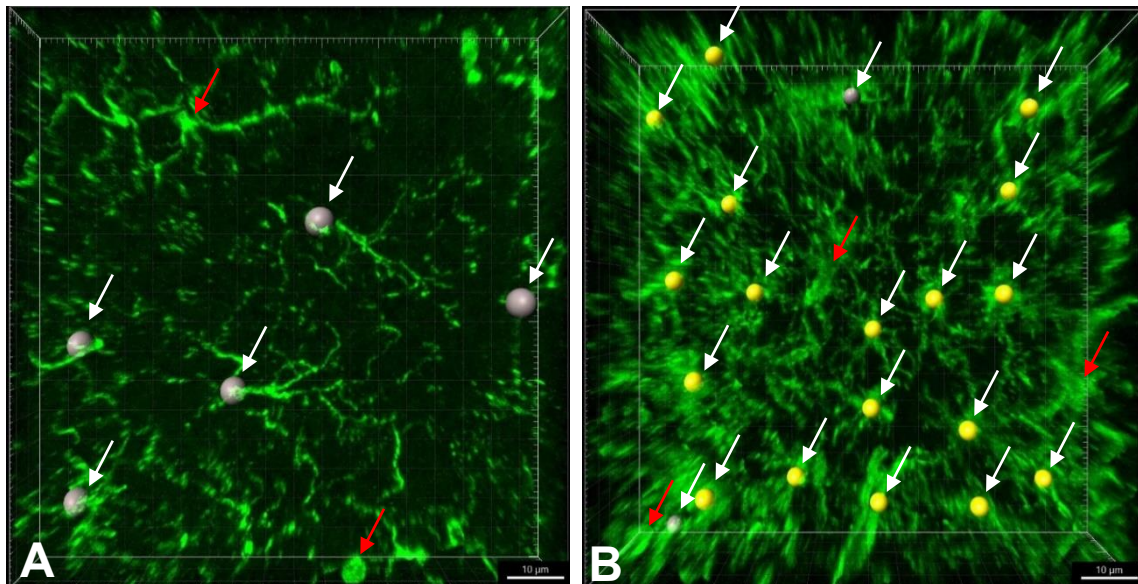


Abbildung 8: Spots und Duplets

Die Abbildung zeigt exemplarisch *Spots* (graue und gelbe Kugeln) zweier Bilderstapel in der LPA in der Imaris Bitplane Software nach 30dpi ([A] Kontroll- und [B] infiziertes Tier). Mit weißen Pfeilen wurden die gezählten Zellen (graue *Spots*) markiert, mit roten Pfeilen angeschnittene Zellen, die nicht gezählt wurden. Die grauen *Spots* zeigen Zell-Zell-Abstände > 20 µm, die gelben < 20 µm und wurden damit als Duplet gewertet. Der Balken in der rechten unteren Ecke entspricht jeweils 10 µm.

Die Ergebnisse der Zelldichte sind der [Anhangstabelle 1](#) und die Ergebnisse der Duplettdichte der [Anhangstabelle 2](#) zu entnehmen. In [Abbildung 9](#) sind die Zelldichten der jeweiligen Gruppen gegeneinander als Box-Whisker-Plots aufgetragen.

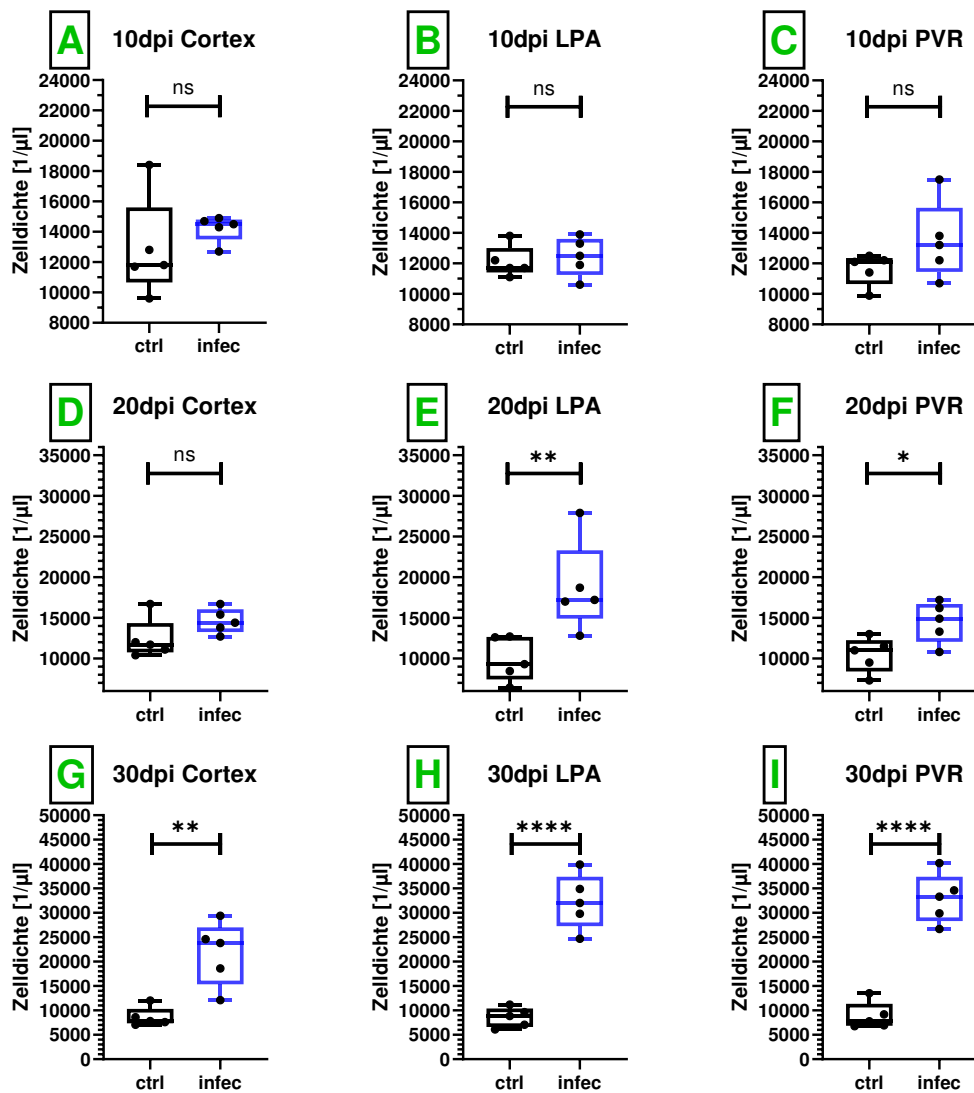


Abbildung 9: Zellichte

In der Abbildung ist die Zelldichte in $\frac{1}{\mu\text{l}}$ der Paarungen aus Kontroll- (schwarz) und infizierter Gruppe (blau) jeweils nach den unterschiedlichen Zeitpunkten und in den unterschiedlichen Arealen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Auf Signifikanz wurde mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test geprüft.

Nach 10dpi ([A], [B] und [C]) finden sich keine signifikanten Unterschiede (ns) zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe ($p = 0,08$ bis $p = 0,33$ je nach Areal). Im PVR ist nach 10dpi ein leichter Anstieg der Zelldichte zumindest angedeutet (C). Im Plot für den Cortex nach 10dpi ist ebenfalls zu erkennen, dass der Median der infizierten Mäuse deutlich über dem der Kontrolltiere liegt (A). Lediglich ein Messpunkt der Kontrollmäuse liegt in (A) weit oberhalb der fünf Messpunkte der infizierten Gruppe.

Nach 20dpi ist der Unterschied im Kortex (D) weiterhin nicht signifikant ($p = 0,064$). In der LPA ($p = 0,0065$) und im PVR ($p = 0,0135$) fand allerdings ein signifikanter Anstieg der Zelldichte statt ([E] und [F]).

Nach 30dpi ([G], [H] und [I]) sind die Unterschiede in der Zelldichte zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe in allen drei untersuchten Arealen signifikant (Kortex [$p = 0,0014$], LPA [$p < 0,0001$], PVR [$p < 0,0001$]).

Die Box-Whisker-Plots in Abbildung 9 zeigen, dass sich die Zelldichten der Kontrollgruppen in allen untersuchten Hirnarealen nicht signifikant voneinander unterscheiden – vergleicht man sie jedoch mit der jeweiligen infizierten Gruppe, fällt auf, dass sich bereits nach 10dpi eine Tendenz zur höheren Zelldichte in den infizierten Gruppen abzeichnet, auch wenn dieser statistisch noch nicht signifikant ist ($p = 0.08$ bis $p = 0,33$ je nach Areal).

Nach 20dpi ist der Median der infizierten Gruppen in den Arealen LPA und PVR gegenüber den Kontrollgruppen bereits auf 150% angestiegen, im Kortex dagegen noch nicht. Der Anstieg ist mit $p = 0,0065$ für LPA und $p = 0,0135$ für PVR jeweils signifikant.

Nach 30dpi ist die Diskrepanz zwischen den Gruppen in allen drei Hirnarealen eindeutig signifikant. Im Kortex ist die mediane Zelldichte nach 30dpi auf etwa 150% ($p = 0,0014$), in der LPA auf etwa 300% ($p < 0,0001$) und im PVR auf etwa 350% ($p < 0,0001$) angestiegen.

Entgegengesetzt dazu zeigt sich ein Rückgang des Zell-Zell-Abstandes in den infizierten Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen (vgl. Anhangsabbildung 2).

Der Anteil an Duplets steigt entsprechend bei längerer Infektionsdauer in den infizierten Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen ebenfalls an.

Die Duplettdichte wurde analog zur Zelldichte mit Anzahl der Duplets pro Volumeneinheit in $\frac{1}{\mu l}$ berechnet. Abbildung 10 zeigt entsprechende Box-Whisker-Plots

zu den Duplettdichten. Es zeigen sich laut ANOVA-Testung erst nach 30dpi signifikante Unterschiede ($p = 0,0014$ bis $0,0040$, je nach Areal), wobei sich Unterschiede in der LPA bereits nach 10dpi und nach 20dpi sowohl im PVR als auch der LPA andeuten. Zu berücksichtigen gilt bei den Duplettdichten generell, dass lediglich kürzlich stattgefundenene Zellteilungen mit dieser Methode detektiert werden. Inwiefern der signifikante Anstieg nach 30dpi auf eine Immigration peripherer Immunzellen zurückzuführen ist, wird später dargestellt.

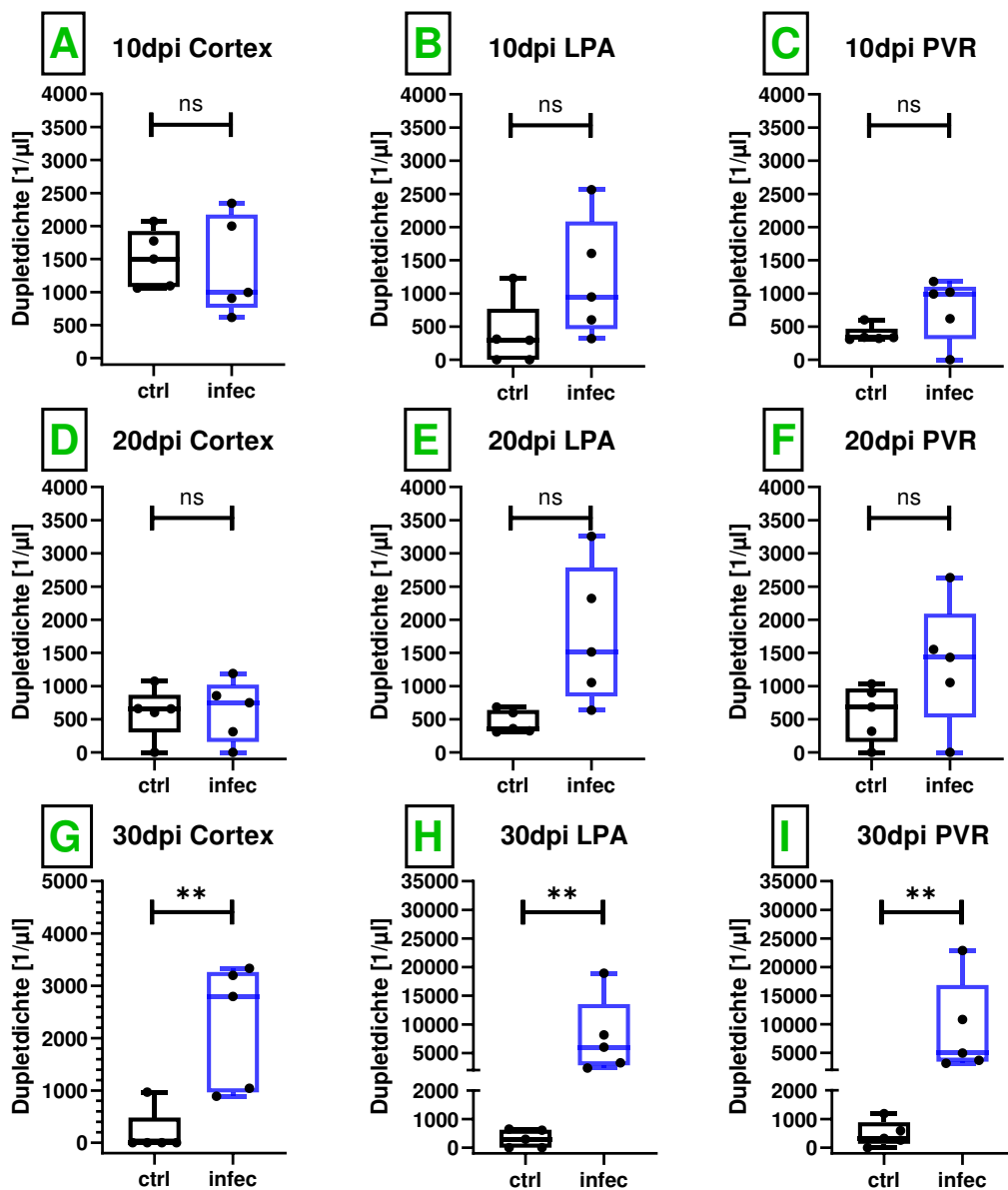


Abbildung 10: Duplettdichte

In der Abbildung ist die Duplettdichte in $\frac{1}{\mu\text{l}}$ der Paarungen aus Kontroll- (schwarz) und infizierter Gruppe (blau) jeweils nach den unterschiedlichen Zeitpunkten und in den unterschiedlichen Arealen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Auf Signifikanz wurde mittels ANOVA-Testung geprüft, da nicht alle Gruppen normalverteilt sind.

Nach 10dpi ([A], [B] und [C]) finden sich keine signifikanten Unterschiede (ns) zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe ($p = 0,2433$ für LPA; für PVR und Kortex $p > 0,9999$). In der LPA und im PVR sind nach 10dpi Anstiege der Duplettdichte angedeutet. Nach 20dpi ([D], [E] und [F]) finden sich nach wie vor keine signifikanten Unterschiede (NS) zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe (Kortex [$p > 0,9999$], LPA [$p = 0,2729$], PVR [$p = 0,6425$]). In der LPA und im PVR zeigen sich weiterhin Tendenzen zu steigenden Duplettdichten. Nach 30dpi ([G], [H] und [I]) sind die Unterschiede in der Duplettdichte zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe in allen drei untersuchten Arealen signifikant (Kortex [$p = 0,0040$], LPA [$p = 0,0014$], PVR [$p = 0,0039$]).

Abschließend lässt sich also festhalten, dass die Anzahl der Immunzellen im Infektionsverlauf in allen drei Arealen – teils tendenziell, teils signifikant – ansteigt. Nach 30dpi sind in allen drei Arealen nicht nur statistisch signifikante Unterschiede, sondern auch große numerische Unterschiede in der tatsächlichen Zell- und Duplettdichte vorhanden.

3.2 Anteil immigrierter Immunzellen

Um auszuschließen, dass es sich bei dem Anstieg von Zell- und vermeintlicher Duplettdichte lediglich um aus der Peripherie eingewanderte Immunzellen handelt, wurde mittels anti-TMEM119-/anti-iba-1-Doppellabeling überprüft, in welchen Arealen nach welchem Zeitpunkt wie viele Zellen aus der Peripherie eingewandert sind. Dieses Doppellabeling ist deshalb geeignet, da das anti-iba-1-Labeling spezifisch für alle Immunzellen (Ohsawa *et al.*, 2004) und das anti-TMEM119-Labeling weitestgehend spezifisch für Mikroglia (Bennett *et al.*, 2016; Satoh *et al.*, 2016, 2019) ist. Entsprechend sind MG zweifach markiert, während immigrierte Immunzellen lediglich mit anti-iba-1 markiert sind.

Dies erfolgte durch Bearbeitung der Aufnahmen der Kategorie A mittels Fiji (BlueJ). Der anti-TMEM119-Kanal wurde gemäß dem verwendeten Antikörper (donkey-anti-rabbit Alexa Fluor 488) grün und der anti-iba-1-Kanal (donkey-anti-goat Alexa Fluor 594) rot dargestellt. Nach Überlagerung der Kanäle (*merge*) erscheinen die Zellen gelb, die auf beide Labelings positiv reagieren. Der Anteil immigrierter Immunzellen wurde bereits in einer Publikation aufgegriffen und veröffentlicht (Uzategui *et al.*, 2023) .

In Abbildung 11 wird dies einmal exemplarisch dargestellt. In den jeweiligen Kanälen bzw. dem *merge* werden die identifizierten Zellen mit weißen Pfeilen markiert. Analog dazu wurden alle Aufnahmen der Kategorie A nach 10dpi und 20dpi mittels Fiji dargestellt, überlagert, in Microsoft Powerpoint gespeichert und manuell ausgezählt. Das Ergebnis wurde in Microsoft Excel festgehalten. Die Aufnahmen der Kategorie A nach 30dpi wurden im Rahmen einer Kooperation des Interfakultären Instituts für Biochemie und dem Institut für Neurophysiologie (beide Universität Tübingen) mit dem gleichen Gewebe für eine Masterarbeit bereits erhoben und werden hier der Vollständigkeit halber erneut aufgegriffen, um

eine Zusammenschau und Vergleich nach allen drei Zeitpunkten zu ermöglichen (Speidel, 2020).

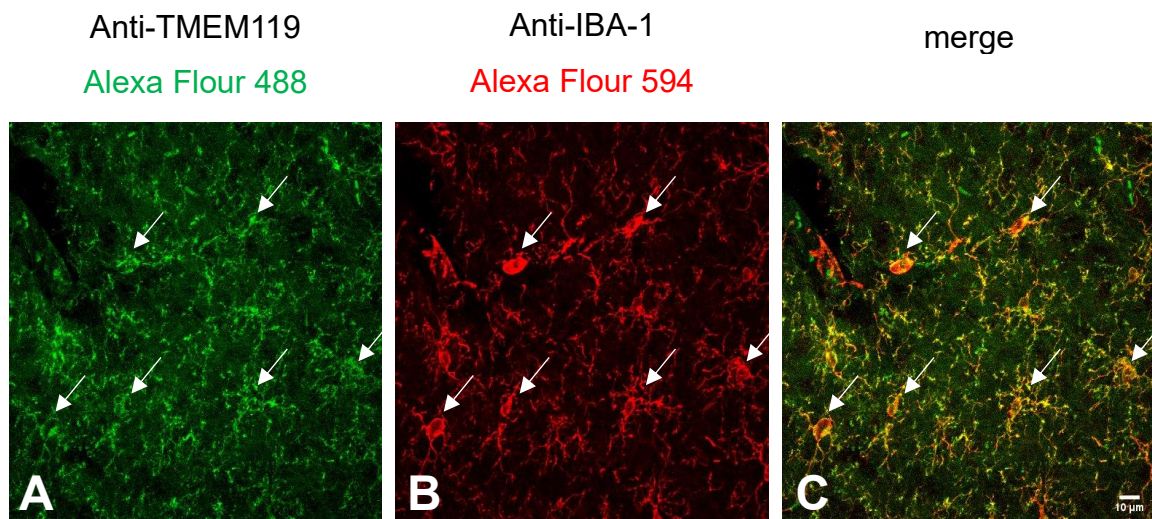


Abbildung 11: Doppellabeling in Fiji

Exemplarische Darstellung des Doppellabelings mit anti-TMEM119 und donkey-anti-rabbit Alexa Flour 488 nach GECI-background subtraction in Fiji (A) sowie anti-iba-1 und donkey-anti-goat Alexa Flour 594 (B) und der Überlagerung beider Kanäle (C). Mit weißen Pfeilen sind die Zellkörper in den jeweiligen Kanälen gekennzeichnet. Die doppelt gelabelten Zellen erscheinen im *merge* gelb. Der Balken in der rechten unteren Ecke von (C) entspricht 10µm.

Die so ermittelten Daten sind in Abbildung 12 als Säulendiagramm dargestellt. Um die Darstellung zu vereinfachen, wurde auf die Darstellung der anti-TMEM119⁺-Zellen verzichtet, da diese alle anti-iba-1⁺ waren. Aus den in Abbildung 12 dargestellten Daten lässt sich ein Anteil anti-TMEM119⁻/anti-iba-1⁺-Zellen von 0% bis 0,5% ablesen. Da im direkten Gruppenvergleich nach 10dpi und 20dpi weder in den Kontroll- noch in den infizierten Gruppen in keinem der drei untersuchten Hirnareale eine erwähnenswerte Anzahl an anti-TMEM119⁻/anti-iba-1⁺-Zellen zu finden war, muss von einem nahezu 100% Proliferationsanteil ausgegangen werden, um den Anstieg der Zelldichten zu erklären.

Für die Gruppen nach 10dpi und 20dpi lässt sich also festhalten, dass die unter 3.1 beschriebenen Anstiege der Zell- und Duplettdichte nicht auf Immigration peripherer Immunzellen zurückführbar sind und einer Proliferation der zentralnervösen Immunzellen entsprechen müssen.

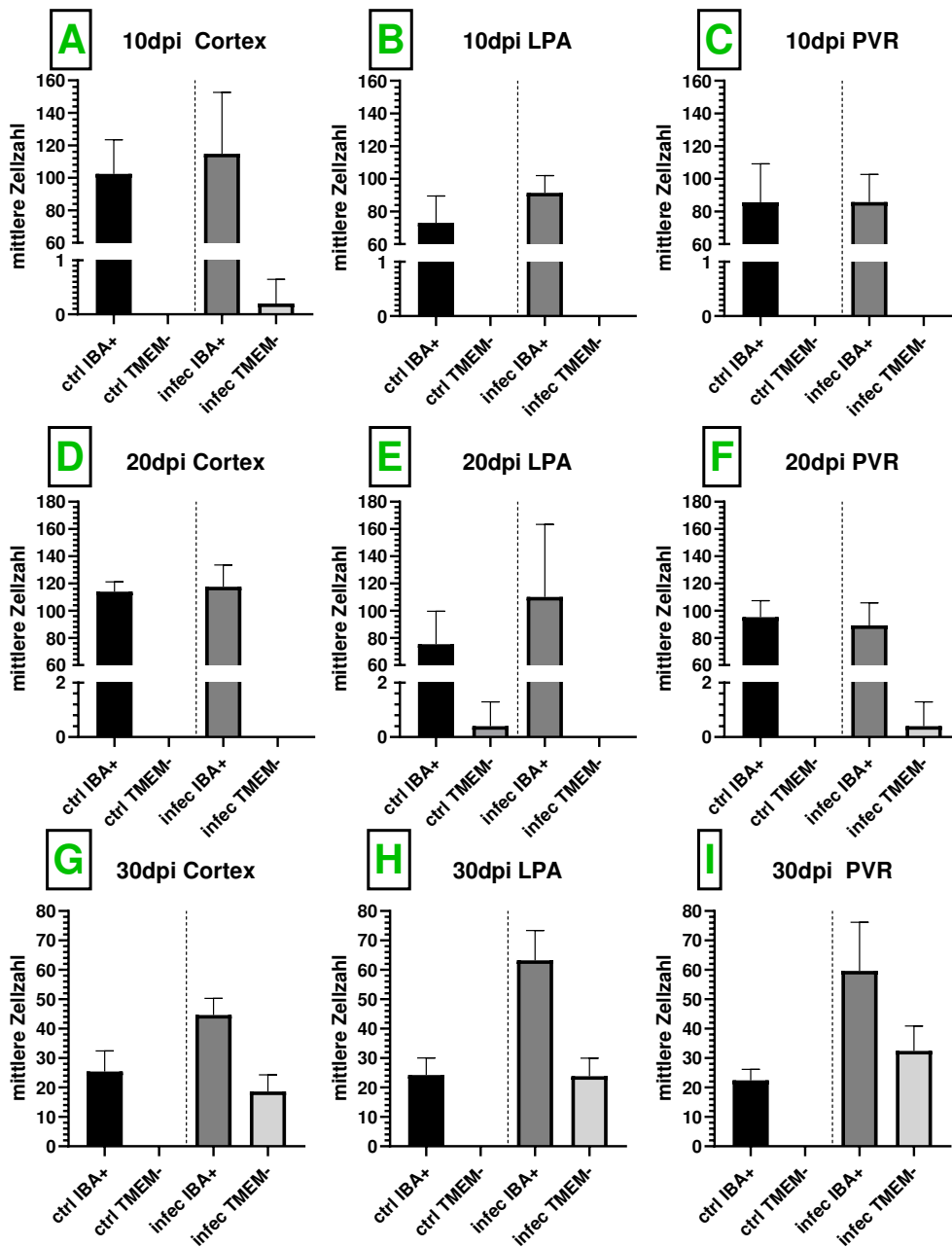


Abbildung 12: Säulendiagramme anti-TMEM-Zellen

Die Abbildung zeigt mittels Säulendiagrammen die mittlere ausgewertete anti-iba-1⁺ bzw. anti-TMEM119⁻ Zellzahl pro Untersuchungsgruppe nach untersuchtem Gehirnareal und Infektionsdauer. Um die Darstellung zu vereinfachen, wurde auf die Darstellung der anti-TMEM119⁺-Zellen verzichtet, da diese alle anti-iba-1⁺ waren. Die mittlere ausgewertete Zellzahl fällt nach 30dpi ([G], [H] und [I]) geringer aus, da die Daten von (Speidel, 2020) stammen und nur 1/3 der Bilderstapel erstellt und ausgewertet wurden. Die Daten sind in den [Anhangstabelle 3](#) bis [Anhangstabelle 5](#) aufgeführt.

Nach 10dpi und 20dpi ([A] bis [F]) ist der Anteil an anti-TMEM119⁻/anti-iba-1⁺Zellen in allen untersuchten Gehirnarealen in der Kontroll- sowie infizierten Gruppe jeweils vernachlässigbar. Nach 30dpi ([G], [H] und [I]) steigt der Anteil der anti-TMEM119⁻-Zellen in der infizierten Gruppe erheblich an.

Nach 30dpi steigt der Anteil anti-TMEM119⁻/anti-iba-1⁺-Zellen in der infizierten Untersuchungsgruppe in allen drei untersuchten Hirnarealen an. Laut Speidel (2020) beläuft sich der Anteil an anti-TMEM119⁻/anti-iba-1⁺-Zellen in der infizierten Gruppe nach 30dpi für den Kortex auf 41%, für die LPA auf 37% und für den PVR auf 54%. Entsprechend handelt es sich bei 59% im Kortex, 63% in der LPA und 46% im PVR um MG.

Basierend auf den Werten aus Anhangstabelle 5 zeigt Abbildung 13 vergleichende Box-Whisker-Plots für alle drei untersuchten Hirnareale zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe nach 30dpi. Der Anteil eingewanderter Immunzellen ist in allen drei Arealen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (jeweils $p=0,004$).

Daraus lässt sich ableiten, dass der Anteil aus der Peripherie immigrierter Immunzellen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vernachlässigbar ist. Entsprechend sollten die Zahlen nach 30dpi um den Anteil immigrierter Zellen bereinigt werden, was in 3.2.1 beschrieben wird.

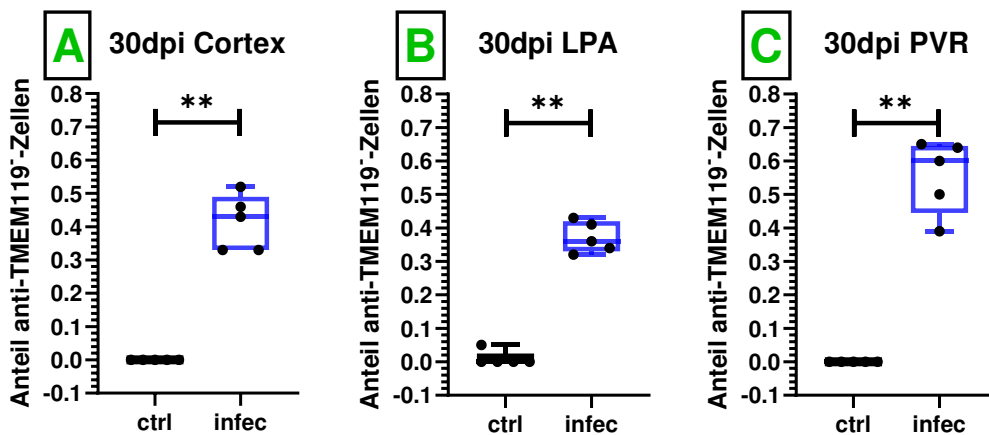


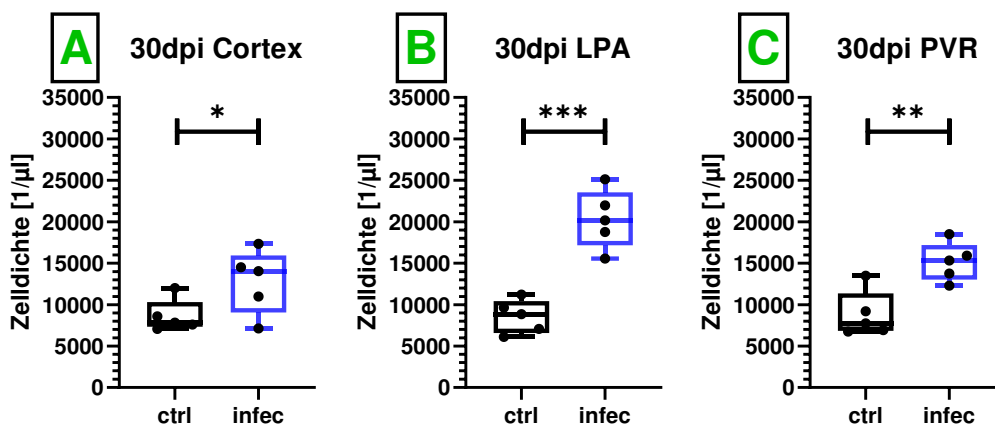
Abbildung 13: Anteil anti-TMEM119⁻-Zellen nach 30dpi

Die Abbildung zeigt den Anteil der anti-TMEM119⁻/anti-iba-1⁺-Zellen an der Gesamtzellzahl in der Kontroll- (schwarz) und infizierten Gruppe (blau) nach 30dpi in allen untersuchten Hirnarealen als Box-Whisker-Plots. Die Verteilungen sind nicht normalverteilt. Die Testung auf Signifikanz erfolgte entsprechend mittels Mann-Whitney-Test; für alle drei Gehirnareale gilt $p = 0,004$. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Basierend auf den Daten aus Anhangstabelle 5 (Speidel, 2020).

3.2.1 Korrigierte Zelldichte nach 30dpi

Laut Speidel (2020) ergaben sich nach 30dpi mikrogliale Anteile von 59% im Cortex, von 63% in der LPA und von 46% in der PVR. Multipliziert man die in [Abbildung 9](#) gezeigten Zelldichten nach 30dpi mit dem jeweiligen Anteil, erhält man näherungsweise eine korrigierte Zelldichte für die reine MG-Population in den entsprechenden Arealen nach 30dpi (s. [Abbildung 14](#)).

[Abbildung 14](#) zeigt, dass auch die um den Anteil der aus der Peripherie immigrierten Immunzellen korrigierte Zelldichte, also reine mikrogliale Zelldichte oder ‚Mikroglia-dichte‘ nach 30 dpi in allen untersuchten Arealen signifikant ist: Cortex ($p = 0,0321$), LPA ($p < 0,0001$) und PVR ($p = 0,0023$). Verglichen mit den in [Abbildung 9](#) ursprünglich gezeigten, unkorrigierten Zelldichten fallen die Unterschiede zwar etwas geringer, aber dennoch signifikant aus.



[Abbildung 14](#): korrigierte Zelldichte nach 30dpi

Die Abbildung zeigt Box-Whisker-Plots, die um den von Speidel (2020) ermittelten jeweiligen Faktor angepasste Zelldichten für die Gehirnanareale Cortex (59%) in (A), LPA (63%) in (B) sowie PVR (46%) in (C) zeigen, jeweils in der Kontroll- (schwarz) verglichen mit der infizierten Gruppe (blau). Die Unterschiede zur Kontrollgruppe sind nach wie vor signifikant im Cortex ($p = 0,0321$), in der LPA ($p < 0,0001$) und im PVR ($p = 0,0023$). Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum.

So kann festgehalten werden, dass auch unter Berücksichtigung der immigrierten Immunzellen nach 30dpi nicht nur statistisch signifikante Unterschiede in der bereinigten Zelldichte festzustellen sind, sondern auch ein erheblicher Anstieg an Mikrogliazellen in der infizierten Gruppe. In der LPA drückt sich dies

beispielsweise immerhin in einer über doppelt so großen medianen Zelldichte zwischen infizierter und Kontrollgruppe aus.

3.3 Morphologische Analyse

Die Morphologie der Mikrogliazellen erscheint je nach Infektionsdauer bereits visuell-subjektiv mit starken Unterschieden. Abbildung 15 soll dies exemplarisch zeigen. Neben diesen visuell-subjektiven morphologischen Unterschieden der MG zwischen den Gruppen fiel außerdem immer wieder auf, dass das anti-iba-1-Labeling in den infizierten Mäusen mit fortschreitendem Infektionsverlauf an Intensität zunahm. Zusätzlich zeigt die Abbildung auch, dass die Verwendung eines *background subtraction* Filters zur Vereinheitlichung der Bildqualität sinnvoll ist, da sich diese teils stark unterscheiden kann. Um diese erwähnten visuellen Unterschiede objektivierbar zu machen, wurden mittels Imaris Bitplane Rekonstruktionen von mikroglialen Zellkörpern und Zellfortsätzen aus Bildern der Kategorie C angefertigt, deren Daten exportiert und ausgewertet wurden.

Diese morphologische Analyse ist auch Teil einer Publikation (Uzcategui *et al.*, 2023).

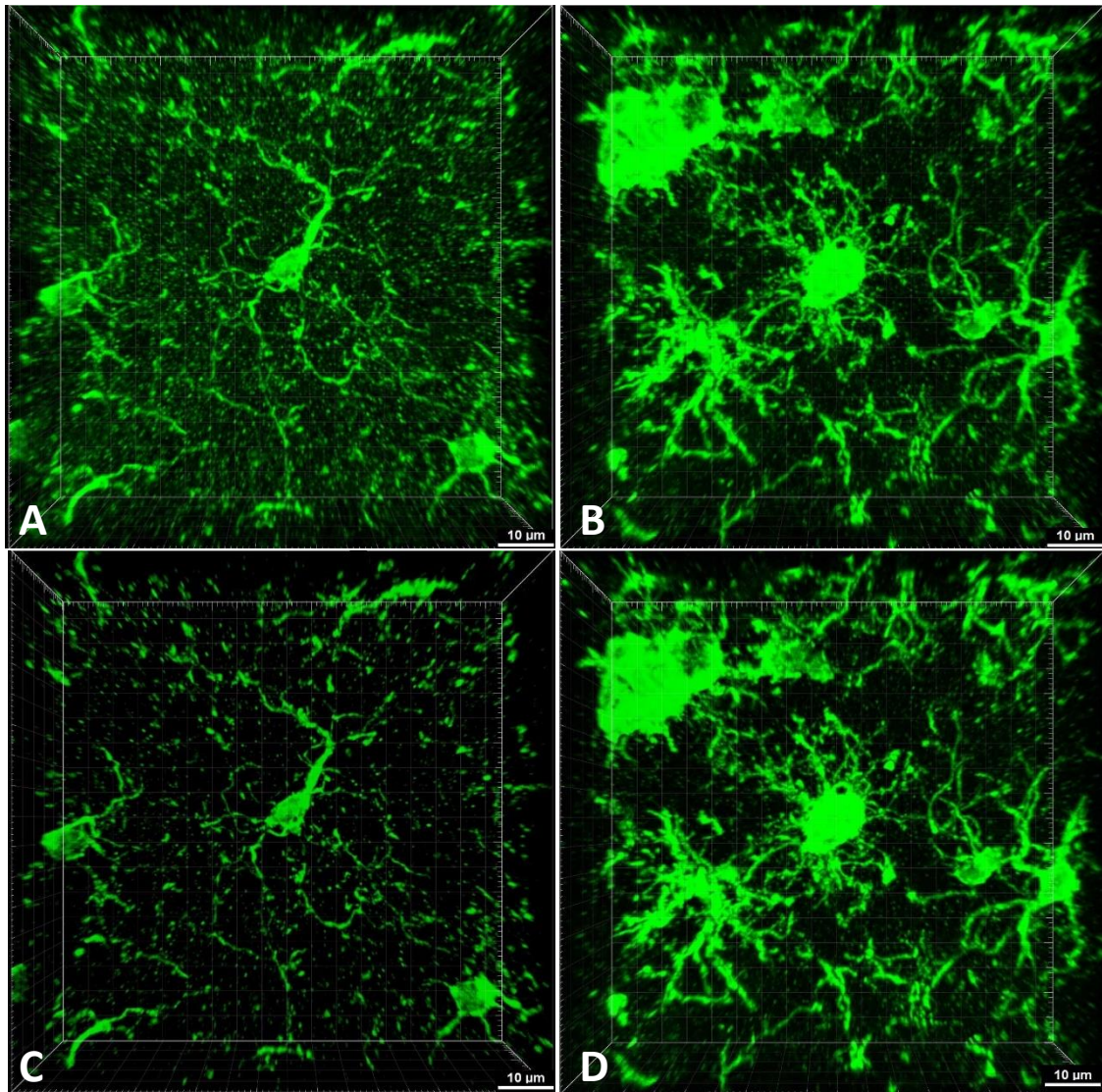


Abbildung 15: Beispielbilder Imaris

(A) und (C) zeigen exemplarisch eine zentral aufgenommene MG einer 30dpi ctrl Maus – (A) vor und (C) nach Anwendung des Imaris-eigenen *background subtraction* Filter. (B) und (D) zeigen exemplarisch eine zentral aufgenommene MG einer 30dpi infec Maus – (B) vor und (D) nach Anwendung des Imaris-eigenen *background subtraction* Filters. Bereits visuell fallen starke morphologische Unterschiede zwischen den beiden Zellen auf: die Zelle des infizierten Tieres (D) weist ein ‚plumperes‘, ‚entrundetes‘ bzw. ‚unrunderes‘ Soma sowie deutlich kürzere Fortsätze auf als die Zelle der Kontrollgruppe in (C); des Weiteren imponiert das anti-iba-1-Labeling in der infizierten Maus deutlich intensiver. Der Balken in der rechten unteren Ecke entspricht jeweils 10 µm. Diese Zellen werden im weiteren Verlauf immer wieder zur Veranschaulichung des Rekonstruktionsprozesses gezeigt.

3.3.1 Somata

Da die MG der infizierten Untersuchungsgruppen bereits visuell deutlich größere und plumpere bzw. unförmigere („unrundere“) Somata aufwiesen, wurden die Somata rekonstruiert (exemplarisch s. [Abbildung 16](#)), um diese qualitative Beschreibung quantifizierbar zu machen. Zur Beurteilung der Somagröße werden die Parameter *area* und *volume* sowie zur Beurteilung der Somaform der Parameter *sphericity* herangezogen.

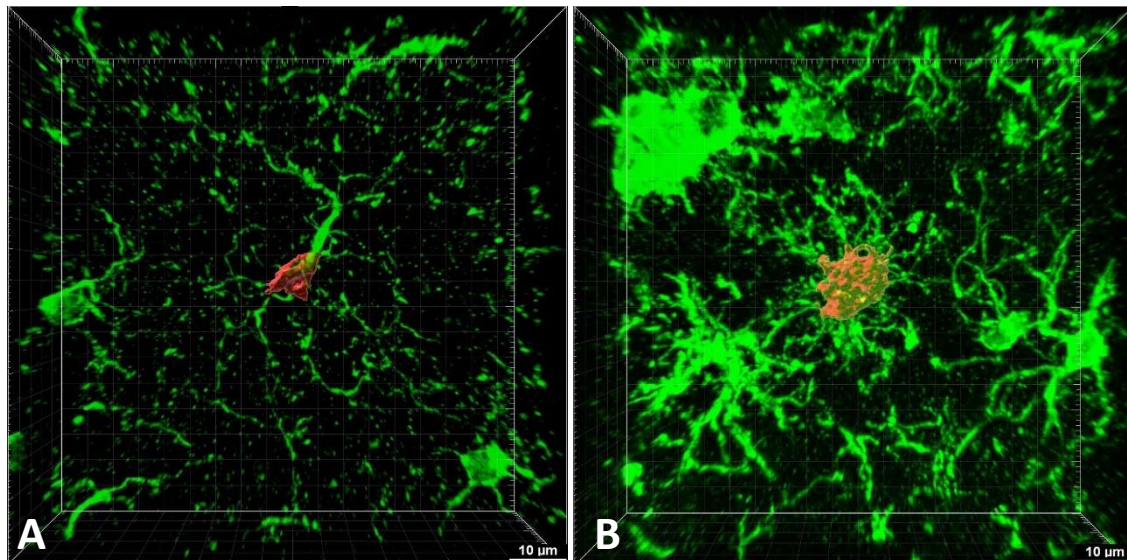


Abbildung 16: Icarus Beispiel-Somata

Zwei exemplarisch dargestellte Soma-Rekonstruktionen der beiden zentral aufgenommenen Zellen aus [Abbildung 15](#) (A: 30dpi ctrl; B: 30dpi infec). Das Soma der infizierten Zelle erscheint deutlich größer als das Soma der Kontrolle. Es fällt auf, dass das Soma der Zelle in (B), verglichen mit dem der Zelle in (A) deutlich ‚entrundet‘ bzw. ‚unförmiger‘ und größer ist. Der Balken in der rechten unteren Ecke entspricht 10 µm.

3.3.1.1 Somagröße

Die Box-Whisker-Plots in [Abbildung 17](#) zeigen, dass die Somata aller infizierten Gruppen gegenüber ihren Kontrollgruppen einen deutlichen und signifikanten Zugewinn an *area* und *volume* aufweisen, was die bisher rein qualitativ beschriebenen Unterschiede untermauert.

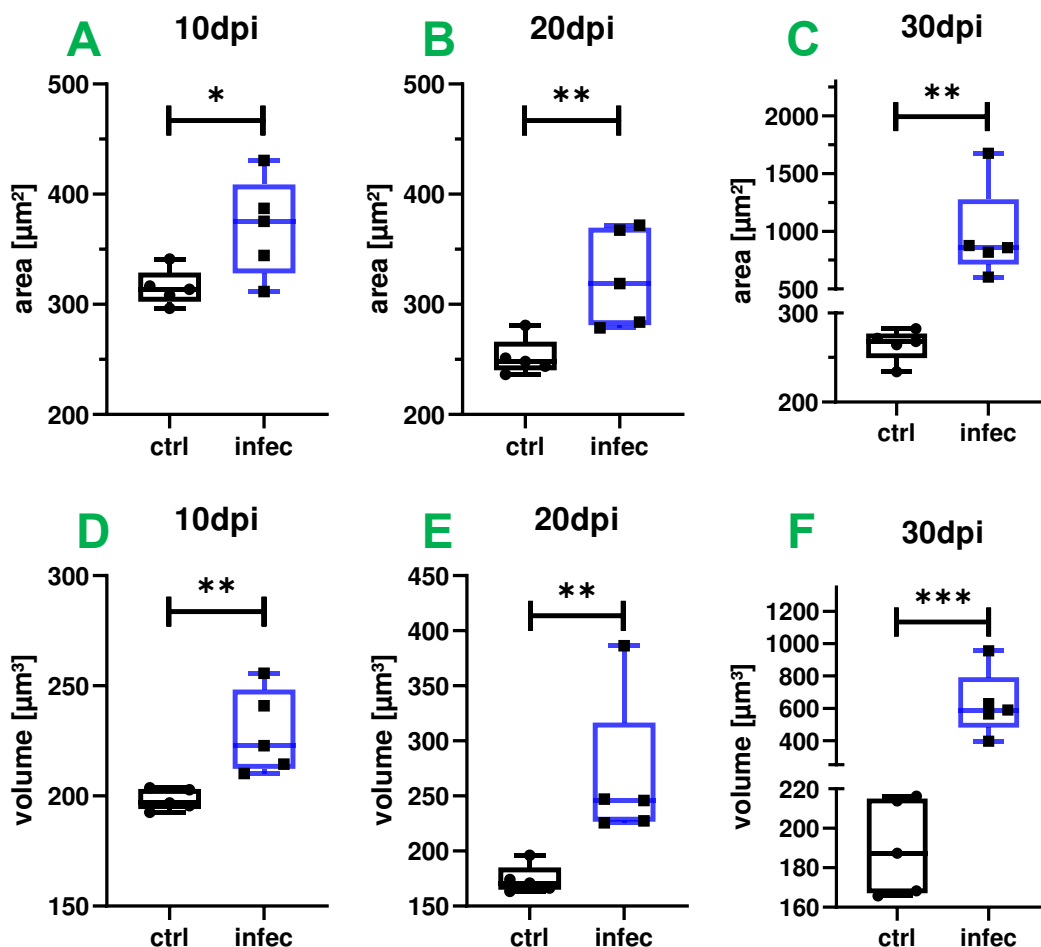


Abbildung 17: Somagröße

In der Abbildung sind vergleichende Box-Whisker-Plots der Kontroll- (schwarz) und infizierten Gruppe (blau) aus den Daten der Somaoberfläche (area) in μm^2 und des Somavolumens in μm^3 gezeigt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Statistische Signifikanz wurde mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test überprüft.

Für die Somaoberfläche ist in (A) bereits nach 10dpi ($p = 0,0168$), in (B) nach 20dpi ($p = 0,0048$) und in (C) 30dpi ($p = 0,0026$) ein stetig größer werdender signifikanter Anstieg in den infizierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu sehen. Die Unterschiede sind zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant. Für das Somavolumen zeigt sich in (D) nach 10 dpi ($p = 0,0042$), in (E) nach 20dpi ($p = 0,0087$) und in (F) nach 30dpi ($p = 0,0007$) ein ähnlicher Verlauf.

Während die mediane Oberfläche nach 10dpi ($p = 0,0168$) und 20dpi ($p = 0,0048$) lediglich um 15% bis 20% und das mediane Volumen nach 10dpi ($p = 0,0042$) und 20dpi ($p = 0,0087$) um 10% bis 40% signifikant ansteigt, haben sich die mediane Somaoberfläche ($p = 0,0026$) und das mediane Somavolumen ($p = 0,0007$) nach 30dpi etwa verdreifacht.

Es lässt sich also festhalten, dass die Somata im Infektionsverlauf erheblich an Oberfläche und Volumen zunehmen.

Da in dieser Auswertung der Vergleich der Somaform mit einer Kugel stattfindet, ließe sich dies mathematisch analog zur Berechnung der Oberfläche und des Volumens einer Kugel erklären, da mathematisch gesehen die Oberfläche einer Kugel mit der zweiten Potenz des Radius ($A = 4\pi r^2$), das Volumen ($V = \frac{4}{3}\pi r^3$) aber mit der dritten Potenz des Radius wächst (s. Somaform).

Da es einen nicht-linearen Zuwachs von Somaoberfläche und Somavolumen gibt, scheint eine Annäherung über die Kugelgeometrie nicht allzu abwegig.

3.3.1.2 Somaform

Die *sphericity* kann als Maß der Rundung verstanden werden, wobei eine *sphericity* = 1,0 einer perfekten Kugelform entspricht. In Abbildung 18 sind die Werte für die *sphericity* der einzelnen Gruppen als Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Box-Whisker-Plots zeigen, dass sich auch die Form der Kontrollgruppen keiner perfekten Kugel entsprechen. Die medianen Werte der *sphericity* bewegen sich in den Kontrollgruppen zwischen 0,55 und 0,62. Die Somaformen der Untersuchungsgruppen nach 10dpi unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,0728$) voneinander, allerdings lässt sich eine Tendenz zur Entrundung in der infizierten Gruppe – verglichen mit der Kontrollgruppe – bereits erahnen. Diese Tendenz wird nach 20dpi ($p = 0,0044$) und besonders nach 30dpi ($p = 0,0002$) signifikant. Nach 20dpi hat die infizierte Gruppe im Median von ca. 0,62 auf 0,55 – also um ca. 11% – und nach 30dpi von ca. 0,62 auf ca. 0,42 – also um etwa ein Drittel – abgenommen.

Abschließend lässt sich also sagen, dass die Somata während des Krankheitsverlaufs nicht nur erheblich an Größe gewinnen, sondern sich auch eine zunehmende ‚Entrundung‘ der mikroglialen Somata beobachten lässt.

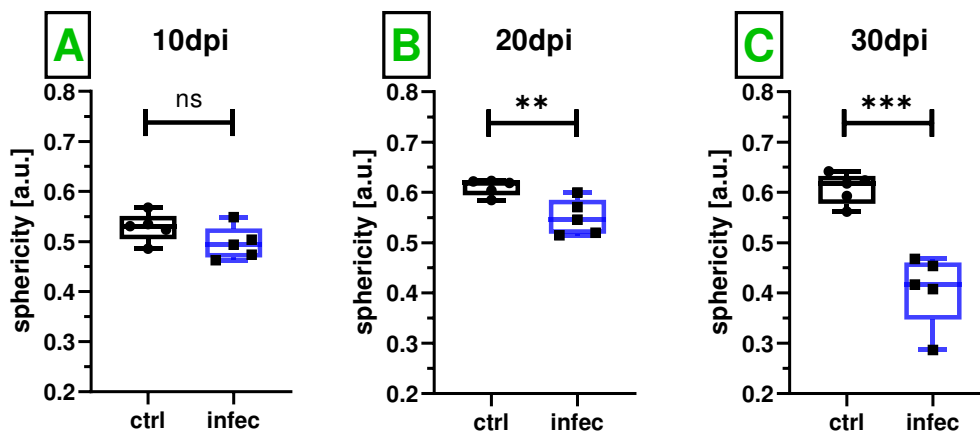


Abbildung 18: Sphericity

In der Abbildung sind vergleichende Box-Whisker-Plots der Kontroll- (schwarz) und infizierten Gruppe (blau) aus den Daten der *Sphericity* als Maß für die Somaform nach 10dpi ($p = 0,0728$) in (A), 20dpi ($p = 0,0044$) in (B) sowie 30dpi ($p = 0,0002$) in (C) zu sehen. Die Unterschiede sind nach 10dpi nicht, jedoch nach 20 dpi und 30dpi statistisch signifikant. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Statistische Signifikanz wurde mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test überprüft.

3.3.2 Fortsätze

Abbildung 19 zeigt die fertige Rekonstruktion (Soma als SO und Fortsätze als FO) der beiden bereits exemplarisch gezeigten Zellen aus Abbildung 15. Zur Beurteilung der Größe der FO-Verzweigung wurde neben der Fortsatzgesamtlänge (*filament length sum*) das Volumen der *convex hull surface objects* (CHSO) bestimmt, um die räumliche Ausdehnung zu beurteilen. Zur Beurteilung der Komplexität der Verzweigung wurde die Anzahl der Verzweigungs- und Endpunkte sowie die Anzahl der *Sholl-Intersections* in Mikrometerabständen bestimmt.

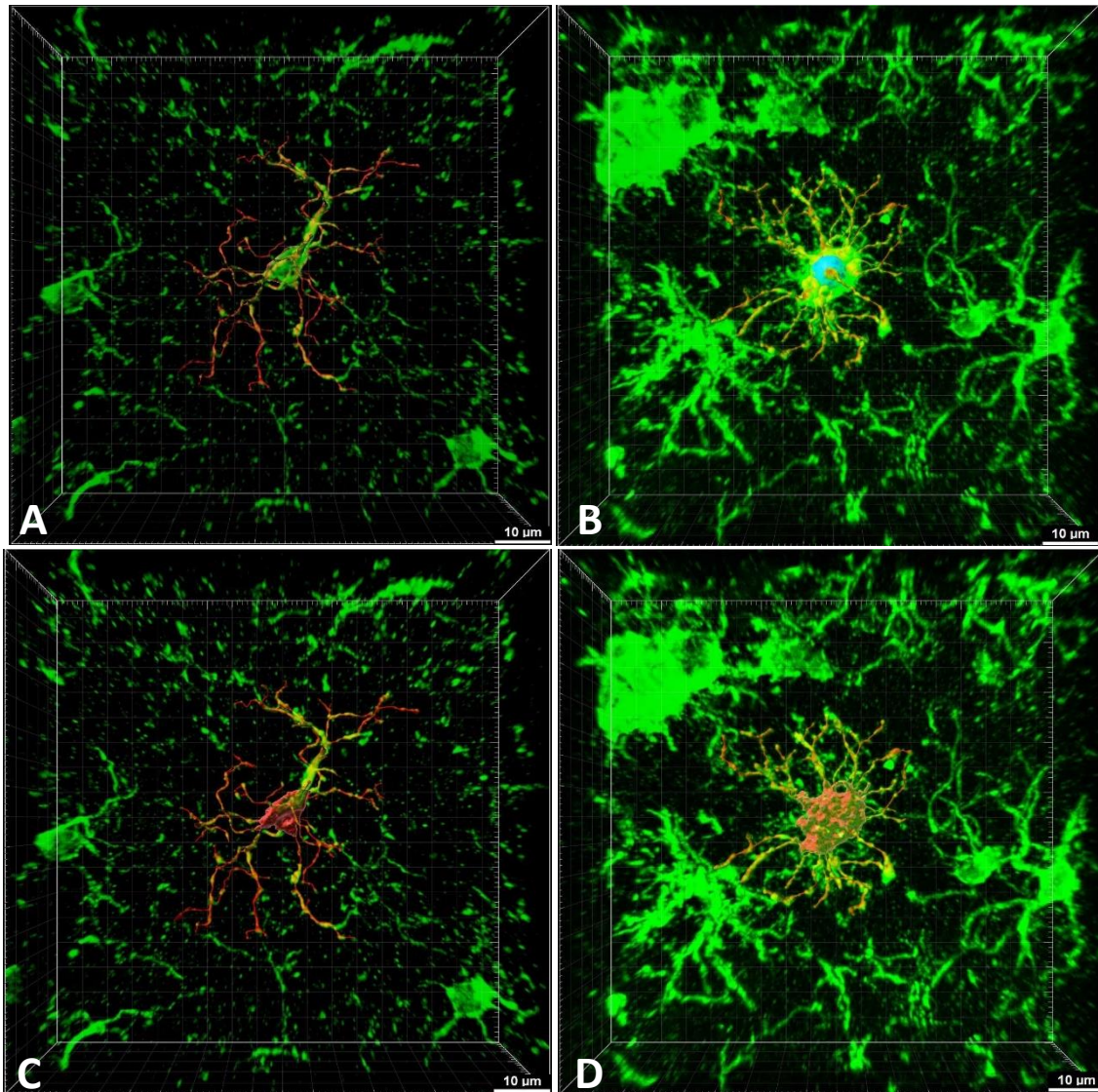


Abbildung 19: Imaris Rekonstruktion

In der Abbildung sind die zwei exemplarisch dargestellten Rekonstruktionen der beiden zentral aufgenommenen Zellen aus Abbildung 15 zu sehen. (A) zeigt das rekonstruierte FO der 30dpi ctrl Zelle. (B) zeigt das Gegenstück der 30dpi infec Zelle. (C) und (D) zeigen die jeweiligen kombinierten Rekonstruktionen aus SO und FO. Der Balken in der rechten unteren Ecke entspricht jeweils 10 µm.

3.3.2.1 Räumliche Ausdehnung

Beim Erstellen der FO fiel auf, dass der *filament*-Algorithmus die Somata nicht adäquat berücksichtigt. Insbesondere für die hier beschriebenen Zusammenhänge der Morphologie wurde deshalb eine Korrektur der Parameter *filament*

length sum, no. of branch pts. und no. of Sholl-Intersections vorgenommen. Dafür wurde ein Duplikat der FO erzeugt und auf die Ausdehnung der SO gekürzt. Dies ist exemplarisch in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt.

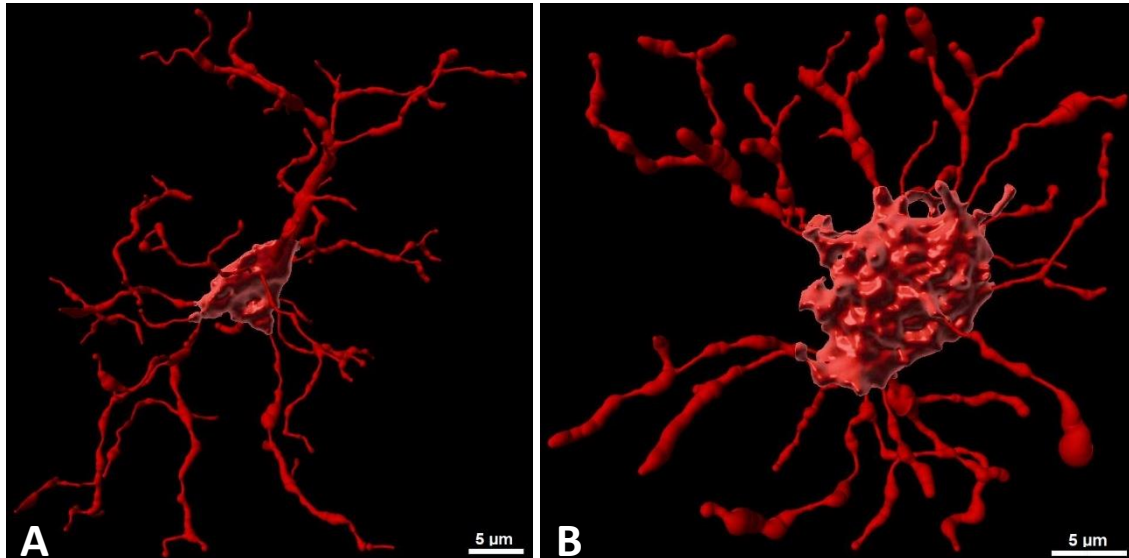


Abbildung 20: Zellrekonstruktion

Die Abbildung zeigt die zwei exemplarisch gezeigten Rekonstruktionen der Zellen aus Abbildung 15 bzw. Abbildung 19. (A) zeigt die Rekonstruktion inkl. SO und FO der 30dpi ctrl Zelle. (B) zeigt das Äquivalent der 30dpi infec Zelle. Im Vergleich zu Abbildung 19 sind die Zellen vergrößert und ohne das zugrunde liegende Messsignal dargestellt. Somata und Fortsätze sind gut zu unterscheiden; die notwendigen Korrekturen sind in diesem Bild allerdings nicht identifizierbar. Die Balken in der rechten unteren Ecke entsprechen jeweils 5µm.

Abbildung 20 zeigt exemplarisch zwei Rekonstruktionen. Die Problematik der notwendigen Korrekturen ist hier kaum ersichtlich. Betrachtet man jedoch Abbildung 21, wird diese Problematik deutlicher. Insbesondere in der infizierten 30dpi Gruppe umschlossen die SO einen Großteil der FO und ‚verfälschten‘ die Daten so teils erheblich.

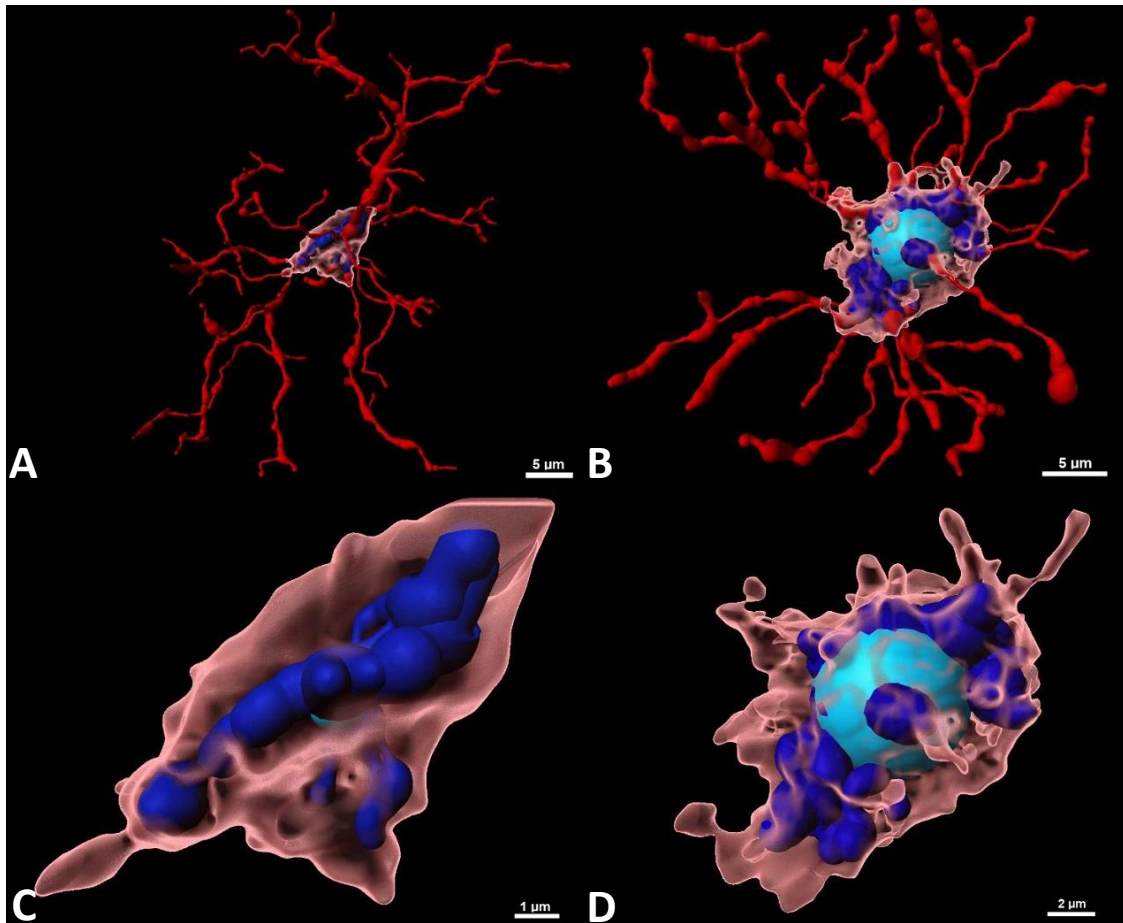


Abbildung 21: Somakorrekturen

(A) und (B) zeigen die zwei gezeigten Rekonstruktionen aus Abbildung 20 mit transparenten Somata. Das eigentliche FO ist weiterhin rot dargestellt. Innerhalb der Somata kommen blaue FO zum Vorschein, die an den Grenzen der SO enden. Das blaue FO in der 30dpi ctrl Zelle (A) erscheint kleiner als das der 30dpi infec Zelle (B), was sich durch das kleinere Soma erklären lässt. Diese blauen FO entsprechen einer „gekürzten“ Version der roten FO und haben aber ihrerseits eine nicht zu unterschätzende Gesamtlänge und eine relevante Anzahl an Verzweigungspunkten. Der Balken in der rechten unteren Ecke entspricht für (A) und (B) 5µm.

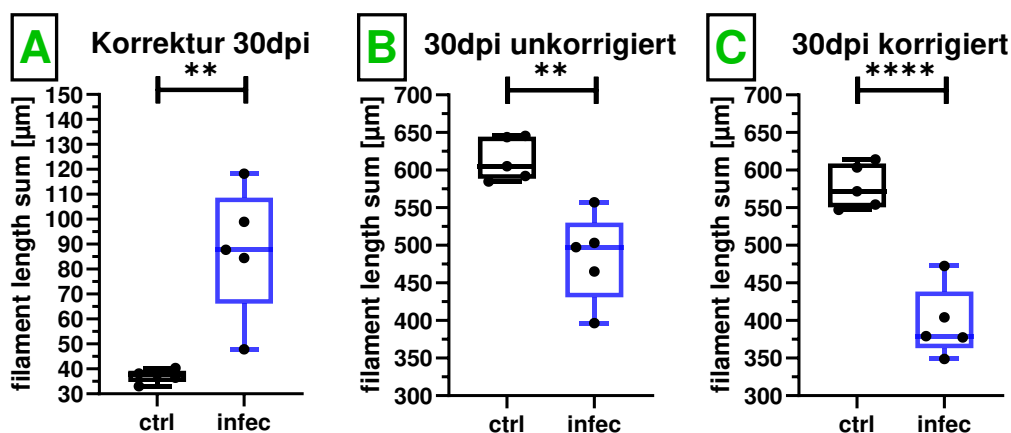
Analog zu (A) und (B) zeigen (C) und (D) die transparenten SO allein mit dem darin befindlichen blauen FO deutlich vergrößert, um deren Ausdehnung zu verdeutlichen. Bei den exportierten Daten der blauen FO handelt es sich um die Korrekturdaten für beispielsweise die Fortsatzgesamtlänge. (C) entspricht der Zelle der 30dpi ctrl Maus und (D) der 30dpi infec Maus. Der Balken in der rechten unteren Ecke entspricht für (C) 1µm und für (D) 2µm (größerer Zoom in (A), da kleineres Soma).

Bei den türkisenen Kugeln handelt es sich um die Projektion des Rekonstruktions-Startpunktes des FO-Algorithmus in Imaris Bitplane. Sie können ignoriert werden.

3.3.2.1.1 Fortsatzgesamtlänge

Da die MG der infizierten Gruppen bereits visuell deutlich weniger und kürzere Fortsätze zu haben scheinen, wurde die Fortsatzgesamtlänge in μm bestimmt, um diese Hypothese zu belegen (vgl. [Abbildung 15](#)).

Da die Fortsatzgesamtlänge in den initialen FO einen relevanten Anteil innerhalb der Somata beinhaltet, wurden die Fortsatzgesamtlängen um diesen Anteil korrigiert (subtrahiert). Dies ist exemplarisch für die zwei Untersuchungsgruppen nach 30dpi in [Abbildung 22](#) dargestellt.



[Abbildung 22: Korrektur der Fortsatzgesamtlänge](#)

In der Abbildung sind exemplarisch für die 30dpi Gruppen (schwarz: Kontrollgruppe, blau: infizierte Gruppe) Box-Whisker-Plots dargestellt, die zeigen, wie groß die Korrektur im Fall der Fortsatzgesamtlänge ausfiel. In (A) sind die zu subtrahierende Korrektur, in (B) die unkorrigierten Werte der Fortsatzgesamtlänge und in (C) die korrigierten Werte dargestellt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Statistische Signifikanz wurde mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test überprüft.

Der Median der in [Abbildung 22](#) als Box-Whisker-Plots zu korrigierenden Fortsatzgesamtlänge liegt für die Kontrollgruppen bei etwa 40 μm , während die unkorrigierte Fortsatzgesamtlänge ihren Median etwa bei 600 μm hat. Dies entspricht einem Anteil von etwa 6,7% an der unkorrigierten Fortsatzgesamtlänge der Kontrollgruppe. Für die Infektionsgruppe liegt der Korrekturmedian bei etwa 90 μm und die unkorrigierte Fortsatzgesamtlänge bei knapp unter 500 μm . Dies entspricht einem Anteil von etwa 18% und ist damit – v.a. relativ gesehen – deutlich höher als in der Kontrollgruppe.

Diese Feststellung wird durch die in [3.3.1](#) zuvor beschriebene Zunahme der Somavolumina im Infektionsverlauf gestützt.

In [Abbildung 23](#) wird die korrigierte Fortsatzgesamtlänge der Kontrollgruppen jeweils neben der infizierten Gruppe nach 10dpi, 20dpi und 30dpi mittels Box-Whisker-Plots dargestellt.

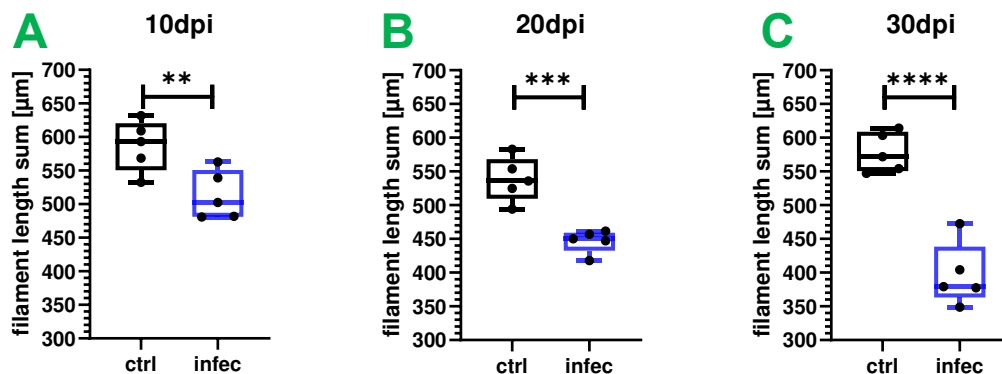


Abbildung 23: Fortsatzgesamtlänge

In der Abbildung sind die korrigierten Fortsatzgesamtlängen in μm nach 10 dpi ($p = 0,0071$) in (A), 20dpi ($p = 0,0003$) in (B) sowie 30dpi ($p < 0,0001$) in (C) für die Kontroll- (schwarz) und infizierte Gruppe (blau) als Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe sind zu allen Zeitpunkten signifikant. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Statistische Signifikanz wurde mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test überprüft.

Während die in [Abbildung 23](#) als Box-Whisker-Plots aufgetragene Fortsatzgesamtlänge der Kontrollgruppen auf etwa dem gleichen Niveau liegt, lässt sich bereits nach 10dpi eine signifikante Abnahme des Medians um etwa 17% bei der infizierten Gruppe nachweisen ($p = 0,0071$). Nach 20dpi ($p = 0,0003$) ist die Abnahme um etwa 18% noch vergleichbar mit 10dpi. Nach 30dpi hat die mediane Fortsatzgesamtlänge nicht nur signifikant, sondern auch numerisch um etwa 35% abgenommen ($p < 0,0001$).

Abschließend lässt sich also festhalten, dass die Fortsatzgesamtlänge der MG im Krankheitsverlauf stark zurückgeht.

3.3.2.1.2 Convex hull

Aus der Fortsatzrekonstruktion (vgl. [Abbildung 19](#)) wurde mit einem in Imaris integrierten MatLab-Algorithmus eine konvexe Hülle berechnet, die wiederum ein

surface-Objekt (CHSO) erzeugt, dessen Oberfläche sich von Endpunkt zu Endpunkt der Fortsatzrekonstruktion aufspannt (s. [Abbildung 24](#)). Das Volumen der CHSO wird im Folgenden als Maß für das im Moment überwachte Volumen der MG herangezogen.

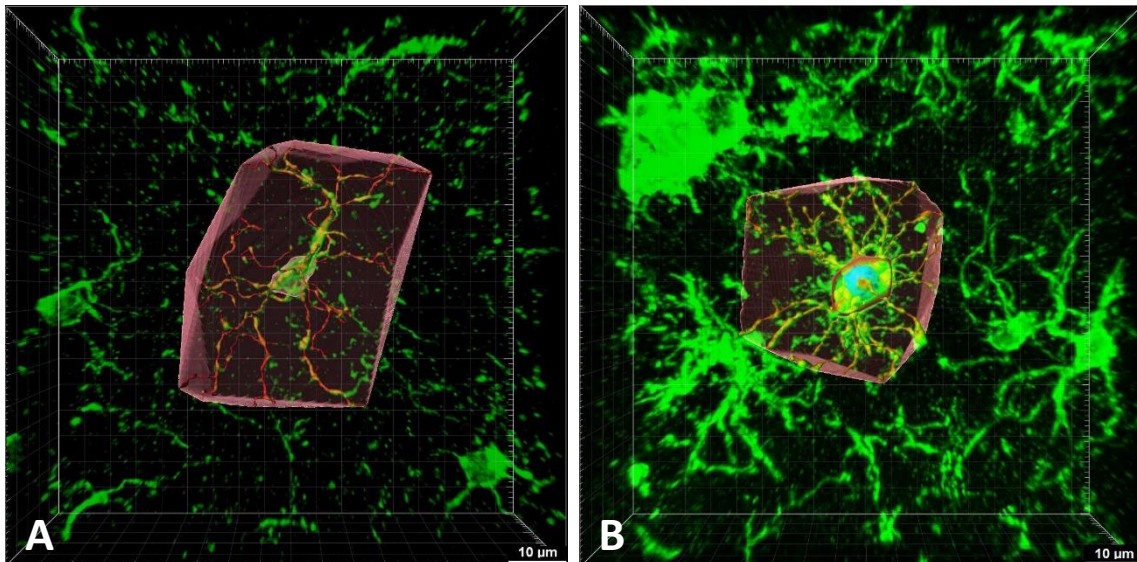


Abbildung 24: Imaris CHSO

In der Abbildung sind die zwei exemplarisch dargestellten CHSO der beiden zentral aufgenommenen Zellen aus [Abbildung 15](#); berechnet anhand der FO aus [Abbildung 19](#). (A) zeigt die CHSO der 30dpi ctrl Zelle und (B) die CHSO der 30dpi infec Zelle. Die CHSO sind transparent, damit das zugrunde liegende FO zu sehen ist. Der Balken in der rechten unteren Ecke entspricht 10µm.

In [Abbildung 25](#) sind die Volumina der CHSO der Untersuchungsgruppen in μm^3 jeweils nach 10dpi, 20dpi und 30dpi als Box-Whisker-Plots nebeneinander abgebildet. Auch hier lässt sich nach 10dpi bereits eine Tendenz zur Volumenabnahme der infizierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe erahnen ($p = 0,0565$). Dieser Unterschied wird nach 20dpi ($p = 0,0234$) und 30dpi ($p = 0,0129$) signifikant.

Das mediane CHSO-Volumen der infizierten Gruppe hat nach 20dpi nicht nur signifikant abgenommen, sondern lässt sich auch numerisch auf eine Abnahme um etwa 14% und nach 30dpi um etwa 32% im Vergleich zur Kontrollgruppe beziffern. Allerdings fällt ebenfalls auf, dass die Spannweite in der 30dpi infec-Gruppe, verglichen mit den anderen fünf Gruppen, deutlich verbreitert ist.

Um diese Entwicklungen deutlicher hervorzuheben, wurden die während der

fortschreitenden Infektion kleiner werdenden Volumina der CHSO (aufgrund abnehmender Fortsatzlänge und -verzweigung und damit konsekutiv kleineren berechneten CHSO) durch die gleichermaßen größer werdenden Volumina der SO dividiert, um das Verhältnis zu bestimmen, in welchem die beiden Größen konvergieren:

$$\text{Verhältnis} = \frac{V(\text{CHSO})[\mu\text{m}^3]}{V(\text{SO})[\mu\text{m}^3]}.$$

Dieser Quotient wird ebenfalls in Abbildung 25 mittels Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Box-Whisker-Plots zeigen entsprechend auch, dass sich der Quotient aus den beiden Volumina $\frac{V(\text{CHSO})}{V(\text{SO})}$ in den Kontrollgruppen im Median etwa zwischen 130 und 135 bewegt. Bereits nach 10dpi gibt es hier einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0129$) zur infizierten Gruppe. Der Quotient liegt in der infizierten Gruppe lediglich bei etwa 110. Nach 20dpi beträgt der Quotient im Median nur noch etwa 85 bis 90 ($p = 0,0003$) und nach 30dpi liegt der Quotient im Median bei etwa 35 ($p < 0,0001$). Entsprechend resultieren numerische Abnahmen des Medians um ca. 15% nach 10dpi, um ca. 31% nach 20dpi und um ca. 73% nach 30dpi. Die oben geschilderte Spannweite der Verteilung nach 30dpi ist für den Quotienten deutlich geringer ausgeprägt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei deutlich verkleinertem CHSO-Volumen als Maß für eine stärker aktivierte Immunzelle auch ein deutlich vergrößertes SO-Volumen zu erwarten ist. Es lässt sich also festhalten, dass nicht nur das vermeintlich momentan überwachte Gesamtvolumen an sich, sondern auch dieses Volumen in Relation zum jeweiligen Volumen der Somata im Infektionsverlauf massiv kleiner wird.

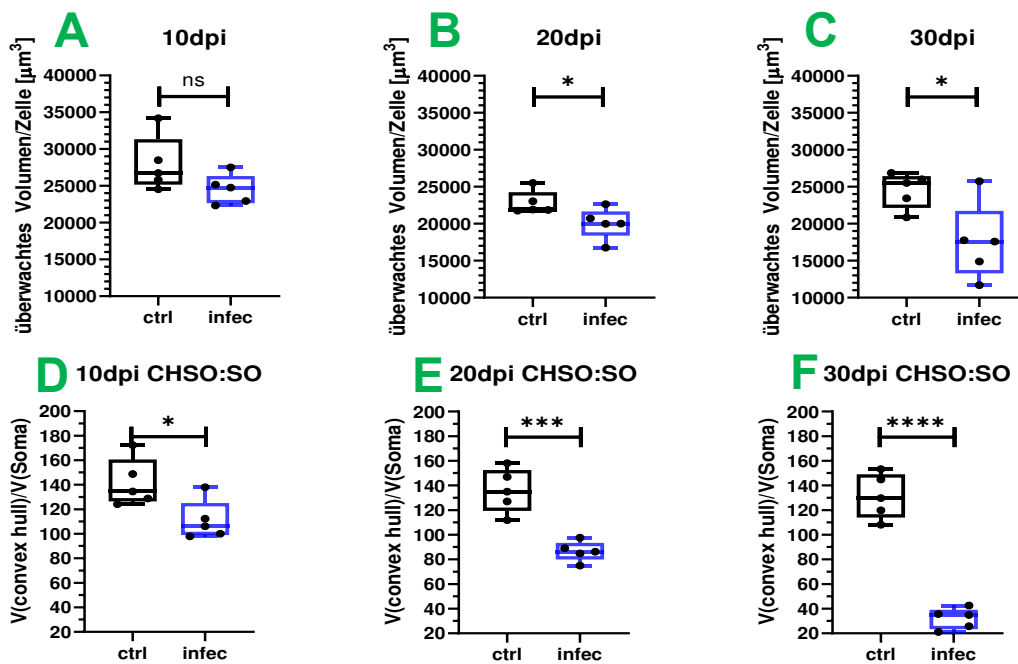


Abbildung 25: Verhältnis Convex-hull-surface-object (CHSO) zu Surface object (SO)

Die Abbildung zeigt die als Box-Whisker-Plots aufgetragenen Volumina der CHSO in μm^3 als Maß für das überwachte Volumen pro Zelle nach 10dpi ($p = 0,0565$) in (A), 20dpi ($p = 0,0234$) in (B) und 30dpi ($p = 0,0129$) in (C). Außerdem zeigt die Abbildung Box-Whisker-Plots, die die Quotienten für das Verhältnis der Volumina der CHSO zu den Volumina der SO nach der Formel $\frac{V(\text{CHSO})[\mu\text{m}^3]}{V(\text{SO})[\mu\text{m}^3]}$ nach 10dpi ($p = 0,0129$) in (D), 20dpi ($p = 0,0003$) in (E) sowie 30dpi ($p < 0,0001$) in (F) darstellen. Dabei sind die Kontrollgruppen jeweils schwarz und die infizierten blau dargestellt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Die statistische Testung erfolgte mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe sind in (A) nicht, jedoch in (B) und (C) statistisch signifikant. Durch die Berechnung des Quotienten werden die Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt deutlich größer und signifikanter ([D], [E] und [F]). Auch die Verteilungsbreite erscheint in den Plots der Quotienten ([D] bis [F]) eher schmaler als in den Plots der zugehörigen CHSO-Volumina ([A] bis [C]).

3.3.2.2 Komplexität

3.3.2.2.1 Verzweigungs- und Endpunkte

Wie bereits erwähnt erschienen die mikroglialen Fortsätze in den infizierten Gruppen deutlich kürzer und weniger verzweigt. Deshalb wurden zur Beurteilung der Verzweigungskomplexität die Anzahl der Verzweigungs- und Endpunkte der Fortsatzrekonstruktionen herangezogen. Da die Anzahl der Verzweigungspunkte in den initialen FO einen relevanten Anteil innerhalb der Somata beinhaltet (vgl.

analog Abbildung 21), wurden diese um diesen Anteil analog zur Fortsatzgesamtlänge korrigiert (subtrahiert).

In Abbildung 26 ist die Anzahl der nicht korrekturbedürftigen Endpunkte (*No. of terminal Pts.*) sowie die korrigierten Verzweigungspunkte (*No. of branch Pts.*) der Untersuchungsgruppen jeweils nach 10dpi, 20dpi und 30dpi als Box-Whisker-Plot nebeneinander aufgetragen.

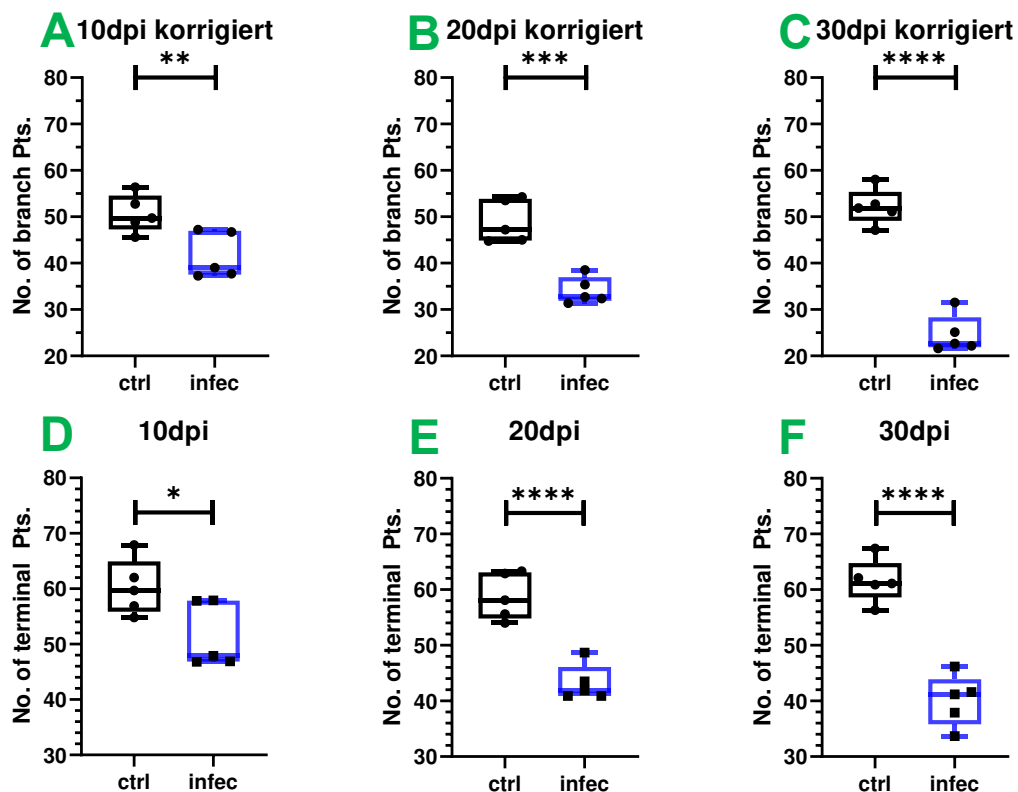


Abbildung 26: Fortsatzverzweigungspunkte und -endpunkte

Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median; die *Whiskers* Minimum und Maximum. Auf statistische Signifikanz wurde mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test überprüft.

Die Abbildung stellt die Anzahl der korrigierten Fortsatzverzweigungspunkte als Maß für die Komplexität der Gesamtverzweigung nach 10dpi ($p = 0,0066$) in (A), 20dpi ($p = 0,0001$) in (B) und 30dpi ($p < 0,0001$) in (C). Die Kontrollgruppen sind jeweils schwarz und die infizierten Gruppen blau als Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe sind zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant.

Analog dazu ist die jeweilige Anzahl an Fortsatzendpunkten als weiteres Maß für die Komplexität der Gesamtverzweigung nach 10dpi ($p = 0,0173$) in (D), 20dpi ($p < 0,0001$) in (E) und 30dpi ($p < 0,0001$) in (F) dargestellt. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe sind auch hier zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant.

In Abbildung 26 ist die Anzahl der Verzweigungspunkte der infizierten Gruppen jeweils nach 10dpi, 20dpi und 30dpi neben der Kontrollgruppe als Box-Whisker-Plot aufgetragen. Es lässt sich ablesen, dass die mediane Anzahl der Verzweigungspunkte in allen Kontrollgruppen zwischen 49 und 51 liegt. Bereits nach 10dpi ist ein signifikanter Abfall der medianen Anzahl der Verzweigungspunkte in der infizierten Gruppe zur Kontrollgruppe auf etwa 40 festzustellen ($p = 0,0066$). Dies entspricht einer Abnahme der Verzweigungspunkte im Median um etwa 20%. Nach 20dpi ist ein signifikanter Medianabfall auf 36 (also um etwa 28%; $p = 0,0001$) und nach 30dpi auf 22 (um etwa 56%; $p < 0,0001$) festzustellen.

In Abbildung 26 ist auch ein Abfall der Fortsatzverzweigungsendpunktanzahl zu erkennen. In den Kontrollgruppen liegt die mediane Anzahl der Endpunkte bei 59 bis 61. Bereits nach 10dpi ist ein signifikanter Medianabfall auf etwa 48 in der infizierten Gruppe festzustellen – also um etwa 20% verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,0173$). Nach 20dpi ist ein signifikanter Abfall auf 42, also um etwa 30% ($p < 0,0001$), und nach 30 dpi ein signifikanter Abfall auf 41, also um etwa 32% ($p < 0,0001$), festzustellen.

Auch hier lässt sich abschließend also festhalten, dass die Verzweigungen im Infektionsverlauf nicht nur deutlich kürzer, sondern auch deutlich weniger verzweigt sind. Dies macht nach 30dpi bei den Verzweigungspunkten über die Hälfte und bei den Endpunkten etwa ein Drittel aus!

3.3.2.2 Sholl-Intersections

Die Sholl-Intersections geben Aufschluss darüber, wie häufig zirkulär um das Soma gedachte Kugeln von einem Fortsatz durchdrungen bzw. geschnitten werden. So erhält man Auskunft darüber, in welcher Entfernung zum Soma die meisten Fortsätze zu finden sind, wie lange sich die weitesten Fortsätze ausdehnen und ab welcher Entfernung die Zelle keine Fortsätze mehr aufweist.

Da die Anzahl der Sholl-Intersections in den initialen FO einen relevanten Anteil innerhalb der Somata beinhaltet (vgl. analog Abbildung 21), wurden diese um diesen Anteil analog zur Fortsatzgesamtlänge korrigiert (subtrahiert).

In Abbildung sind die korrigierten Graphen für diese Sholl-Intersections jeweils für 10dpi, 20dpi bzw. 30dpi und je nach Untersuchungsgruppe geplottet. Dabei

stehen die grünen Graphen für die Untersuchungsgruppe und die schwarzen Graphen für die infizierten Gruppen. Zusätzlich lässt sich an jedem Messpunkt (also für jeden Mikrometer) eine Standardabweichung in der jeweiligen Farbe ablesen. Der verzögerte Anstieg zu Beginn der Graphen (ab ca. 4 μm) lässt sich durch die Korrekturen (Verzweigungen innerhalb der Somata) erklären bzw. der eigentliche Anstieg ist als Entfernung zum Ursprungsort der FO-Rekonstruktion als erster Schnittpunkt außerhalb des SO zu interpretieren.

Rein deskriptiv lässt sich festhalten, dass die Maxima (y-Achse) der Kontrollgruppen bei 19 bis 21 Schnittpunkten liegen, während die infizierten Gruppen lediglich maximal 17 bis 19 Schnittpunkten aufweisen. Darüber hinaus kann man erkennen, dass die Zellen der Kontrolltiere in einer Entfernung (x-Achse) von 14 μm zum Soma das maximale Ausmaß ihrer Verzweigung erreichen. Bei den infizierten Gruppen lässt sich eine Linksverschiebung der max. Verzweigung auf 11 bis 13 μm bis zum Erreichen der maximalen Verzweigung festhalten. Entsprechend flachen die Kurven der infizierten Gruppen auch früher ab und der letzte Schnittpunkt liegt Soma-näher als bei den Kontrollgruppen (34 bis 37 μm bei den Kontrollgruppen bzw. 32 bis 35 μm bei den infizierten Gruppen).

Abschließend lässt sich also festhalten, dass die Graphen der infizierten Gruppen verglichen mit den Kontrollgruppen später und weniger hoch ansteigen sowie früher wieder abfallen. Es resultiert eine niedrigere Amplitude und ein schmalerer ‚Bauch‘ in der Kurve (mit konsekutiv vermeintlich kleinerer Fläche unter dem Graphen, AUC).

Teile der beschriebenen Unterschiede liegen aber auf den ersten Blick scheinbar im Rahmen der in der Abbildung angezeigten Standardabweichungen. Um die Beurteilung der Daten aus Abbildung zu vereinfachen und abschließend zu beurteilen, wurde in Abbildung 28 die Fläche unter den jeweiligen Kurven (AUC) berechnet und als Box-Whisker-Plot dargestellt.

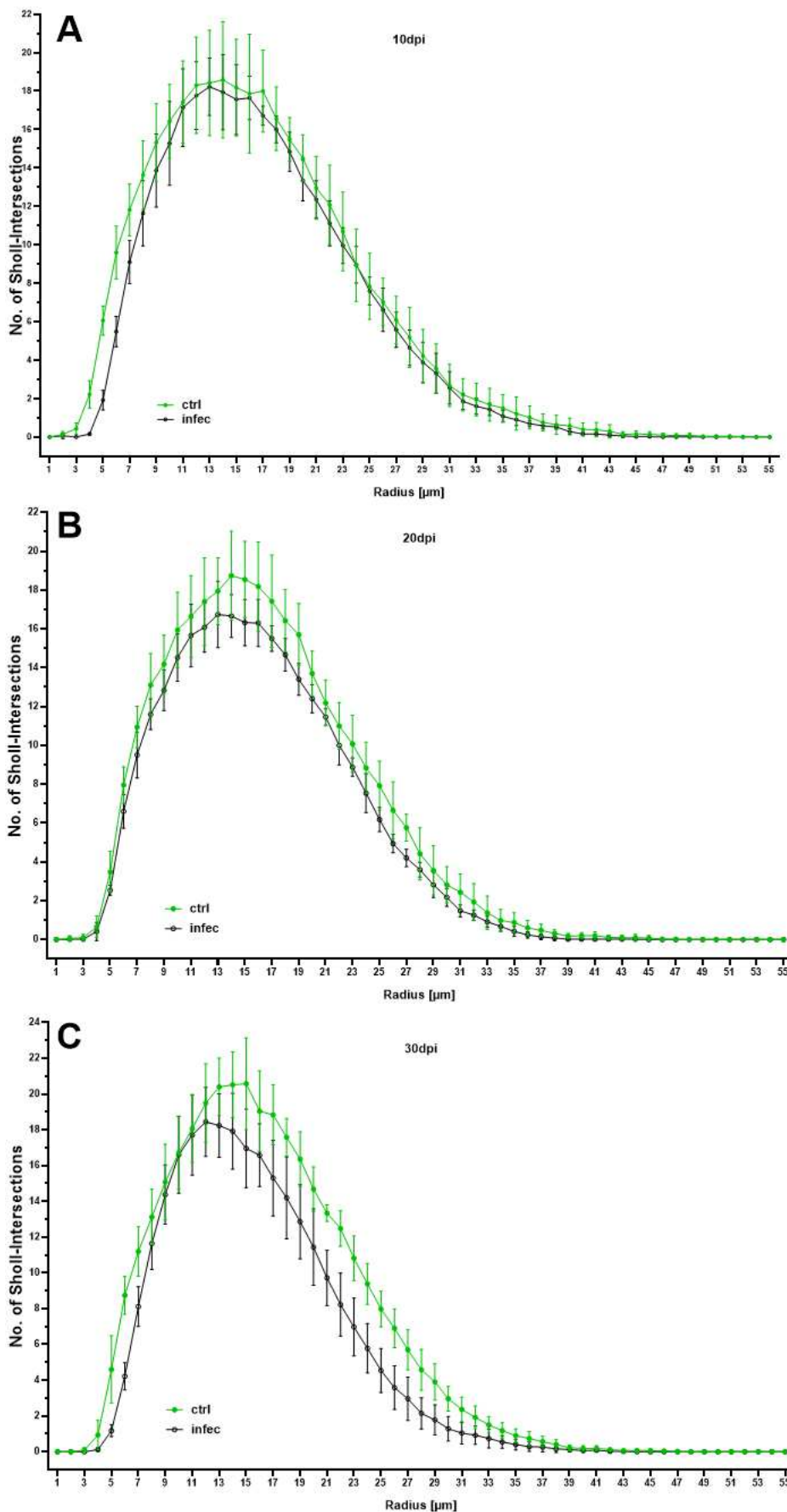


Abbildung 27: Anzahl der Sholl-Intersections

Die Abbildung zeigt die korrigierte mittlere Anzahl der Sholl-Intersections in Schritten von $1\mu\text{m}$ jeweils nach 10dpi (A), 20dpi (B) und 30dpi (C). Auf der X-Achse ist der Radius in μm als vermeintliche Entfernung zum Soma aufgetragen. Auf der Y-Achse die jeweilige Anzahl der Schnittpunkte mit den konzentrischen Kreisen um das Soma herum. Die Kontrollgruppe wurde jeweils in grün dargestellt, die infizierte in schwarz. Zusätzlich ist für jeden Messpunkt jeweils die Standardabweichung aufgetragen. Bereits visuell lässt sich festhalten, dass die schwarze Kurve nach allen drei Infektionsdauern unterhalb der grünen Kurve liegt und damit einhergehend die Fläche unter der grünen Kurve stets größer als die unter der schwarzen Kurve sein muss. Diese Diskrepanz steigt im Infektionsverlauf. Dennoch verlaufen jeweils die beiden Kurven nach 10dpi und 20dpi zu großen Teilen innerhalb der Standardabweichungen der jeweils anderen Kurve, sodass hier noch nicht auf signifikante Unterschiede geschlossen werden kann.

In Abbildung 28 lässt sich ein zunehmender signifikanter Abfall der AUC im Infektionsverlauf gegenüber den Kontrollgruppen festhalten. Liegt die mediane AUC nach 10dpi ($p = 0,0202$) und 20dpi ($p = 0,0010$) noch etwa bei 88% gegenüber der Kontrollgruppe, sinkt sie nach 30 dpi auf 74% ($p = 0,0004$). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die oben im Rahmen von Abbildung beschriebenen Unterschiede nicht nur deskriptiv nachweisbar, sondern auch statistisch signifikant und numerisch relevant sind. Entsprechend sind die Sholl-Intersections bzw. deren AUC als aussagekräftiges Maß für die Verzweigungskomplexität heranziehbar ist.

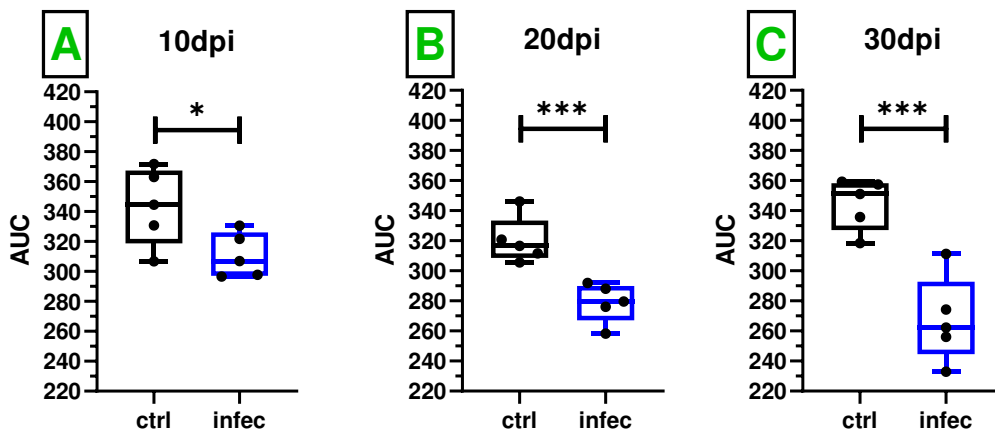


Abbildung 28: area under the curve der Sholl-Intersections

Die Abbildung zeigt die *area under the curve* (AUC) der Sholl-Intersections aus der Abbildung als Box-Whisker-Plots. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Auf statistische Signifikanz wurde mittels unpaarem, *one-tailed* T-Test geprüft. Die AUC dient als Maß für die Verzweigungskomplexität. Die schwarzen Boxen entsprechen der jeweiligen Kontrollgruppe, die blauen der infizierten Gruppe. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierter Gruppe sind zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant (nach 10dpi [$p = 0,0202$] in [A], 20dpi [$p = 0,0010$] in [B] sowie 30dpi [$p = 0,0004$] in [C]).

Diese Ergebnisse reihen sich nahtlos in den anderen unter 3.3.2 beschriebenen Erkenntnissen ein und sprechen für eine deutliche Abnahme der Verzweigungslänge und -komplexität bei voranschreitender Infektion.

3.3.3 Qualitative Morphologiebeschreibung von Mikrogliazellen unter quantitativen Gesichtspunkten

In den vorangegangenen Kapiteln wurde ausführlich die morphologische Veränderung der Somata und Fortsätze bzw. der Fortsatzverzweigung im Infektionsverlauf unter quantitativen Gesichtspunkten dargestellt. Im Kapitel 3.3.1 wurde erläutert, dass die Volumina der mikroglialen Zellkörper bei fortschreitender Infektionsdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe größer werden, während ihre Form zunehmend weniger rund ausfällt. Parallel dazu werden im Infektionsverlauf die Fortsätze zunehmend kürzer bzw. ihre Verzweigung weniger komplex, was wiederum zu der Annahme führt, dass die MG auch ein kleineres Volumen überwachen – wie im Kapitel 3.3.2 ausgeführt.

In Abbildung 29 werden abschließend jeweils drei repräsentative Rekonstruktionen kortikaler MG aus den sechs unterschiedlichen Untersuchungsgruppen zur morphologischen Beurteilung nebeneinander dargestellt, um die vorangegangenen Ergebnisse zu veranschaulichen. Der Maßstab bleibt hierbei für alle Rekonstruktionen gleich!

Es lässt sich auch bei den in Abbildung 29 exemplarisch gezeigten Rekonstruktionen nachvollziehen, dass

- (1) die Somata im Infektionsverlauf größer werden,
- (2) weniger rund imponieren,
- (3) die Fortsätze bzw. die mutmaßliche Gesamtfortsatzlänge kürzer werden,
- (4) die Verzweigungskomplexität und
- (5) die vermeintlich überwachten Volumina (gemessen an dem von den Fortsätzen überspannten Volumina) abnehmen.

Dies zeigt, dass die hier durchgeführten mikroglialen Rekonstruktionen mittels Imaris Bitplane geeignet sind, um morphologische Veränderungen von MG im Krankheitsverlauf der Trypanosomiasis qualitativ (3.3), aber insbesondere auch quantitativ (3.2) zu belegen. Angesichts der überwiegend eindeutigen Ergebnisse ist es gut denkbar, dass diese Methodik auch für andere Fragestellungen

(beispielsweise bzgl. anderer Infektionen oder in neurodegenerativen Prozessen) geeignet.

Darüber hinaus wurden die Zell- und Duplettdichte (3.1) als Maß für die Proliferation anhand in Imaris Bitplane dokumentierter *Spots* in zweiphotonenmikroskopisch aufgenommenen *Z-Stacks* bestimmt. Auch diese Auswertung lieferte – mit gewissen Einschränkungen – zuverlässige Ergebnisse, welche aber weniger auf die Auswertung mit Imaris Bitplane zurückzuführen sind.

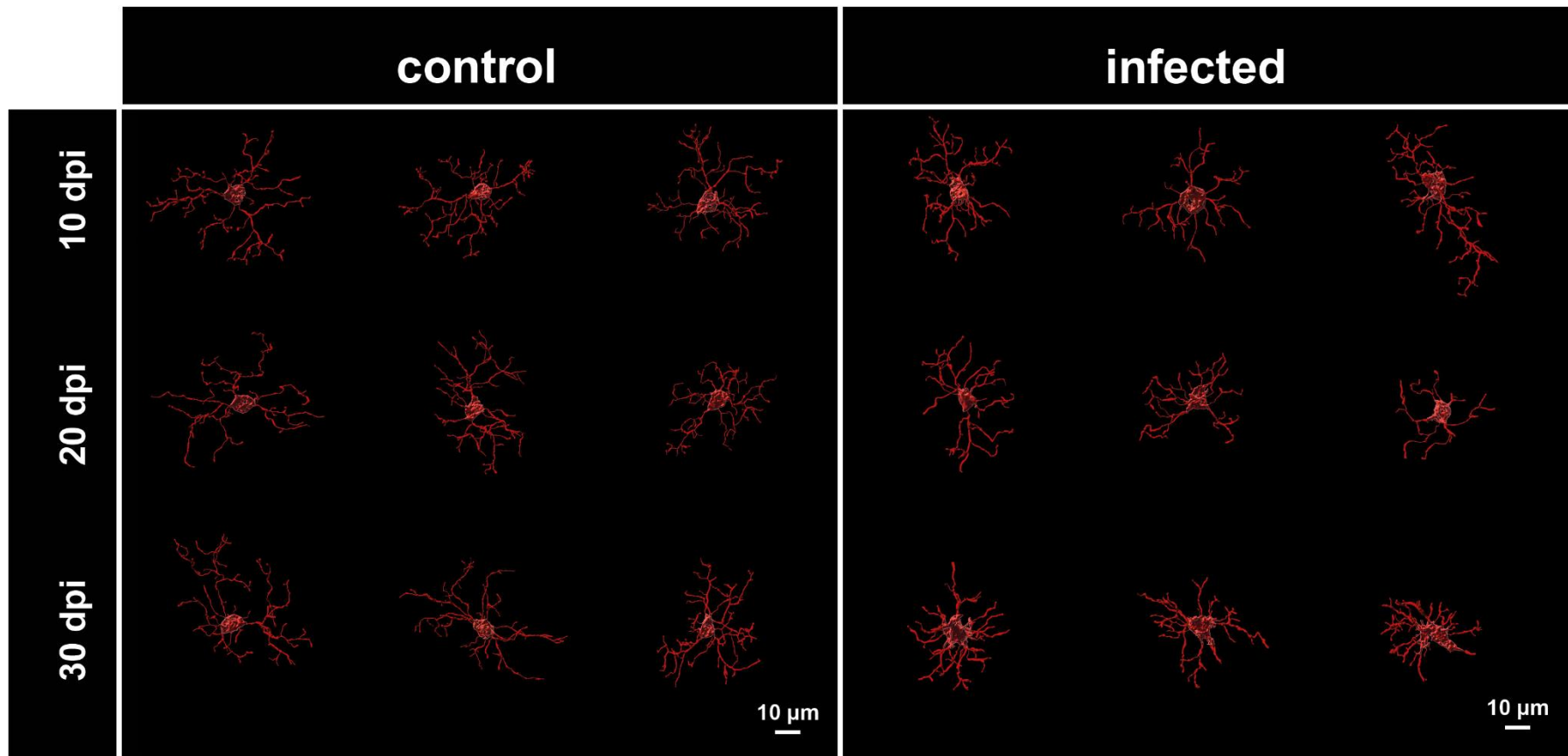


Abbildung 29: Übersicht morphologischer Veränderungen im Infektionsverlauf

Die Abbildung zeigt jeweils neun repräsentative MG aus den Kontroll- (links) und infizierten Gruppen (rechts). Die Zellen sind je nach Infektionsdauer (10dpi, 20dpi bzw. 30dpi) in den drei Zeilen organisiert. Es lässt sich festhalten, dass sich die Morphologie der MG aus den Kontrollgruppen kaum unterscheidet. Parallel dazu wird deutlich, dass – wie in den Kapiteln [3.3.1](#) und [3.3.2](#) bereits dargestellt – die Somata im Infektionsverlauf immer größer werden, während die Fortsätze bzw. deren Verzweigungen immer kürzer bzw. weniger komplex werden. Der Balken in der jeweils unteren rechten Ecke entspricht 10 μ m.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Proliferation und Morphologie von MG in unterschiedlichen Gehirnarealen (LPA, PVR, Cortex) nach peritonealer Infektion mit *Tbb* (Stamm: GVR 35 m-Cherry) in C57BL/6-Mäusen nach unterschiedlichen Zeitpunkten (10dpi, 20dpi, 30dpi) quantitativ ausgewertet und eine effektive Methode zur 3D-Rekonstruktion der mikroglialen Morphologie mittels Imaris Bitplane etabliert, welche eine Beschreibung, Darstellung und Auswertung mikroglialer Morphologien ermöglicht. Die Verwendung von 3D-Rekonstruktionen ist an sich nicht neu (Frevert *et al.*, 2012; Coles *et al.*, 2015; Hellwig *et al.*, 2016; Davies *et al.*, 2017; Heindl *et al.*, 2018; Althammer *et al.*, 2020), wurde aber, meiner Recherche nach, gerade im Kontext der HAT nur wenig verwendet. Die hier verwendete 3D-Rekonstruktion basiert auf zweiphotonenmikroskopischen Bildern, die vom zu untersuchenden Gewebe nach durchgeführtem anti-iba-1-Labeling aufgenommen wurden. Bemerkenswerterweise fielen bei der Auswertung der Aufnahmen gesteigerte Intensitäten mit zunehmender Infektionsdauer auf, was bei anti-iba-1-Labelings bereits in der Literatur vorbeschrieben ist (Streit *et al.*, 2009). Die genannten Areale wurden ausgewählt, da in der Literatur ein bevorzugter Befall des Liquors und Ventrikelsystems, der ZVO, die mit dem Ventrikelsystem assoziiert sind und darauffolgend der *Pia mater* beschrieben wird (Wolburg *et al.*, 2012; Mogk, Meiwes, Boßelmann, *et al.*, 2014). Es wurde auch ein früher Befall von Teilen des Hypothalamus (beispielsweise der präoptischen Kerngebiete) beschrieben (Schultzberg *et al.*, 1988), welche topographisch nahe den zuvor genannten Strukturen liegen. Die Übersichtsarbeit von Bentivoglio *et al.* (2018) ergänzt diesen Sachverhalt. Damit schienen direkte MG-Erreger-Kontakte und eine darauffolgende Veränderung der Morphologie von MG wahrscheinlich. In der Literatur, beispielsweise den Übersichtsarbeiten von Cunningham (2013) und Hoogland *et al.* (2015) wurden allerdings auch morphologische Veränderungen von MG nach peripheren Immunstimulationen, beispielsweise mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) oder lebenden oder abgetöteten Bakterien, beschrieben, ohne dass die MG direkten Kontakt zu Erregern hatten. Dies impliziert, dass MG auch auf peripher ausgeschüttete Botenstoffe (a. e. Chemo- und Zytokine)

reagieren können, welche wiederum ihrerseits die Barrieren des ZNS überwinden müssen, um eine Reaktion der im ZNS liegenden Zellen hervorrufen zu können. Eine Veränderung der Morphologie ist unter diesem Aspekt nicht mit einem direkten Erregerkontakt gleichzusetzen.

Zunächst wurde in dieser Arbeit die mikrogliale Zelldichte abhängig vom untersuchten Gehirnareal nach unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass diese im Krankheitsverlauf ansteigt (vgl. Abbildung 9). Zwar war der Anstieg nach 10dpi noch nicht signifikant, doch ließ sich in den Box-Whisker-Plots ein Anstieg im PVR nach 10dpi zumindest erahnen. Bei genauem Betrachten der einzelnen Datensätze innerhalb der Untersuchungsgruppen fiel auf, dass die Daten mancher Mäuse stark von den Daten der anderen Mäuse innerhalb einer Gruppe abweichen konnten (vgl. Anhangsabbildung 6 und Anhangsabbildung 7), was dazu beiträgt, dass der Gesamteindruck nach 10dpi nicht signifikant war. Deshalb empfiehlt sich für nachfolgende Untersuchungen eine Erhöhung der Anzahl untersuchter Mäuse pro Untersuchungsgruppe. Außerdem konnte eine Publikation (Uzategui *et al.*, 2023) mittels *in vivo*-Daten zeigen, dass die MG-Zelldichten bereits nach 10dpi in allen Arealen signifikant ansteigen. Nach 20dpi war deren MG-Zelldichte im PVR und der LPA signifikant erhöht, nach 30dpi auch im Cortex. Daraus könnte man ableiten, dass als erstes der PVR und danach die LPA und abschließend der Cortex mit einer erhöhten Zelldichte reagieren, vermutlich jeweils als Reaktion auf Erreger oder ein gewisses Ausmaß an peripheren Stimuli auf die MG in den entsprechenden Arealen. Auch Maloba *et al.* (2012) stellten perimeningeal eine deutliche und frühzeitige Erhöhung CD68⁺-Zellen – welche auch nicht-mikrogliale Immunzellen beinhalten kann (Rabinowitz und Gordon, 1991) – und mit zunehmender Entfernung zu den Meningen eine weniger deutliche Zunahme fest. Tatsächlich diskutieren Bentivoglio *et al.* (2018) in ihrem Review eine Invasion der *Eminentia mediana* und interpretierten einen parasitären Befall der an die *Eminentia mediana* angrenzenden *Ncl. arcuati* als von der *Eminentia mediana* ausgehend. Dies wäre also mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichbar und würde diesen geschilderten zeitlichen Verlauf unterstützen.

Prinzipiell sind für erhöhte MG-Zelldichten zwei Mechanismen denkbar: Proliferation und/oder Immigration peripherer Zellen, wobei bei intakten Barrieren des ZNS eine Immigration quasi ausgeschlossen ist (Hogan *et al.*, 2004; Ajami *et al.*, 2007; Ginhoux *et al.*, 2010; Goldmann *et al.*, 2013; Hashimoto *et al.*, 2013; Kierdorf *et al.*, 2013; Yona *et al.*, 2013). Deshalb wurde im nächsten Schritt die Dichte an Duplets untersucht (Duplettdichte als Surrogatparameter für die Anzahl der Zellteilungen). Als Duplet wurden – basierend auf den Ergebnissen von Askew *et al.* (2017) – zwei MG mit einem Zell-Zell-Abstand unter 20 μm definiert (Rohdaten vgl. Anhangsabbildung 2 bis Anhangsabbildung 5). In allen drei Arealen fanden sich nach 10dpi und 20dpi keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 10), aber auch hier war dennoch ein eindeutiger Trend in den Box-Whisker-Plots für den PVR und die LPA zu sehen, weshalb auch hier die genauen Verteilungen innerhalb der Gruppen näher betrachtet wurden (vgl. Anhangsabbildung 8 und Anhangsabbildung 9). Auch hier kann man sehen, dass starke Schwankungen innerhalb der Gruppen vorlagen, was bei $n = 5$ schnell zu einer ausbleibenden statistischen Signifikanz führen könnte. Deshalb könnte eine Erhöhung der untersuchten Mäuse pro Untersuchungsgruppe in nachfolgenden Untersuchungen signifikante Ergebnisse produzieren und den geschilderten „Trend“ als signifikant bestätigen. Nach 30 dpi war die Duplettdichte in der vorliegenden Arbeit in allen Arealen signifikant erhöht (vgl. Abbildung 10), was aber mit Vorsicht zu interpretieren ist, da in den 30dpi infizierten Mäusen die Zell-Zell-Abstände teilweise so klein waren und die Zellen selbst so groß werden konnten, dass abschnittsweise nahezu ausschließlich Duplets in einzelnen Aufnahmen verzeichnet werden konnten (Daten/Bilder nicht gezeigt). Unter Berücksichtigung des im Folgenden beschriebenen Anteils immigrierter Zellen kommt außerdem ein nicht zu vernachlässigender Anteil immigrierter Immunzellen hinzu. Tatsächlich konnte in einer Publikation (Uzcategui *et al.*, 2023) *in vivo* für den Kortex gezeigt werden, dass der Anteil sich teilender Zellen unter ähnlichen Infektionsbedingungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht ist. Die Regionen LPA und PVR sind mit diesem *in vivo*-Setup leider nur schlecht darzustellen. In dieser geplanten Veröffentlichung wurde allerdings nicht die Duplettdichte

als Surrogatparameter zur Beurteilung der Proliferation gewählt, sondern sich tei-
lende kortikale Zellen *in vivo* direkt nachgewiesen.

Da für die erhöhten Zell- und Duplettdichten neben der Möglichkeit der Proliferation auch die Möglichkeit der Immigration peripherer Immunzellen in das ZNS besteht, wurde im nächsten Schritt untersucht, wie hoch der Anteil von Immunzellen aus der Peripherie in den unterschiedlichen Arealen nach den unterschiedlichen Zeitpunkten war. Es konnte in Zusammenschau mit der Arbeit von Speidel (2020) unter Verwendung des makrophagenspezifischen anti-iba-1- (Ohsawa *et al.*, 2004) und eines weitestgehend mikroglia-spezifischen anti-TMEM119-Immunolabelings (Bennett *et al.*, 2016; Satoh *et al.*, 2016, 2019) gezeigt werden, dass der Anteil ins ZNS immigrierter Immunzellen nach peritonealer Infektion mit *Tbb* von C57BL/6-Mäusen nach 30dpi je nach Areal zwischen 37% und 54% beträgt und statistisch signifikant ist [vgl.: Speidel, (2020)] nach 10dpi und 20dpi aber vernachlässigbar gering ist (vgl. Abbildung 12). Allerdings wurden kürzlich auch einige Arbeiten publiziert, die belegen, dass TMEM119 nicht mikroglia-spezifisch zu sein scheint, was im Falle einer Expression in peripheren Geweben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aber nicht zu sehr beeinflussen dürfte (Jiang *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2021; Yang, Wang und Zheng, 2021; Young *et al.*, 2021; Vankriekelsvenne *et al.*, 2022). Allerdings wird die Zuverlässigkeit des Markers zur Unterscheidung von Makrophagen und MG unter pathologischen Bedingungen ebenfalls in Frage gestellt (Vankriekelsvenne *et al.*, 2022). Young *et al.* (2021) konnten im Zusammenhang mit einem Schlaganfall beispielsweise eine Abnahme der Expression von TMEM119 feststellen. Dies wäre mit einer Herunterregulierung von TMEM119 unter pathologischen Bedingungen vereinbar. Unter den Untersuchungsbedingungen dieser Arbeit war die Expression von TMEM119 allerdings stets bei einem Großteil der MG gegeben, sodass von einer sicheren Unterscheidung ausgegangen werden kann. Dass sich unter den anti-TMEM119-Immunzellen auch eine kleine Subpopulation von MG befindet, die TMEM119 runterreguliert haben, lässt sich allerdings nicht sicher ausschließen.

Nun wurde die zuvor bestimmte Zelldichte nach 30dpi auf den entsprechenden Anteil der reinen MG-Population korrigiert und in Abbildung 14 erneut dargestellt.

Die Unterschiede zur Kontrollgruppe blieben signifikant. Entsprechend ist auch nach 30dpi von einem relevanten Anteil an Proliferation auszugehen, da auch die korrigierte Zelldichte von 20dpi nach 30dpi anstieg.

Zwar wurde in der Arbeit kein direkter Erregernachweis erbracht, allerdings ist eine erhöhte Zahl immigrierter Immunzellen bei erhöhter parasitärer Infiltration des Gehirnparenchyms beschrieben (Masocha *et al.*, 2004; Amin *et al.*, 2012) wobei es sich v. a. um Lymphozyten handelte (Masocha *et al.*, 2004; Amin *et al.*, 2012). Geht man also davon aus, dass nach 30dpi eine Invasion des Parasiten in das ZNS stattgefunden hat, dann befinden sich die infizierten Mäuse nicht mehr in dem von Wolburg *et al.* (2012) und Mogk *et al.* (2017) zur Unterteilung des zweiten klinischen HAT-Stadiums vorgeschlagenen ventrikulomeningealen Stadium und es erfolgt eine direkte Interaktion der MG mit den Erregern innerhalb des Gehirnparenchyms. Ein Nachweis von Trypanosomen fand in den untersuchten Schnitten allerdings nicht statt.

Als nächstes wurde die Morphologie der MG genauer untersucht. Veränderungen der mikroglialen Morphologie als Reaktion auf allerlei akute und chronische Schäden des Gehirnparenchyms, wurden zu Beginn dieser Arbeit ausführlich diskutiert und dargelegt. Die Veränderung der mikroglialen Morphologie als Reaktion der MG auf eine Infektion mit *Tb ssp.* ist in der Literatur nicht systematisch untersucht (Chianella *et al.*, 1999).

Interessanterweise ist in der Literatur – wie beispielsweise in den Reviews von Cunningham (2013) und Hoogland *et al.* (2015) diskutiert – beschrieben, dass MG nicht nur auf direkte Interaktionen mit Pathologien angewiesen sind, um auf eine Infektion zu reagieren, sondern eben auch beispielsweise auf eine periphere LPS-Injektion als Modell für eine bakterielle Infektion reagieren können. Indizien für ein ähnliches Verhalten während einer aktiven Infektion mit *Tb.* konnten in dieser Arbeit gefunden werden. Dies wird auch von einigen Arbeiten gestützt, die keine direkte oder zeitlich verzögerte ZNS-Invasion beschrieben haben (Wolburg *et al.*, 2012; Mogk, 2014; Mogk, Meiwes, Shtopel, *et al.*, 2014; Speidel *et al.*, 2022). Diese wäre wiederum nötig, um direkte Erreger-MG-Interaktionen zu ermöglichen, wie beispielsweise basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit nach 30dpi angenommen. Allerdings sind die Mechanismen und Wege der ZNS-

Invasion bzw. die direkten Interaktion zwischen MG und Tbb prinzipiell noch nicht besonders gut verstanden. Einige andere Autoren beschreiben beispielsweise auch eine raschere ZNS-Invasion durch *Tbb* (Frevert *et al.*, 2012), wobei Wolburg *et al.* (2012) wiederum nachweisen konnten, dass artifiziell in das ZNS eingebrachte *Tbb* nach wenigen Tagen nicht mehr im ZNS nachweisbar sind. Auch konnten Figarella *et al.* (2018) zeigen, dass *Tbb in vitro* nach Kontakt mit MG zeitnah von diesen phagozytiert werden können.

Zur Beurteilung der morphologischen Veränderungen der MG wurden hochauflösende, stark vergrößerte Bilder von kortikalen MG mittels Zweiphotonenmikroskopie aufgenommen und mittels Imaris Bitplane rekonstruiert. Eine ausgiebige Analyse der Morphologien im PVR und der LPA fand in dieser Arbeit nicht statt, da dies den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte. Der Fokus der morphologischen Analyse wurde auf den Kortex gesetzt. Dies erschien deshalb sinnvoll, da die *Pia mater* und die *Glia limitans*, wie eingangs ausführlich beschrieben, als letzte Barriere den Parasiten von dem Eindringen in das Gehirnparenchym abzuhalten scheinen, während mit dem Liquorraum assoziierte Areale frühzeitiger betroffen sind.

Morphologisch erschienen, insbesondere nach 30dpi, bereits qualitativ starke Unterschiede zwischen infizierter und Kontrollgruppe (vgl. [Abbildung 15](#) und [Abbildung 29](#)). Zur Quantifizierung wurden sowohl die Somata als auch die Fortsätze analysiert. In den Kontrollgruppen waren die MG in allen Arealen zu allen Zeitpunkten nahezu ausschließlich *ramified* (vgl. [Abbildung 29](#)). Diese Morphologie wird in der Literatur auch als *surveillant state* bezeichnet, was etwas irreführend ist, da es impliziert, dass andere Morphologien ihre Umgebung nicht mehr überwachen, was aber nicht der Fall ist, da sie dann auch auf keine neuen Stimuli reagieren könnten, was sie aber nachweislich prinzipiell können (Davalos *et al.*, 2005). Diese nomenklatorische Problematik wird von Paolicelli *et al.* (2022) ausführlich diskutiert. Diese *ramified* Morphologie ist im Cortex des adulten und vermeintlich gesunden Gehirns weit verbreitet (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn, Kirchhoff und Helmchen, 2005; Jinno *et al.*, 2007; Tremblay, Lowery und Majewska, 2010; Vinet *et al.*, 2012). In den MG der infizierten Tiere zeichnete sich im Krankheitsverlauf bei den Somata ein Trend zur Vergrößerung (vgl. [Abbildung](#)

17) und zur Entrundung (vgl. [Abbildung 18](#)) und bei den Fortsätzen ein Trend der Verkürzung der Fortsatzgesamtlänge (vgl. [Abbildung 23](#)) und Simplifizierung der Verzweigungskomplexität ab (vgl. [Abbildung 26](#) bis [Abbildung 28](#)), was wiederum mit einem vermeintlich kleineren überwachten Volumen einhergeht und die Fähigkeit der *surveillance*, zumindest bezüglich des überwachten Volumens ([Abbildung 25](#)), drastisch einschränken dürfte. Die MG veränderten sich also immer mehr hin zur hypertrophen Morphologie, welche in der Literatur für gewöhnlich als reaktiv auf eine pathologische Veränderung beschrieben wurde (Streit und Sparks, 1997; Griciuc *et al.*, 2013; Hinwood *et al.*, 2013; Raj *et al.*, 2014; Bachstetter *et al.*, 2015; Zanier *et al.*, 2015; Bouvier *et al.*, 2016; Hellwig *et al.*, 2016; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Hui *et al.*, 2018; Maxan *et al.*, 2018). Nach 30dpi zeigten sich nahezu ausschließlich hypertrophe und amöboide Morphologien in der infizierten Gruppe. Die amöboide Morphologie ist in der Literatur wiederum v. a. im Zusammenhang mit der Phagozytose von Erregern, Zellen, Zellmaterial und anderweitigen Ablagerungen beschrieben worden (Tremblay *et al.*, 2013; Bachstetter *et al.*, 2015; Bouvier *et al.*, 2016; Shobin *et al.*, 2017; Maxan *et al.*, 2018). In diesem Zusammenhang sollte vielleicht noch erwähnt werden, dass in der Literatur radiäre Ausdehnungen von über 30 μm im Radius für *ramified* MG beschrieben wurden (Jinno *et al.*, 2007), was in der vorliegenden Arbeit – zumindest in Z-Ebene – nicht abgebildet werden konnte, da die Dicke der Bilderstapel für die Rekonstruktionen in dieser Arbeit methodisch bedingt nur 25 μm in Z-Richtung umfassten und damit die Bestimmung der Ausdehnung in Z-Richtung erheblich eingeschränkt wurde. Damit könnte der (hier nicht abbildbare) Unterschied zwischen infizierten und Kontrollgruppen vermutlich noch größer ausfallen, da insbesondere *ramified* MG der Kontrolltiere von dieser Beschneidung betroffen sein dürften. Dennoch lässt sich festhalten, dass sich anhand der Sholl-Intersections in [Abbildung 27](#) für die Kontrolltiere (unter der Annahme, dass alle rekonstruierten Zellen der Kontrolltiere morphologisch *ramified* sind) erahnen lässt, dass in Einklang mit Jinno *et al.* (2007) (obgleich der unterschiedlichen Methodik) $r_{\text{Soma}} < 4 \mu\text{m}$ und $r_{\text{Fortsätze}} > 30 \mu\text{m}$ bestimmt wurden. Hefendehl *et al.* (2014) beschrieben anhand ähnlicher Parameter (*distance to nearest neighbour*, Zelldichte, Fortsatzlänge, Fortsatzverzweigungspunkte etc.)

tendenziell ähnliche Entwicklungen der mikroglialen Morphologie für den physiologischen Alterungsprozess: größere und ‚unrundere‘ Somata, kürzere und weniger verzweigte Fortsätze, reduziertes überwachtes Volumen; sogar Zunahme von ‚unüberwachten‘ Volumina bei gleichbleibender Zellzahl sowie Zunahme der Zelldichte.

Wie einleitend beschrieben, bleibt der Pathomechanismus der eigentlichen ZNS-Invasion von *Tb ssp.* nach wie vor weitestgehend ungeklärt. Allerdings hatte diese Arbeit auch nicht die Zielsetzung, sich an der Klärung des Infektionsweges selbst zu beteiligen. Viel mehr ging es darum, die Reaktion der MG auf die Infektion zu beschreiben. Es konnte gezeigt werden, dass die MG sehr früh auf eine periphere Infektion mit Proliferation und geringeren morphologischen Veränderungen reagieren; auch wenn ein direkter Kontakt mit dem Erreger vermutlich noch nicht stattgefunden hat (nach 10dpi und 20dpi). Geht man davon aus, dass nach 30dpi die Barrieren des ZNS von den Parasiten überwunden werden konnten und direkte Interaktionen zwischen MG und Parasiten stattfanden, erklärt dies die massiven Veränderungen der MG weg von der *ramified* hin zur hypertrophen und amöboiden Morphologie als direkte Reaktion auf die Erreger und um die Phagozytose der Erreger zu erleichtern. Ein direkter Nachweis der Erreger im Parenchym fand allerdings in dieser Arbeit zu keiner Zeit statt, sodass ein Beleg für direkte Interaktionen, beispielsweise von Phagozytose, in dieser Arbeit nicht erbracht wurde. Auch könnten die MG ihre Morphologie aufgrund chemotaktischer Signale verändert haben, wie bereits mehrfach erwähnt.

Abschließend lässt sich sagen, dass die dargestellten Ergebnisse belegen, dass die hier durchgeführten mikroglialen Rekonstruktionen mittels Imaris Bitplane geeignet sind, um morphologische Veränderungen von MG im Krankheitsverlauf der Trypanosomiasis qualitativ (3.3), aber insbesondere auch quantitativ (3.2) zu belegen. Angesichts der überwiegend eindeutigen Ergebnisse ist es gut denkbar, dass diese Methodik auch für andere Fragestellungen geeignet ist, beispielsweise bzgl. Anderer Infektionen oder in neurodegenerativen Prozessen. Darüber hinaus wurden die Zell- und Duplettdichte (3.1) als Maß für Proliferation anhand in Imaris Bitplane dokumentierter *Spots* in zweiphotonenmikroskopisch

aufgenommen *Z-Stacks* bestimmt. Auch diese Auswertung lieferte mit gewissen Einschränkungen zuverlässige Ergebnisse – welche aber weniger auf Imaris Bitplane zurückzuführen sind. Statistisch nicht-signifikante Ergebnisse können durch Erhöhung der untersuchten Mäuse und Schnitte ggf. zu signifikanten Ergebnissen führen. Die Verwendung der Duplettdichte als Surrogatparameter erscheint gerade angesichts der neueren *in vivo*-Daten und der zweifelhaften Verwendbarkeit nach 30dpi im Kontext der HAT als weniger zuverlässig oder aussagekräftig.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte im Mausmodell die Infektion mit *Trypanosoma brucei brucei* (*Tbb*) näher untersucht werden, um Erkenntnisse über Proliferationsverhalten und morphologische Veränderungen von MG im Rahmen dieser Infektion zu erhalten und um so ein besseres Verständnis für mikrogliales Verhalten im zeitlichen Verlauf von pathologischen Prozessen zu bekommen. Dies sollte nicht qualitativ, sondern insbesondere quantitativ erfolgen, da quantitative Analysen der morphologischen Veränderung von MG insbesondere im Rahmen der Humanen Afrikanischen Trypanosomiasis (HAT) bisher wenig erfolgten bzw. veröffentlicht wurden.

Verwendet wurde hierfür ZNS-Gewebe aus einem anderen Projekt. Dieses Gewebe stammt von 30 weiblichen C57BL/6-Mäusen, die in sechs Fünfergruppen aufgeteilt worden waren. Je nach Gruppenzuteilung, erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion, entweder mit PBS (Kontrollgruppen) oder einer Parasitensuspension, die den Parasiten *Tbb* (Stamm: GVR 35 m-Cherry) enthielt. Die Tiere wurden 10, 20 oder 30 Tagen nach der Injektion eingeschläfert, das Gewebe entnommen, fixiert und bis zur weiteren Prozessierung bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde dann immunhistochemisch mit den weitestgehend makrophagen- bzw. mikroglia-spezifischen primären Antikörpern anti-iba-1 bzw. anti-TMEM119 sowie weiteren sekundären Antikörpern markiert. Anschließend wurden mittels Zweiphotonenmikroskopie Bilderstapel (als Annäherung an eine dreidimensionale Aufnahme) der Gehirnareale LPA, PVR und Cortex unterschiedlicher Gesamtvergrößerung und Auflösung (abhängig von der Fragestellung) aufgenommen. Mittels Fiji-Software und Imaris Bitplane-Software wurden die Aufnahmen bearbeitet und dann ausgewertet.

Zunächst wurde versucht, die Frage nach dem Proliferationsverhalten zu klären. Hierfür wurden mikrogliale (MG) Zell- und Duplettdichte in den Arealen *lateral preoptic area* (LPA), periventrikuläre Region (PVR) und Cortex bestimmt, die den Erwartungen entsprechend im Infektionsverlauf anstiegen. Um auszuschließen, dass der Zuwachs an Zellen einer Immigration peripherer Immunzellen entspricht, wurde zusammen mit der Arbeit von Speidel (2020) der Anteil anti-TMEM119⁺/anti-iba-1⁺-Zellen bestimmt. Es zeigte sich (unter der Annahme, dass

TMEM119 ein zuverlässiger mikroglia-spezifischer Marker ist), dass der Anteil peripherer Immunzellen erst nach 30dpi erwähnenswert ausfällt, dafür aber dann abhängig vom Areal zwischen 37% und 54% ausmachen kann. Entsprechend lässt sich festhalten, dass nach 10dpi und 20dpi eher keine peripheren Zellen die Zell- und Duplettdichte verfälscht haben. Da davon auszugehen ist, dass auch nach 30dpi eine relevante Proliferation stattgefunden hat, wurde die Zelldichte um den immigrierten Anteil bereinigt erneut dargestellt, was die These der anhaltenden Proliferation stützt.

Als nächstes fand die Analyse der mikroglialen Morphologie statt. Hierfür wurden nur kortikale MG aufgenommen und mittels Imaris Bitplane dreidimensional rekonstruiert. Da methodisch bedingt die aufgenommenen Bilderstapel lediglich eine Dicke von 25µm abdeckten, insbesondere *ramified* MG aber auch mit deutlich größeren Durchmessern des von ihnen überwachten Volumens beschrieben sind, sind die in dieser Arbeit bestimmten Größenordnungen allerdings eher relativ als absolut zu sehen. Dennoch führten sie zu aussagekräftigen und vergleichbaren Ergebnissen, da alle Zellen stets mittig aufgenommen wurden und die beschriebenen morphologischen Veränderungen damit eher noch signifikanter im Vergleich zu den Kontrollgruppen ausgefallen wären, da entsprechend v. a. die Fortsätze der *ramified* MG der Kontrollgruppen entsprechend stärker ‚beschnitten‘ wurden. Für die Rekonstruktionen wurden die Somata und die Fortsätze der MG jeweils mit einem eigenen Algorithmus in Imaris Bitplane rekonstruiert und verschiedene Parameter der Rekonstruktionen aus der Software exportiert. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bereits nach 10dpi signifikante Veränderungen der Somata und der Fortsätze auftreten. Dies umfasst insbesondere vergrößerte und entrundete Somata und verkürzte, weniger verzweigte Fortsätze bis hin zur teils völlig amöboiden Morphologie im Fortschreiten des Infektionsverlaufs. Dies ist deshalb besonders interessant, da kortikale MG auch in der meningoenzephalitischen Phase erst sehr spät direkten Erregerkontakt haben, diese aber (zumindest im Rahmen der vorliegenden Arbeit) ihre Morphologie dennoch schon sehr früh angefangen haben, zu verändern. Zwar wurden Erreger in dieser Arbeit nie direkt nachgewiesen, dennoch kann man anhand der vorangegangenen Schilderungen vermuten, dass nach 10dpi und 20dpi

keine direkten Erreger-MG-Interaktionen stattfanden und damit die morphologischen und proliferativen Veränderungen am ehesten als Reaktion auf Botenstoffe aus dem Blut (a. e. Chemo- und Zytokine) zu interpretieren wären.

Abschließend lässt sich also zusammenfassen, dass die MG schon frühzeitig beginnen, zu proliferieren und auch eine immer mehr reaktiv wirkende Morphologie zeigen; auch wenn sie vermutlich eher noch keinen direkten Kontakt zum Erreger selbst hatten. Inwiefern diese morphologischen Veränderungen zur Symptomatik der HAT beitragen oder diese die Symptomatik eher in Zaum halten, lässt sich anhand dieser Untersuchungsergebnisse nicht sagen. Es lässt sich aber festhalten, dass die verwendeten Methoden zur Quantifizierung der Zelldichte, des Anteils der aus der Peripherie immigrierten Immunzellen und der Morphologie sehr gut geeignet sind, um diese zu bestimmen und zu beschreiben. Prinzipiell sollte es auch möglich sein, diese Methoden auf andere Fragestellungen, beispielsweise im Rahmen anderer Pathomechanismen, zu übertragen.

Auch die Methode zur Bestimmung der Duplettdichte könnte, sofern es sinnvoll erscheint und mit weiteren Methoden kombiniert wird, im Rahmen anderer Fragestellungen angewandt werden, allerdings gibt es zur Untersuchung von Proliferation auch sehr gute *in vivo* Imagingmethoden, die ggf. eindeutigere Ergebnisse liefern könnten. In dieser Arbeit sind die Ergebnisse der Duplettdichte erst nach 30dpi signifikant, wobei hier auch der Anteil immigrierter Immunzellen sehr hoch ist und eine Interpretation entsprechend erschwert ist.

Bezüglich der Forschung an *Tb ssp.* könnten weitere Ergebnisse mittels *in vivo* Imaging, Flow Cytometry und PCR weitere Informationen über ZNS-Invasion inklusive Überwinden der ZNS-Barrieren, Proliferation der MG, morphologische Veränderungen der MG, parasitäre Distribution während des ZNS-Befalls und letztendlich auch zur HAT-Diagnostik und -Therapie beitragen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J. *et al.* (2010) 'Structure und function of the blood-brain barrier', *Neurobiology of Disease*, 37(1), pp. 13–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
- Abbott, N.J., Rönnebeck, L. und Hansson, E. (2006) 'Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier', *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), pp. 41–53. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrn1824>.
- Abolarin, M. O, Stamford, S.A. und Ormerod, W.E. (1986) 'Interaction between Trypanosoma brucei und the ependymal cell of the choroid plexus', *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 80(4), pp. 618–625. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90160-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90160-4).
- Adeeb, N. *et al.* (2013) 'The pia mater: A comprehensive review of literature', *Child's Nervous System*, 29(10), pp. 1803–1810. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00381-013-2044-5>.
- Aebischer, A. *et al.* (2011) 'Trypanosomiasis, afrikanische Form (Schlafkrankheit)', in Robert-Koch-Institut (ed.) *Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten*. Berlin: Robert Koch-Institut, pp. 153–154. Available at: http://www.rki.de/cln_091/nn_196658/DE/Content/InfAZ/Steckbriefe/Steckbriefe__120606,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Steckbriefe__120606.pdf (Accessed: 2 March 2022).
- Ajami, B. *et al.* (2007) 'Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance und function throughout adult life', *Nature Neuroscience*, 10(12), pp. 1538–1543. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn2014>.
- Ajami, B. *et al.* (2011) 'Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool', *Nature Neuroscience*, 14(9), pp. 1142–1150. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2887>.
- Akanuma, S.-I. *et al.* (2020) 'Inflammation-Induced Attenuation of Prostaglandin D₂ Elimination across Rat Blood-Brain Barrier: Involvement of the Downregulation of Organic Anion Transporter 3 und Multidrug Resistance-Associated Protein 4', *Biol. Pharm. Bull.*, 43(11), pp. 1669–1677. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00388>.
- Alboni, S. *et al.* (2017) 'Fluoxetine effects on molecular, cellular und behavioral endophenotypes of depression are driven by the living environment', *Molecular Psychiatry*, 22(4), pp. 552–561. Available at: <https://doi.org/10.1038/mp.2015.142>.
- Alcolado, R. *et al.* (1988) 'The Cranial Arachnoid und Pia Mater in Man: Anatomical und Ultrastructural Observations', *Neuropathology und Applied Neurobiology*, 14, pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1988.tb00862.x>.

- Almolda, B., González, B. und Castellano, B. (2013) 'Microglia detection by enzymatic histochemistry', in J. Bertrand und J.L. Venero (eds) *Microglia - Methods and Protocols - Methods in Molecular Biology*. 1041st edn. New York: Springer, pp. 243–259. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0_22.
- Althammer, F. *et al.* (2020) 'Three-dimensional morphometric analysis reveals time-dependent structural changes in microglia und astrocytes in the central amygdala und hypothalamic paraventricular nucleus of heart failure rats', *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01892-4>.
- Alves De Lima, K., Rustenhoven, J. und Kipnis, J. (2020) 'Meningeal Immunity und Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health und Disease', *Annual Review of Immunology*, 38, pp. 597–620. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102319-103410>.
- Amin, D.N. *et al.* (2010) 'Identification of stage biomarkers for human African trypanosomiasis', *American Journal of Tropical Medicine und Hygiene*, 82(6), pp. 983–990. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0770>.
- Amin, D.N. *et al.* (2012) 'Distinct toll-like receptor signals regulate cerebral parasite load und interferon α/β und tumor necrosis factor α -dependent T-cell infiltration in the brains of trypanosoma brucei-infected mice', *Journal of Infectious Diseases*, 205(2), pp. 320–332. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/infdis/jir734>.
- Anton, S. und Leeuwenburgh, C. (2013) 'Fasting or caloric restriction for healthy aging', *Experimental Gerontology*, 48(10), pp. 1003–1005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.04.011>.
- Askew, K. *et al.* (2017) 'Coupled Proliferation und Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain', *Cell Reports*, 18(2), pp. 391–405. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041>.
- Aumüller, G. *et al.* (2014) 'Nervengewebe', in A. Bob und K. Bob (eds) *Duale Reihe - Anatomie*. 3rd edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, pp. 91–98.
- Aumüller, G. *et al.* (2017) 'ZNS - Aufbau und Organisation', in A. Bob und K. Bob (eds) *Duale Reihe - Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, pp. 1097–1264.
- Baalman, K. *et al.* (2015) 'Axon initial segment–associated microglia', *Journal of Neuroscience*, 35(5), pp. 2283–2292. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3751-14.2015>.
- Bachstetter, A.D. *et al.* (2015) 'Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, und hippocampal sclerosis of aging', *Acta Neuropathologica Communications*, 3(32), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0209-z>.
- Bachstetter, A.D. *et al.* (2017) 'Rod-shaped microglia morphology is associated with aging in 2 human autopsy series', *Neurobiology of Aging*, 52, pp. 98–105. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.028>.

- Bafort, J.M., Schmidt, H. und Molyneux, D.H. (1987) 'Development of *Trypanosoma brucei* in suckling following intracerebral injection mouse brain', *MEDICINE und HYGIENE*, 81(3), pp. 487–490. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90171-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90171-4).
- Barger, N. *et al.* (2019) 'Microglia: An Intrinsic Component of the Proliferative Zones in the Fetal Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Cerebral Cortex', *Cerebral Cortex*, 29(7), pp. 2782–2796. Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy145>.
- Barshes, N., Demopoulos, A. und Engelhard, H.H. (2005) 'Anatomy und physiology of the leptomeninges und CSF space', *Cancer Treat Res.*, 125, pp. 1–16. Available at: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/0-387-24199-x_1.
- Bennett, M.L. *et al.* (2016) 'New tools for studying microglia in the mouse und human CNS', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), pp. E1738–E1746. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>.
- Bentivoglio, M., Kristensson, K. und Rottenberg, M.E. (2018) 'Circumventricular Organs und Parasite Neurotropism: Neglected Gates to the Brain?', *Frontiers in immunology*, 9(2877), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02877>.
- Betz, A.L., Firth, J.A. und Goldstein, G.W. (1980) 'Polarity of the blood-brain barrier: Distribution of enzymes between the luminal und antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells', *Brain Research*, 192(1), pp. 17–28. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)91004-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)91004-5).
- Bisht, K., Sharma, K.P., Lecours, C., *et al.* (2016) 'Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states', *Glia*, 64(5), pp. 826–839. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.22966>.
- Bisht, K., Sharma, K.P., Lacoste, B., *et al.* (2016) 'Dark microglia: Why are they dark?', *Communicative und Integrative Biology*, 9(6), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/19420889.2016.1230575>.
- Boche, D., Perry, V.H. und Nicoll, J.A.R. (2013) 'Review: Activation patterns of microglia und their identification in the human brain', *Neuropathology und Applied Neurobiology*, 39, pp. 3–18. Available at: <https://doi.org/10.1111/nan.12011>.
- Bonnet, J., Boudot, C. und Courtioux, B. (2017) 'Does *Trypanosoma brucei brucei* have the Ability to Invade Human Microglial Cells?', *Arch Parasitol.*, 1(108), pp. 1–4. Available at: <https://www.omicsonline.org/peer-reviewed/does-emtrypanosoma-brucei-bruceiem-have-the-ability-to-invade-human-microglial-cellsp-90107.html> (Accessed: 1 June 2022).
- Bouvier, D.S. *et al.* (2016) 'High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease', *Nature Publishing Group*, 6(24544), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep24544>.
- Brawek, B. und Garaschuk, O. (2013) 'Microglial calcium signaling in the adult, aged und diseased brain', *Cell Calcium*, 53(3), pp. 159–169. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.12.003>.

- Brun, R. und Stich, A. (2010) 'Afrikanische Trypanosomiasis oder Schlafkrankheit', in T. Löscher und G.-D. Burchard (eds) *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 4., komple. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, pp. 617–619. Available at: <https://doi.org/https://10.1055/b-0034-35634>.
- Castro, J.A., de Mecca, M.M. und Bartel, L.C. (2006) 'Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis)', *Human und Experimental Toxicology*, 25(8), pp. 471–479. Available at: <https://doi.org/10.1191/0960327106het6530a>.
- CDC - Parasites - African Trypanosomiasis - Biology (2022). Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html> (Accessed: 18 May 2022).
- Chianella, S. *et al.* (1999) 'Microglia activation in a model of sleep disorder: An immunohistochemical study in the rat brain during *Trypanosoma brucei* infection', *Brain Research*, 832(1–2), pp. 54–62. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01449-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01449-3).
- Chimelli, L. (2011) 'A Morphological Approach to the Diagnosis of Protozoal Infections of the Central Nervous System', *Pathology Research International*, 2011(290853), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.4061/2011/290853>.
- Citi, S. (2019) 'The mechanobiology of tight junctions', *Biophysical Reviews*, 11(5), pp. 783–793. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00582-7>.
- Cloyd, M.W. und Low, F.N. (1974) 'Scanning electron microscopy of the subarachnoid space in the dog. I. Spinal cord levels', *Journal of Comparative Neurology*, 153(4), pp. 325–367. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.901530402>.
- Coles, J.A. *et al.* (2015) 'Intravital Imaging of a Massive Lymphocyte Response in the Cortical Dura of Mice after Peripheral Infection by Trypanosomes', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(4). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003714>.
- Collado, M., Blasco, M.A. und Serrano, M. (2007) 'Cellular Senescence in Cancer und Aging', *Cell*, 130(2), pp. 223–233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>.
- Coura, J.R. und de Castro, S.L. (2002) 'A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(1), pp. 3–24. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000100001>.
- Cross, G.A.M. (1975) 'Identification, purification und properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*', *Parasitology*, 71(3), pp. 393–417. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S003118200004717X>.
- Cross, G.A.M., Wirtz, L.E. und Navarro, M. (1998) 'Regulation of 6sg expression site transcription und switching in *Trypanosoma brucei*', *Molecular und Biochemical Parasitology*, 91(1), pp. 77–91. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00186-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00186-2).

- Cunningham, C. (2013) 'Microglia und neurodegeneration: The role of systemic inflammation', *Glia*, 61(1), pp. 71–90. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.22350>.
- Dasgupta, K. und Jeong, J. (2019) 'Developmental biology of the meninges', *Genesis*, 57(5), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvg.23288>.
- Davalos, D. *et al.* (2005) 'ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo', *Nature Neuroscience*, 8(6), pp. 752–758. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1472>.
- Davies, D.S. *et al.* (2017) 'Microglia show altered morphology und reduced arborization in human brain during aging und Alzheimer's disease', *Brain Pathology*, 27(6), pp. 795–808. Available at: <https://doi.org/10.1111/bpa.12456>.
- Despommier, D.D., Gwadz, R.W. und Hotez, P.J. (1995) 'African Trypanosomes: Trypanosoma brucei gambiense (Dutton 1902) und Trypanosoma brucei rhodesiense (Stephens und Fantham 1910)', in D.D. Despommier, R.W. Gwadz, und P.J. Hotez (eds) *Parasitic Diseases*. 3rd edn. New York, NY: Springer, pp. 196–303. Available at: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2476-1_31.
- Deuschl, G. *et al.* (2016) 'S3-Leitlinie Demenzen', in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Available at: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 24.01.2022) (Accessed: 20 May 2022).
- DGN (2016) 'S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom', in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, p. 312. Available at: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 24.01.2022) (Accessed: 20 May 2022).
- Dilger, R.N. und Johnson, R.W. (2008) 'Aging, microglial cell priming, und the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system', *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), pp. 932–939. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.0208108>.
- Duszenko, M. *et al.* (2006) 'Death of a trypanosome: a selfish altruism', *Trends in Parasitology*, 22(11), pp. 536–542. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.010>.
- Duvernoy, H.M. und Risold, P.Y. (2007) 'The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy und vascularization', *Brain Research Reviews*, 56(1), pp. 119–147. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres-rev.2007.06.002>.
- Elmqvist, J.K. *et al.* (1997) 'Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia und meningeal macrophages', *Journal of Comparative Neurology*, 381(2), pp. 119–129. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970505\)381:2%3C119::AID-CNE1%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970505)381:2%3C119::AID-CNE1%3E3.0.CO;2-6).
- Engelhardt, B., Vajkoczy, P. und Weller, R.O. (2017) 'The movers und shapers in immune privilege of the CNS', *Nature Immunology*, 18(2), pp. 123–131. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ni.3666>.

- Fachinformation zu Pentacarinat @ 300 mg* (2013). Sanofi.
- Fendrick, S.E., Xue, Q.S. und Streit, W.J. (2007) 'Formation of multinucleated giant cells und microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene', *Journal of Neuroinflammation*, 4(9), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-4-9>.
- Figarella, K. *et al.* (2005) 'Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form', *Cell Death and Differentiation*, 12(4), pp. 335–346. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401564>.
- Figarella, K. *et al.* (2006) 'Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress', *Cell Death and Differentiation*, 13(10), pp. 1802–1814. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401862>.
- Figarella, K. *et al.* (2018) 'Morphological changes, nitric oxide production, und phagocytosis are triggered in vitro in microglia by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33395-x>.
- Figarella, K. *et al.* (2020) 'Microglia in neuropathology caused by protozoan parasites', *Biological Reviews*, 95(2), pp. 333–349. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/brv.12566>.
- Fourrier, C. *et al.* (2017) 'Docosahexaenoic acid-containing choline phospholipid modulates LPS-induced neuroinflammation in vivo und in microglia in vitro', *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0939-x>.
- Franklin, K.B.J. und Paxinos, G. (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact: The Coronal Plates und Diagrams*. 3rd edn. Academic Press.
- Frevert, U. *et al.* (2012) 'Early Invasion of Brain Parenchyma by African Trypanosomes', *PLoS ONE*, 7(8), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043913>.
- Garaschuk, O. und Verkhratsky, A. (2019) 'Microglia: The Neural Cells of Nonneural Origin', in O. Garaschuk und A. Verkhratsky (eds) *Microglia: Methods und Protocols*. New York, NY: Springer New York, pp. 3–11. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_1.
- Ginhoux, F. *et al.* (2010) 'Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages', *Science*, 330(6005), pp. 841–845. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1194637>.
- Ginhoux, F. und Prinz, M. (2015) 'Origin of microglia: Current concepts und past controversies', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>.
- Girard, M. *et al.* (2000) 'In vitro induction of nitric oxide synthase in astrocytes und microglia by *Trypanosoma brucei brucei*', *Parasite Immunol.*, 22(1), pp. 7–12. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00264.x>.

- Gobert, A.P. *et al.* (2000) 'L-Arginine Availability Modulates Local Nitric Oxide Production und Parasite Killing in Experimental Trypanosomiasis', *Infect Immun*, 68(8), pp. 4653–4657. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/iai.68.8.4653-4657.2000>.
- Golbidi, S. *et al.* (2017) 'Health Benefits of Fasting und Caloric Restriction', *Current Diabetes Reports*, 17(12). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0951-7>.
- Goldmann, T. *et al.* (2013) 'A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation', *Nature Neuroscience*, 16(11), pp. 1618–1626. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3531>.
- Gorse, K.M. und Lafrenaye, A.D. (2018) 'The importance of inter-species variation in traumatic brain injury-induced alterations of microglial-axonal interactions', *Frontiers in Neurology*, 9(778), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00778>.
- Gouveia-Freitas, K. und Bastos-Leite, A.J. (2021) 'Perivascular spaces und brain waste clearance systems: relevance for neurodegenerative und cerebrovascular pathology', *Neuroradiology*, 63(10), pp. 1581–1597. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00234-021-02718-7>.
- Graeber, M.B. (2010) 'Changing face of microglia', *Science*, pp. 783–788. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1190929>.
- Griciuc, A. *et al.* (2013) 'Alzheimer's disease risk gene cd33 inhibits microglial uptake of amyloid beta', *Neuron*, 78(4), pp. 631–643. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.014>.
- Güçer, S. (2019) *Characterization of functional properties of microglia in mice infected with Trypanosoma brucei, a model of African trypanosomiasis*. Master of Science. Universität Bremen.
- Guerreiro, R. *et al.* (2013) 'TREM2 Variants in Alzheimer's Disease ', *New England Journal of Medicine*, 368(2), pp. 117–127. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1211851>.
- Hagemeyer, N. *et al.* (2017) 'Microglia contribute to normal myelinogenesis und to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood', *Acta Neuropathologica*, 134(3), pp. 441–458. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00401-017-1747-1>.
- Hamm, B. *et al.* (1990) 'Differentiation of Trypanosoma brucei bloodstream trypomastigotes from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture', *Molecular und Biochemical Parasitology*, 40(1), pp. 13–22. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90075-W](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90075-W).
- Hashimoto, D. *et al.* (2013) 'Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes', *Immunity*, 38(4), pp. 792–804. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>.Tissue.

- Hayat, M.A. (2014) *Tumor Dormancy, Quiescence, and Senescence*. Edited by M.A. Hayat. Dordrecht: Springer Science#Business Media. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7726-2>.
- Hefendehl, J.K. *et al.* (2014) 'Homeostatic und injury-induced microglia behavior in the aging brain', *Aging Cell*, 13(1), pp. 60–69. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/accel.12149>.
- Heindl, S. *et al.* (2018) 'Automated morphological analysis of microglia after stroke', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00106>.
- Hellwig, S. *et al.* (2016) 'Altered microglia morphology und higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice', *Brain, Behavior, und Immunity*, 55, pp. 126–137. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.008>.
- Hemmer, B. (2021) 'S2-Leitlinie Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose , Neuromyelitis-optica- Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen', in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, pp. 1–301. Available at: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 24.01.2022) (Accessed: 20 May 2022).
- Hesse, F. *et al.* (1995) 'A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes in vitro', *Molecular und Biochemical Parasitology*, 70(1–2), pp. 157–166. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00027-x](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00027-x).
- Hinwood, M. *et al.* (2013) 'Chronic Stress Induced Remodeling of the Prefrontal Cortex: Structural Re-Organization of Microglia und the Inhibitory Effect of Minocycline', *Cerebral Cortex*, 23(8), pp. 1784–1797. Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs151>.
- Hogan, K.A. *et al.* (2004) 'The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway', *Development*, 131(7), pp. 1503–1513. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.01039>.
- Holloszy, J.O. und Fontana, L. (2007) 'Caloric restriction in humans', *Experimental Gerontology*, 42(8), pp. 709–712. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.03.009>.
- Hoogland, I.C.M. *et al.* (2015) 'Systemic inflammation und microglial activation: systematic review of animal experiments', *Journal of neuroinflammation*, 12, p. 114. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>.
- Hui, C.W. *et al.* (2018) 'Nonfunctional mutant Wrn protein leads to neurological deficits, neuronal stress, microglial alteration, und immune imbalance in a mouse model of Werner syndrome', *Brain, Behavior, und Immunity*, 73, pp. 450–469. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.007>.
- Hutchings, M. und Roy Weller, An.O. (1986) 'Anatomical relationships of the pia mater to cerebral blood vessels in man', *J Neurosurg*, 65(3), pp. 316–325. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.3171/jns.1986.65.3.0316>.

- van Itallie, C.M. und Anderson, J.M. (2006) 'Claudins und epithelial paracellular transport', *Annual Review of Physiology*, 68, pp. 403–429. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>.
- Jennings, F.W. *et al.* (1979) 'The brain as a source of relapsing *Trypanosoma brucei* infection in mice after chemotherapy', *Int J Parasitol*, 9(4), pp. 381–384. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-7519\(79\)90089-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-7519(79)90089-4).
- Jiang, Z.H. *et al.* (2017) 'Upregulation und biological function of transmembrane protein 119 in osteosarcoma', *Experimental und Molecular Medicine*, 49(5), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/emm.2017.41>.
- Jinno, S. *et al.* (2007) 'Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: A stereological study in comparison with astrocytes', *Glia*, 55(13), pp. 1334–1347. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.20552>.
- Johnson, E.A. *et al.* (2011) 'Increased expression of the chemokines CXCL1 und MIP-1 α by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats', *Journal of Neuroinflammation*, 8(41), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-41>.
- Jonsson, T. *et al.* (2013) 'Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease', *New England Journal of Medicine*, 368(2), pp. 107–116. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1211103>.
- Jørgensen, M. *et al.* (1993) 'microglial und astroglial reactions to ischemic und kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus', *Experimental Neurology*, 120(1), pp. 70–88. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1041>.
- Kaur, C. und Ling, E.A. (2017) 'The circumventricular organs', *Histology und Histopathology*, 32(9), pp. 879–892. Available at: <https://doi.org/10.14670/HH-11-881>.
- Kayalioglu, G. (2009) 'The Vertebral Column und Spinal Meninges', in C. Watson, G. Paxinos, und G. Kayalioglu (eds) *The Spinal Cord*. Elsevier Ltd, pp. 17–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50007-9>.
- Kennedy, P.G.E. (2013) 'Clinical features, diagnosis, und treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)', *The Lancet Neurology*, 12(2), pp. 186–194. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70296-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70296-X).
- Keren-Shaul, H. *et al.* (2017) 'A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease', *Cell*, 169(7), pp. 1276–1290. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>.
- Kettenmann, H. *et al.* (2011) 'Physiology of microglia', in *Physiological Reviews*. 2nd edn. American Physiological Society, pp. 461–553. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F. und Verkhratsky, A. (2013) 'Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper', *Neuron*, 77(1), pp. 10–18. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>.

- Kierdorf, K. *et al.* (2013) 'Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways', *Nature Neuroscience*, 16(3), pp. 273–280. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3318>.
- Kleiner, D.E. und Stetler-Stevenson, W.G. (1999) 'Matrix metalloproteinases und metastasis', *Cancer Chemother Pharmacol.*, 43, pp. 42–51. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002800051097>.
- Korf, H.-W. und Schiebler, T.H. (2007) 'Zentralnervensystem', in T.H. Korf, Horst-Werner; Schiebler (ed.) *Anatomie - Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10th edn. Steinkopff Verlag, pp. 720–854.
- Kreutzberg, G.W. (1996) 'Microglia: A sensor for pathological events in the CNS', *Trends in Neurosciences*, 19(8), pp. 312–318. Available at: [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7).
- Kristensson, K. *et al.* (2010) 'African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry und effects on sleep und synaptic functions', *Progress in Neurobiology*, 91(2), pp. 152–171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.001>.
- Kubata, B.K. *et al.* (2000) 'Identification of a Novel Prostaglandin F₂ Synthase in *Trypanosoma brucei*', *J. Exp. Med.*, 192(9), pp. 1327–1338. Available at: <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1084%2Fjem.192.9.1327>.
- Lalancette-Hébert, M. *et al.* (2007) 'Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain', *Journal of Neuroscience*, 27(10), pp. 2596–2605. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5360-06.2007>.
- Lambertsen, K.L. *et al.* (2011) 'Differences in Origin of Reactive Microglia in Bone Marrow Chimeric Mouse und Rat After Transient Global Ischemia', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 70(6), pp. 481–494. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31821db3aa>.
- Laperchia, C. *et al.* (2017) 'Expression of interferon-inducible chemokines und sleep/wake changes during early encephalitis in experimental African trypanosomiasis', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005854>.
- Lawson, L.J. *et al.* (1990) 'Heterogeneity in the distribution und morphology of microglia in the normal adult mouse brain', *Neuroscience*, 39(1), pp. 151–170. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W).
- Lee, J., Seroogy, K.B. und Mattson, M.P. (2002) 'Dietary restriction enhances neurotrophin expression und neurogenesis in the hippocampus of adult mice', *Journal of Neurochemistry*, 80(3), pp. 539–547. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00747.x>.
- M O Abolarin *et al.* (1982) 'Cryptic stage of sleeping-sickness trypanosome developing in choroid plexus epithelial cells', *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 285(6352), pp. 1380–1382. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1136%2Fbmj.285.6352.1380>.

- Malik, M. *et al.* (2013) 'CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, und exon 2 splicing', *Journal of Neuroscience*, 33(33), pp. 13320–13325. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1224-13.2013>.
- Maloba, F.C., Ngotho, M. und Rajesh, K. (2012) 'Glial cells response during human african trypanosomiasis infection', *Sci Parasitol*, 13(4), pp. 145–152.
- Masocha, W. *et al.* (2004) 'Cerebral vessel laminins und IFN- γ define *Trypanosoma brucei brucei* penetration of the blood-brain barrier', *Journal of Clinical Investigation*, 114(5), pp. 689–694. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1172/jci22104>.
- Mattson, M.P. *et al.* (2018) 'Intermittent metabolic switching, neuroplasticity und brain health', *Nature Reviews Neuroscience*, 19(2), pp. 81–94. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.156>.
- Mattson, M.P., Longo, V.D. und Harvie, M. (2017) 'Impact of intermittent fasting on health und disease processes', *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 46–58. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.005>.
- Mattson, M.P. und Wan, R. (2005) 'Beneficial effects of intermittent fasting und caloric restriction on the cardiovascular und cerebrovascular systems', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(3), pp. 129–137. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.12.007>.
- Maxan, A. *et al.* (2018) 'Outcome of Cell Suspension Allografts in a Patient With Huntington's Disease', 84(6), pp. 950–956. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.25354>.
- Mogk, S. (2014) *Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection von Trypanosoma brucei und Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem*. Eberhard Karls Universität Tübingen. Available at: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15496/publikation-411>.
- Mogk, S., Meiwes, A., Shtopel, S., *et al.* (2014) 'Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: New insights in how trypanosomes enter the CNS', *PLoS ONE*, 9(3), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091372>.
- Mogk, S., Meiwes, A., Boßelmann, C.M., *et al.* (2014) 'The lane to the brain: How African trypanosomes invade the CNS', *Trends in Parasitology*, 30(10), pp. 470–477. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.002>.
- Mogk, S. *et al.* (2017) 'African trypanosomes und brain infection – the unsolved question', *Biological Reviews*, 92(3), pp. 1675–1687. Available at: <https://doi.org/10.1111/BRV.12301>.
- Mosser, C.A. *et al.* (2017) 'Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future', *Progress in Neurobiology*, 149–150, pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.002>.
- Mrdjen, D. *et al.* (2018) 'High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, und

- Disease', *Immunity*, 48(2), pp. 380-395.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.011>.
- Nicolas, A.S., Lanzmann-Petithory, D. und Vellas, B. (1999) 'Caloric restriction und aging', *Journal of Nutrition, Health und Aging*, 3(2), pp. 77–83. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(14\)70309-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(14)70309-5).
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. und Helmchen, F. (2005) 'Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo', *Science*, 308, pp. 1314–1318. Available at: <https://doi.org/10.1515/nf-2005-0304>.
- Noell, S. *et al.* (2011) 'Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet', *European Journal of Neuroscience*, 33(12), pp. 2179–2186. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07688.x>.
- Norden, D.M. *et al.* (2016) 'Sequential activation of microglia und astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge', *GLIA*, 64(2), pp. 300–316. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.22930>.
- Norden, D.M. und Godbout, J.P. (2013) 'Review: Microglia of the aged brain: Primed to be activated und resistant to regulation', *Neuropathology und Applied Neurobiology*, 39(1), pp. 19–34. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x>.
- Ohsawa, K. *et al.* (2004) 'Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin und enhances its actin-bundling activity', *Journal of Neurochemistry*, 88(4), pp. 844–856. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>.
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E. und Brown, W.J. (1977) 'The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain und other tissues of the rat', *Annals of Neurology*, 1(5), pp. 409–417. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ana.410010502>.
- Ormerod, W.E. und Venkatesan, S. (1971) 'An amastigote phase of the sleeping sickness trypanosome', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine und Hygiene*, 65(6), pp. 736–738. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203\(71\)90088-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203(71)90088-5).
- Overath, P. und Engstler, M. (2004) 'Endocytosis, membrane recycling und sorting of GPI-anchored proteins: Trypanosoma brucei as a model system', *Molecular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 735–744. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04224.x>.
- Owens, T., Bechmann, I. und Engelhardt, B. (2008) 'Perivascular Spaces und the Two Steps to Neuroinflammation', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(12), pp. 1113–1121. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818f9ca8>.
- Paolicelli, R.C. *et al.* (2022) 'Defining microglial states und nomenclature: a roadmap to 2030', *This preprint research paper has not been peer reviewed. Electronic copy available at: https://ssrn.com/abstract=4065080*, pp. 1–44. Available at: <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4065080>.

- Parakalan, R. *et al.* (2012) 'Transcriptome analysis of amoeboid und ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain', *BMC Neuroscience*, 13(64), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-64>.
- Pardridge, W.M. (1986) 'Blood-Brain Barrier Transport of Nutrients', *Nutrition Reviews*, 44(3), pp. 15–25. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1986.tb07674.x>.
- Patel, N. v. *et al.* (2005) 'Caloric restriction attenuates A β -deposition in Alzheimer transgenic models', *Neurobiology of Aging*, 26(7), pp. 995–1000. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.014>.
- Paxinos, G. und Franklin, K.B.J. (2007) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd edn. Academic Press.
- Pentreath, V.W. *et al.* (1990) 'The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients', *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 84(6), pp. 795–799. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90085-s](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90085-s).
- Perez-Pouchoulen, M., Vanryzin, J.W. und McCarthy, M.M. (2015) 'Morphological und Phagocytic Profile of Microglia in the Developing Rat Cerebellum 1,2,3', *eNeuro*, 2(4), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0036-15.2015>.
- Perry, V.H. und Holmes, C. (2014) 'Microglial priming in neurodegenerative disease', *Nature Reviews Neurology*, 10(4), pp. 217–224. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>.
- Pocock, J.M. und Kettenmann, H. (2007) 'Neurotransmitter receptors on microglia', *Trends in Neurosciences*, pp. 527–535. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.07.007>.
- Quintana, J.F. *et al.* (2022) 'Single cell und spatial transcriptomic analyses reveal microglia-plasma cell crosstalk in the brain during *Trypanosoma brucei* infection', *Nature Communications*, 13(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33542-z>.
- Rabinowitz, S.S. und Gordon, S. (1991) 'Macrosialin, a Macrophage-restricted Membrane Sialoprotein Differentially Glycosylated in Response to Inflammatory Stimuli', *Journal of Experimental Medicine*, 174(4), pp. 827–836. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1084/jem.174.4.827>.
- Raj, D.D.A. *et al.* (2014) 'Priming of microglia in a DNA-repair deficient model of accelerated aging', *Neurobiology of Aging*, 35(9), pp. 2147–2160. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.025>.
- Ramos, P.K.S. *et al.* (2014) 'In vitro cytokines profile und ultrastructural changes of microglia und macrophages following interaction with *Leishmania*', *Parasitology*, 141(8), pp. 1052–1063. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/s0031182014000274>.

- Reemst, K. *et al.* (2016) 'The indispensable roles of microglia und astrocytes during brain development', *Frontiers in Human Neuroscience*, 10(566), pp. 1–28. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>.
- Reuner, B. *et al.* (1997) 'Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture', *Molecular und Biochemical Parasitology*, 90(1), pp. 269–280. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00160-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00160-6).
- del Rio-Hortega, P. (1932) 'Microglia', in W. Penfield (ed.) *Cytology und cellular pathology of the nervous system*. New York: Hoeber, pp. 482–534.
- Rodgers, J. *et al.* (2015) 'Central Nervous System Parasitosis und Neuroinflammation Ameliorated by Systemic IL-10 Administration in *Trypanosoma brucei*-Infected Mice', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004201>.
- Ross, R. und Thomson, D. (1910) 'A case of sleeping sickness studied by precise enumerative methods: Regular periodical increase of the parasites disclosed', *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 82(557), pp. 411–415. Available at: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.1910.0035> (Accessed: 8 February 2023).
- Safaiyan, S. *et al.* (2016) 'Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging', *Nature Neuroscience*, 19(8), pp. 995–998. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.4325>.
- Satoh, J. ichi *et al.* (2016) 'TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain', *Neuropathology*, 36(1), pp. 39–49. Available at: <https://doi.org/10.1111/neup.12235>.
- Satoh, J.I. *et al.* (2019) 'Microglia express TMEM119 in the brains of Nasu-Hakola disease', *Intractable und Rare Diseases Research*, 8(4), pp. 260–265. Available at: <https://doi.org/10.5582/irdr.2019.01123>.
- Savage, J.C. *et al.* (2018) 'A brief history of microglial ultrastructure: Distinctive features, phenotypes, und functions discovered over the past 60 years by electron microscopy', *Frontiers in Immunology*, 9(803), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00803>.
- Savage, J.C., Carrier, M. und Tremblay, M.-È. (2019) 'Morphology of Microglia Across Contexts of Health und Disease', in O. Garaschuk und A. Verkhratsky (eds) *Microglia: Methods und Protocols*. New York, NY: Springer New York, pp. 13–26. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_2.
- Schlüter, D. (2019) 'Flagellaten', in H. Hof, D. Schlüter, und R. Dörries (eds) *Medizinische Mikrobiologie*. 7., vollst. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, pp. 538–541. Available at: <https://doi.org/10.1055/b-006-163249>.
- Schmidt, H. (1983) 'The pathogenesis of trypanosomiasis of the CNS. Studies on parasitological und neurohistological findings in *trypanosoma rhodesiense* infected vervet monkeys', *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*, 399(3), pp. 333–343. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/bf00612951>.

- Schultzberg, M. *et al.* (1988) 'Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: Early attack on circumventricular organs und sensory ganglia', *Journal of Neuroscience Research*, 21(1), pp. 56–61. Available at: <https://doi.org/10.1002/jnr.490210109>.
- Schünke, M., Schulte, E. und Schumacher, U. (2022) 'Neuroanatomie', in M. Schünke *et al.* (eds) *Prometheus - Kopf, Hals und Neuroanatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, pp. 265–499. Available at: <https://doi.org/10.1055/b000000615>.
- Serlin, Y. *et al.* (2015) 'Anatomy und physiology of the blood-brain barrier', *Seminars in Cell und Developmental Biology*, 38, pp. 2–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.01.002>.
- Sharif, Y. *et al.* (2018) 'Blood brain barrier: A review of its anatomy und physiology in health und disease', *Clinical Anatomy*, 31(6), pp. 812–823. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ca.23083>.
- Shobin, E. *et al.* (2017) 'Microglia activation und phagocytosis: relationship with aging und cognitive impairment in the rhesus monkey', 39(2), pp. 199–220. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9965-y>.
- Speidel, A. (2020) *Investigation of different trypanosome strains regarding their ability to infect the brain und analysis of the immune cell response in the brain during African trypanosomiasis*. Universität Tübingen.
- Speidel, A. *et al.* (2022) 'Transmigration of *Trypanosoma brucei* across an in vitro blood-cerebrospinal fluid barrier', *iScience*, 25(4), pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104014>.
- Steinmann, U. *et al.* (2013) 'Transmigration of polymorphnuclear neutrophils und monocytes through the human blood-cerebrospinal fluid barrier after bacterial infection in vitro', *Journal of Neuroinflammation*, 10(31), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-31>.
- Stollg, G. und Jander, S. (1999) 'The role of microglia und macrophages in the pathophysiology of the CNS', *Progress in Neurobiology*, 58(3), pp. 233–247. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00083-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00083-5).
- Stoppini, L. *et al.* (2000) 'Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei brucei*', *Int. J. Med. Microbial*, 290(1), pp. 105–113. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s1438-4221\(00\)80113-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s1438-4221(00)80113-7).
- Streit, W.J. *et al.* (2005) 'Role of microglia in the central nervous system's immune response', *Neurological Research*, 27(7), pp. 685–691. Available at: <https://doi.org/10.1179/016164105x49463a>.
- Streit, W.J. *et al.* (2009) 'Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology und likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 118(4), pp. 475–485. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0556-6>.

- Streit, W.J. *et al.* (2014) 'Microglial pathology', *Acta Neuropathol Commun.*, 2(142), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40478-014-0142-6>.
- Streit, W.J. und Sparks, D.L. (1997) 'Activation of microglia in the brains of humans with heart disease und hypercholesterolemic rabbits', *Journal of Molecular Medicine*, 75, pp. 130–138. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s001090050097>.
- Sun, T. *et al.* (2021) 'TMEM119 facilitates ovarian cancer cell proliferation, invasion, und migration via the PDGFRB/PI3K/AKT signaling pathway', *Journal of Translational Medicine*, 19(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02781-x>.
- Tam, W.Y. und Ma, C.H.E. (2014) 'Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes', *Scientific Reports*, 4(7279), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep07279>.
- Tay, T.L. *et al.* (2017) 'Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity und cognition', *Journal of Physiology*, 595(6), pp. 1929–1945. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP272134>.
- Taylor, S.E. *et al.* (2014) 'Rod Microglia: A Morphological Definition', *PLoS ONE*, 9(5), p. e97096. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097096>.
- Thériault, P. und Rivest, S. (2016) 'Microglia: Senescence Impairs Clearance of Myelin Debris', *Current Biology*. Cell Press, pp. R772–R775. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.066>.
- Tischer, J. *et al.* (2016) 'Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease', *GLIA*, 64(9), pp. 1562–1572. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.23024>.
- Tremblay, M.È. *et al.* (2012) 'Effects of aging und sensory loss on glial cells in mouse visual und auditory cortices', *GLIA*, 60(4), pp. 541–558. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.22287>.
- Tremblay, M.È. *et al.* (2013) 'Ultrastructure of microglia-synapse interactions in the HIV-1 Tat-injected murine central nervous system', *Communicative und Integrative Biology*, 6(6), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.4161/cib.27670>.
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L. und Majewska, A.K. (2010) 'Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience', *PLoS Biology*, 8(11), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>.
- Trepanowski, J.F. *et al.* (2011) 'Impact of caloric und dietary restriction regimens on markers of health und longevity in humans und animals: A summary of available findings', *Nutrition Journal*, 10(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-107>.
- Trepel, M. (2022) *Neuroanatomie, Neuroanatomie - Struktur und Funktion*. Edited by M. Trepel. München: Elsevier GmbH, Deutschland.
- Ufnal, M. und Skrzypecki, J. (2014) 'Blood borne hormones in a cross-talk between peripheral und brain mechanisms regulating blood pressure, the role of

- circumventricular organs', *Neuropeptides*, 48(2), pp. 65–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2014.01.003>.
- Uzcategui, N.L. *et al.* (2023) 'Live imaging of microglia during sleeping sickness reveals early and heterogeneous inflammatory responses', *Frontiers in Immunology*, 14, pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1253648>.
- Vankriekelsvenne, E. *et al.* (2022) 'Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia', *GLIA*, 70(6), pp. 1170–1190. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.24164>.
- Vinet, J. *et al.* (2012) 'Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity', *Journal of Neuroinflammation*, 9, pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-27>.
- Voet, S., Prinz, M. und van Loo, G. (2019) 'Microglia in Central Nervous System Inflammation und Multiple Sclerosis Pathology', *Trends in Molecular Medicine*, 25(2), pp. 112–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.005>.
- Wai Hui, C. *et al.* (2018) 'Prenatal immune challenge in mice leads to partly sex-dependent behavioral, microglial, und molecular abnormalities associated with schizophrenia', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(13), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00013>.
- Walker, D.G. und Lue, L.F. (2015) 'Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: Challenges to detecting microglial polarization in human brains', *Alzheimer's Research and Therapy*, 7(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0139-9>.
- WHO Expert Committee on the Control und Surveillance of Human African Trypanosomiasis (2013) *Control und surveillance of human African trypanosomiasis: report of a WHO Expert Committee*. Genf. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95732/9789241209847_eng.pdf (Accessed: 28 December 2022).
- Wirenfeldt, M. *et al.* (2009) 'Increased activation of Iba1+ microglia in pediatric epilepsy patients with Rasmussen's encephalitis compared with cortical dysplasia und tuberous sclerosis complex', *Neurobiology of Disease*, 34(3), pp. 432–440. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.02.015>.
- Witte, A. v. *et al.* (2009) 'Caloric restriction improves memory in elderly humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), pp. 1255–1260. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0808587106>.
- Wogram, E. *et al.* (2016) 'Satellite microglia show spontaneous electrical activity that is uncorrelated with activity of the attached neuron', *European Journal of Neuroscience*, 43(11), pp. 1523–1534. Available at: <https://doi.org/10.1111/ejn.13256>.
- Wolburg, H. *et al.* (2012) 'Late Stage Infection in Sleeping Sickness', *PLoS ONE*, 7(3), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034304>.

- Wong, A.D. *et al.* (2013) 'The blood-brain barrier: An engineering perspective', *Frontiers in Neuroengineering*, 6(JUL), pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>.
- World Health Organization (2019) *WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human african trypanosomiasis*. Genf. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326178/9789241550567-eng.pdf> (Accessed: 24 June 2022).
- World Health Organization (2021) *Report of the fourth WHO stakeholders meeting on gambiense und rhodesiense human African trypanosomiasis elimination*. Genf. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045040> (Accessed: 24 June 2022).
- Wu, C. *et al.* (2009) 'Endothelial basement membrane laminin $\alpha 5$ selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain', *Nature Medicine*, 15(5), pp. 519–527. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.1957>.
- Xue, Q.S. *et al.* (2010) 'Microglial response to murine leukemia virus-induced encephalopathy is a good indicator of neuronal perturbations', *Brain Research*, 1319, pp. 131–141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.089>.
- Yang, B., Wang, F. und Zheng, G. (2021) 'Transmembrane protein TMEM119 facilitates the stemness of breast cancer cells by activating Wnt/ β -catenin pathway', *Bioengineered*, 12(1), pp. 4856–4867. Available at: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1960464>.
- Yona, S. *et al.* (2013) 'Fate mapping reveals origins und dynamics of monocytes und tissue macrophages under homeostasis', *Immunity*, 38(1), pp. 79–91. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>.
- Young, K.F. *et al.* (2021) 'Can quantifying morphology und TMEM119 expression distinguish between microglia und infiltrating macrophages after ischemic stroke und reperfusion in male und female mice?', *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02105-2>.
- Yuhas, D. (2012) 'How the brain cleans itself', *Nature*, 16 August. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature.2012.11216>.
- Zanier, E.R. *et al.* (2015) 'Shape descriptors of the "never resting" microglia in three different acute brain injury models in mice', *Intensive Care Medicine Experimental*, 3(7), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0039-0>.
- Zheng, P. *et al.* (2018) 'TMEM119 promotes gastric cancer cell migration und invasion through STAT3 signaling pathway', *OncoTargets und Therapy*, 11, pp. 5835–5844. Available at: <https://doi.org/10.2147/OTT.S164045>.
- Ziebell, J.M. *et al.* (2012) 'Rod microglia: Elongation, alignment, und coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury', *Journal of Neuroinflammation*, 9(247), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-247>.

Zlokovic, B. v. (2008) 'The Blood-Brain Barrier in Health und Chronic Neurodegenerative Disorders', *Neuron*, 57(2), pp. 178–201. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>.

7 Anhang

7.1 Tabellen

Anhangstabelle 1: Berechnete Zelldichte aus den Bildern der Kategorie B je Maus und Gehirnareal.....	140
Anhangstabelle 2: Berechnete Duplettdichte aus den Bildern der Kategorie B je Maus und Gehirnareal.....	141
Anhangstabelle 3: Anteil anti-TMEM119-Zellen 10dpi.....	142
Anhangstabelle 4: Anteil anti-TMEM119-Zellen 20dpi.....	143
Anhangstabelle 5: Anteil anti-TMEM119-Zellen 30dpi.....	144
Anhangstabelle 6: Anzahl der rekonstruierten SO nach Tier und Gruppe.....	145
Anhangstabelle 7: Anzahl der rekonstruierten FO nach Tier und Gruppe.....	145
Anhangsabbildung 1: QQ-Plot (exemplarisch)	146
Anhangsabbildung 2: distance to nearest neighbour nach Gruppe	147
Anhangsabbildung 3: distance to nearest neighbour 10dpi nach Maus	148
Anhangsabbildung 4: distance to nearest neighbour 20dpi nach Maus	149
Anhangsabbildung 5: distance to nearest neighbour 30dpi nach Maus	150
Anhangsabbildung 6: Zelldichte 10dpi nach Maus	151
Anhangsabbildung 7: Zelldichte 20dpi nach Maus	152
Anhangsabbildung 8: Duplettdichte 10dpi nach Maus.....	153
Anhangsabbildung 9: Duplettdichte 20dpi nach Maus.....	154

Anhangstabelle 1: Berechnete Zelldichte aus den Bildern der Kategorie B je Maus und Gehirnareal

Die Tabelle zeigt die berechneten Zelldichten aus den Bildern der Kategorie B nach Maus und Gehirnareal.

	ctrl				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
	10dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,84E-05	1,28E-05	9,61E-06	1,18E-05	1,17E-05
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,22E-05	1,17E-05	1,17E-05	1,38E-05	1,11E-05
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,14E-05	1,21E-05	9,88E-06	1,22E-05	1,25E-05
	20dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,17E-05	1,20E-05	1,04E-05	1,67E-05	1,11E-05
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu l}$]	8,45E-06	9,31E-06	1,27E-05	1,26E-05	6,43E-06
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu l}$]	9,52E-06	1,15E-05	1,10E-05	1,30E-05	7,32E-06
	30dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu l}$]	7,08E-06	7,59E-06	8,60E-06	7,83E-06	1,20E-05
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu l}$]	8,85E-06	9,63E-06	7,06E-06	6,12E-06	1,12E-05
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu l}$]	9,20E-06	7,75E-06	6,94E-06	6,75E-06	1,35E-05

	infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
	10dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,49E-05	1,47E-05	1,27E-05	1,43E-05	1,45E-05
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,19E-05	1,33E-05	1,39E-05	1,25E-05	1,06E-05
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,07E-05	1,38E-05	1,22E-05	1,75E-05	1,32E-05
	20dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,38E-05	1,67E-05	1,54E-05	1,44E-05	1,27E-05
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,28E-05	1,72E-05	1,70E-05	2,79E-05	1,87E-05
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,33E-05	1,62E-05	1,72E-05	1,49E-05	1,08E-05
	30dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu l}$]	1,86E-05	2,94E-05	2,46E-05	1,21E-05	2,38E-05
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu l}$]	3,49E-05	2,98E-05	3,20E-05	2,47E-05	3,99E-05
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu l}$]	3,46E-05	2,67E-05	4,02E-05	2,99E-05	3,33E-05

Anhangstabelle 2: Berechnete Duplettdichte aus den Bildern der Kategorie B je Maus und Gehirnareal

Die Tabelle zeigt die berechneten Duplettdichten aus den Bildern der Kategorie B nach Maus und Gehirnareal.

	ctrl				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
	10dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu t}$]	1,77E-06	2,07E-06	1,50E-06	1,09E-06	1,06E-06
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu t}$]	0	3,12E-07	1,23E-06	0	2,96E-07
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu t}$]	3,35E-07	3,24E-07	3,09E-07	3,40E-07	6,01E-07
	20dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu t}$]	0	6,57E-07	6,60E-07	1,08E-06	5,77E-07
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu t}$]	3,07E-07	3,27E-07	3,58E-07	6,84E-07	5,71E-07
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu t}$]	3,17E-07	0	1,03E-06	6,84E-07	8,61E-07
	30dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu t}$]	9,23E-07	0	0	0	0
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu t}$]	5,90E-07	6,22E-07	0	0	2,83E-07
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu t}$]	5,66E-07	0	3,15E-07	2,55E-07	1,13E-06

	infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
	10dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu t}$]	9,95E-07	2,35E-06	6,17E-07	2,00E-06	9,05E-07
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu t}$]	3,17E-07	1,60E-06	9,48E-07	2,56E-06	6,03E-07
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu t}$]	1,02E-06	0	9,90E-07	1,18E-06	6,20E-07
	20dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu t}$]	8,55E-07	1,19E-06	7,49E-07	3,13E-07	0
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu t}$]	6,38E-07	1,52E-06	1,05E-06	2,32E-06	3,11E-06
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu t}$]	1,05E-06	2,64E-06	1,43E-06	1,55E-06	0
	30dpi				
n/V(Kortex) [$\frac{1}{\mu t}$]	9,96E-07	2,67E-06	3,06E-06	3,19E-06	8,50E-07
n/V(LPA) [$\frac{1}{\mu t}$]	5,76E-06	2,26E-06	1,58E-06	1,81E-05	7,79E-06
n/V(PVR) [$\frac{1}{\mu t}$]	4,74E-06	3,01E-06	1,03E-05	2,19E-05	3,54E-06

Anhangstabelle 3: Anteil anti-TMEM119-Zellen 10dpi

Die Tabelle zeigt die Anzahl der markierten und gezählten Zellen in den Bilderstapeln der Kategorie A pro Maus nach 10dpi.

	Kortex									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	132	85	92	117	86	142	167	98	85	82
n(anti-TMEM119⁺)	132	85	92	117	86	142	166	98	85	82
n(anti-TMEM119⁻)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

	LPA									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	93	54	86	61	71	95	106	93	78	85
n(anti-TMEM119⁺)	93	54	86	61	71	95	106	93	78	85
n(anti-TMEM119⁻)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	PVR									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	124	85	72	85	62	104	101	84	64	76
n(anti-TMEM119⁺)	124	85	72	85	62	104	101	84	64	76
n(anti-TMEM119⁻)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhangstabelle 4: Anteil anti-TMEM119-Zellen 20dpi

Die Tabelle zeigt die Anzahl der markierten und gezählten Zellen in den Bilderstapeln der Kategorie A pro Maus nach 20dpi.

	Kortex									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	113	104	115	114	124	107	135	105	135	106
n(anti-TMEM119⁺)	113	104	115	114	124	107	135	105	135	106
n(anti-TMEM119⁻)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	LPA									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	111	63	50	65	88	77	72	135	193	73
n(anti-TMEM119⁺)	109	63	50	65	88	77	72	135	193	73
n(anti-TMEM119⁻)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	PVR									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	101	110	92	96	77	85	101	101	97	62
n(anti-TMEM119⁺)	101	110	92	96	77	85	99	101	97	62
n(anti-TMEM119⁻)	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0

Anhangstabelle 5: Anteil anti-TMEM119-Zellen 30dpi

Die Tabelle zeigt die Anzahl der markierten und gezählten Zellen in den Bilderstapeln der Kategorie A pro Maus nach 30dpi. Die Daten stammen aus einer Masterarbeit die in Kooperation zwischen Interfakultärem Institut für Biochemie und dem Institut für Neurophysiologie gewonnen wurden (vgl. Speidel, 2020). Entgegen der Verfahrensweise für 10dpi und 20dpi wurden hier drei statt 9 Aufnahmen pro Tier erstellt.

	Kortex									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	13	27	28	30	29	52	39	40	43	49
n(anti-TMEM119⁺)	13	27	28	30	29	25	21	27	29	28
n(anti-TMEM119⁻)	0	0	0	0	0	27	18	13	14	21

	LPA									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	26	20	32	26	17	50	55	74	69	68
n(anti-TMEM119⁺)	26	19	32	26	17	34	35	44	39	45
n(anti-TMEM119⁻)	0	1	0	0	0	16	20	30	30	23

	PVR									
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
n(anti-iba-1⁺)	20	19	26	20	27	50	40	83	68	57
n(anti-TMEM119⁺)	20	19	26	20	27	18	20	51	24	23
n(anti-TMEM119⁻)	0	0	0	0	0	32	20	32	44	34

Anhangstabelle 6: Anzahl der rekonstruierten SO nach Tier und Gruppe

Die Tabelle zeigt die pro Tier rekonstruierten SO.

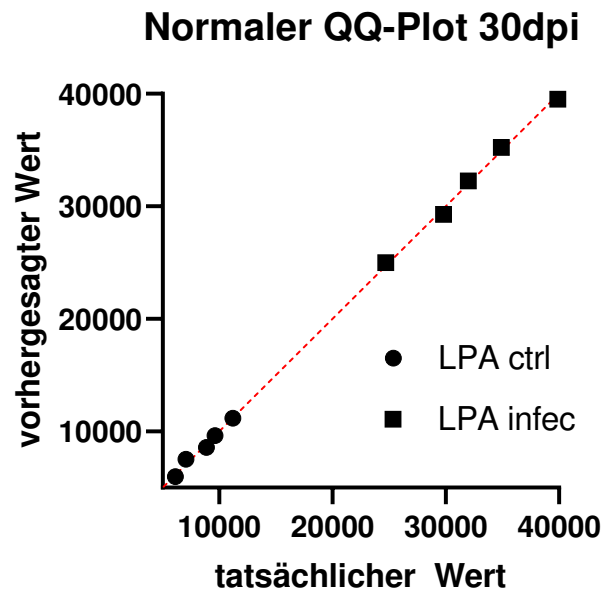
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
10dpi	14	15	13	18	19	16	15	27	29	25
20dpi	15	16	17	15	16	27	26	22	21	20
30dpi	21	25	19	25	16	21	18	28	15	16

Anhangstabelle 7: Anzahl der rekonstruierten FO nach Tier und Gruppe

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Anzahl der rekonstruierten FO nach Tier und Gruppe.

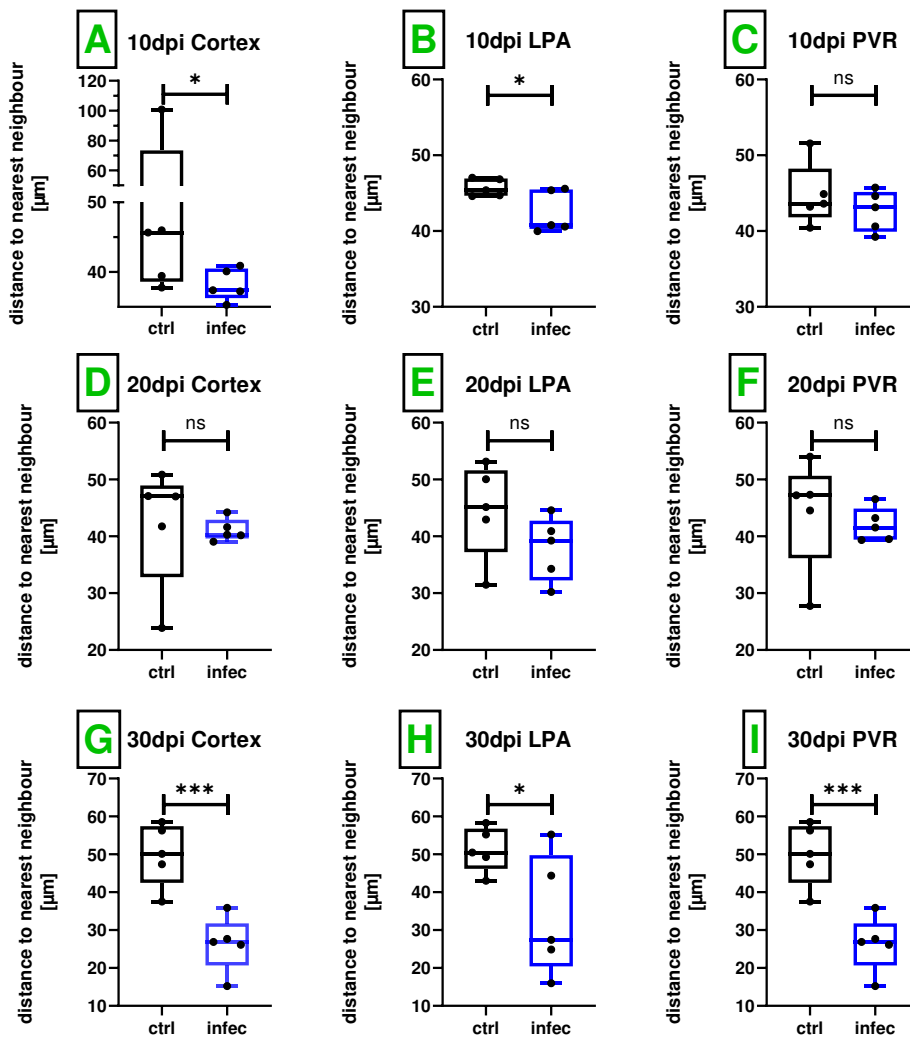
	ctrl					infec				
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
10dpi	16	16	12	14	16	16	16	16	15	14
20dpi	16	16	17	15	16	17	18	16	16	16
30dpi	17	17	16	17	16	16	17	17	13	15

7.2 Abbildungen



Anhangsabbildung 1: QQ-Plot (exemplarisch)

Hier ist stellvertretend ein QQ-Plot für den Test auf Normalverteilung für die Zelldichte in der LPA nach 30dpi gezeigt. Beim Test auf Normalverteilung kann von der Nähe der Messpunkte an der Eichgeraden auf die Wahrscheinlichkeit auf Vorliegen einer Normalverteilung geschlossen werden. Liegen die Punkte auf oder nah an der Geraden, ist eine Normalverteilung wahrscheinlicher(er).



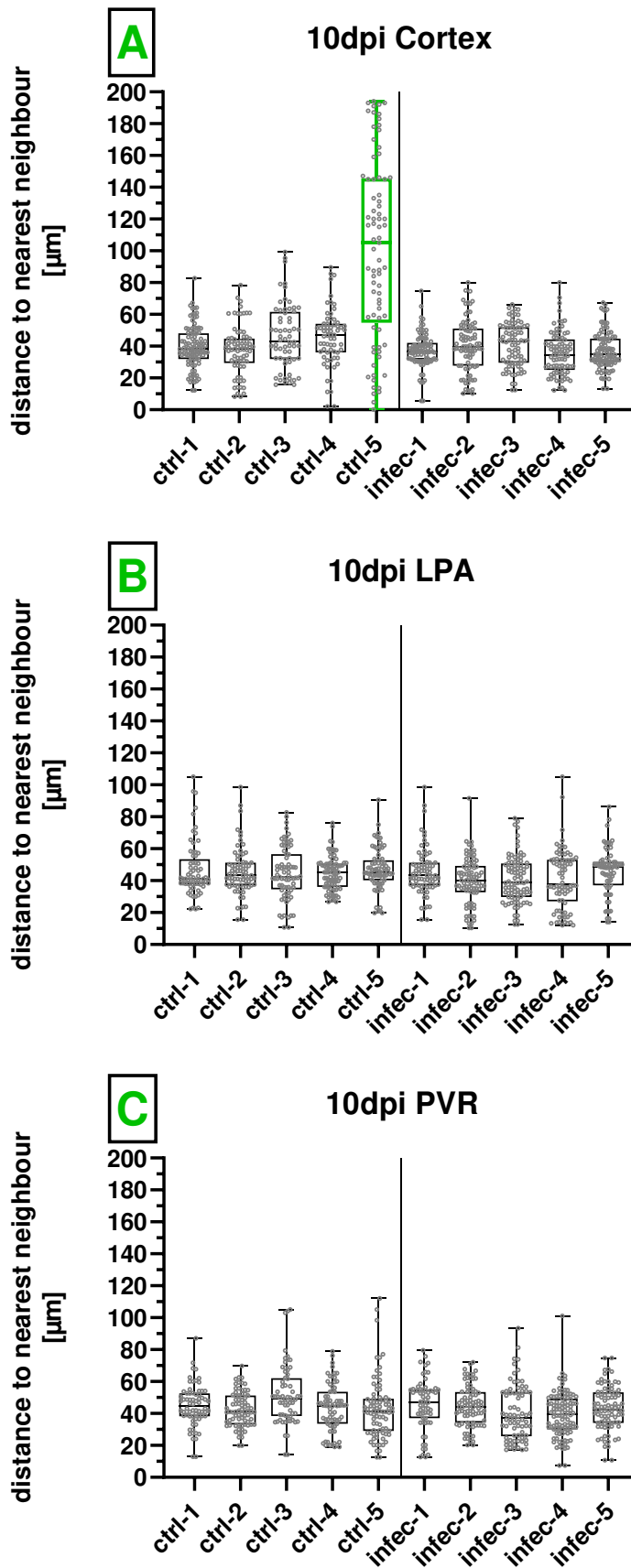
Anhangsabbildung 2: *distance to nearest neighbour* nach Gruppe

Die Abbildung zeigt den Zell-Zell-Abstand der anti-iba-1⁺-Zellen der Kontroll- (schwarz) und infizierten (blau) Gruppen nach 10dpi ([A], [B] und [C]), 20dpi ([D], [E] und [F]) und 30dpi ([G], [H] und [I]) in den untersuchten Hirnarealen als Box-Whisker-Plots. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Auf statistische Signifikanz wurde mittels unpaarem, one-tailed T-Test geprüft. In diese graphische Darstellung fließen außerdem (anders als bei der Zelldichte) keine Korrekturen hinsichtlich der untersuchten Dicken der Bilderstapel ein.

Der Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen nach 10dpi ist im PVR (C) nicht signifikant (ns); in der LPA ([B], $p = 0,0210$) und im Cortex ([C], $p = 0,0476$) sind die Unterschiede signifikant. Im Cortex fällt eine relativ weite Verteilung zwischen Minimum und Maximum auf. Nach 20dpi ist der Unterschied in keinem Areal signifikant (ns), obwohl die Mediane der Kontrollgruppen jeweils über 5µm oberhalb der Mediane der infizierten Gruppe liegen. Allerdings variiert die Verteilungsbreite der Kontrolltiere offenbar deutlich stärker.

Nach 30dpi ist der Unterschied zwischen den Gruppen in allen Arealen ([G], [H] und [I]) signifikant (Cortex: $p = 0,0007$; LPA: $p = 0,0238$; PVR: $p = 0,0007$). Allerdings beträgt der Anteil aus der Peripherie immigrierter Immunzellen je nach Areal zwischen 37% und 54%.

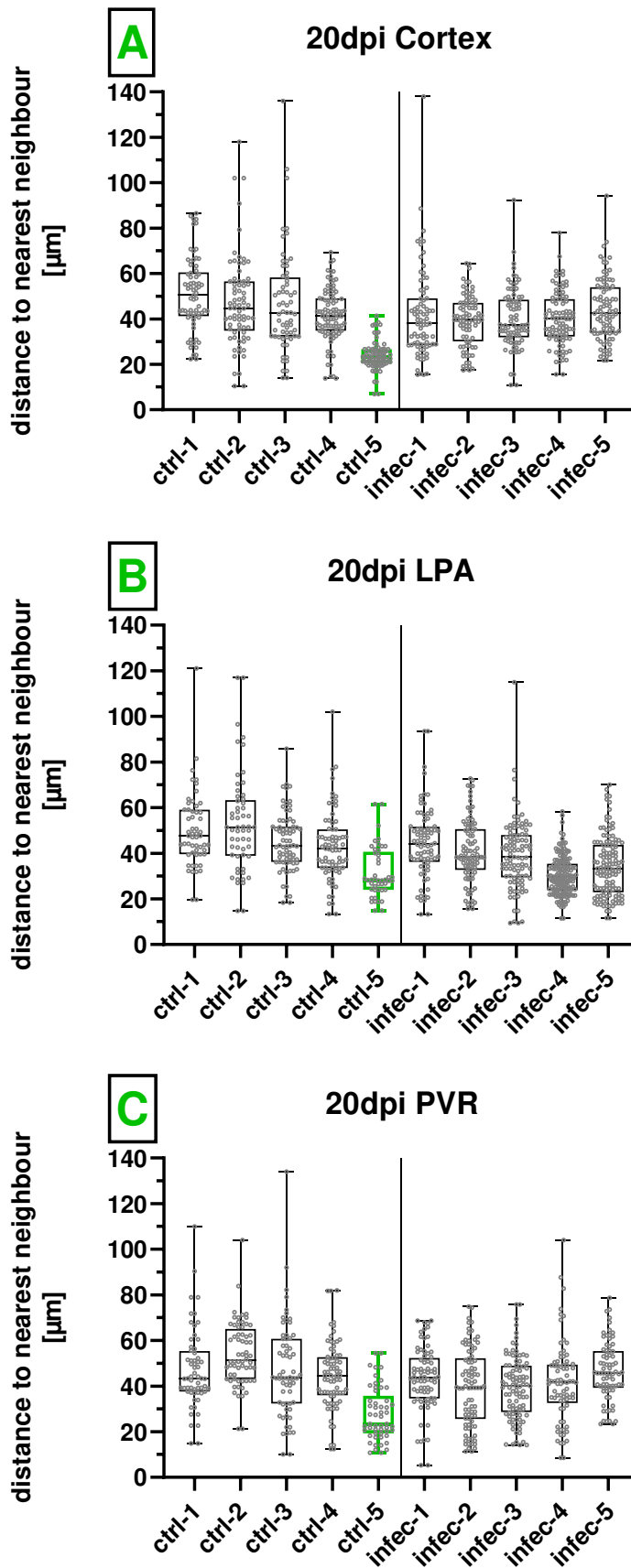
Man sollte die Verteilungen innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen bzw. der einzelnen Mäuse innerhalb der Untersuchungsgruppen genauer anschauen und nach interindividuellen Unterschieden innerhalb der Gruppen suchen.



Anhangsabbildung 3:
distance to nearest
neighbour 10dpi nach
Maus

In der Abbildung sind die Zell-Zell-Abstände der anti-iba-1⁺-Zellen der zehn 10dpi Mäuse im Cortex (A), in der LPA (B) und dem PVR (C) nach Maus als Box-Whisker-Plots nebeneinander aufgetragen, um interindividuelle Unterschiede innerhalb der Untersuchungsgruppen zu finden, wie in Anhangsabbildung 2 vorgeschlagen. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Auch in diese graphische Darstellung fließen außerdem (anders als bei der Zelldichte) keine Korrekturen hinsichtlich der untersuchten Dicken der Bilderstapel ein.

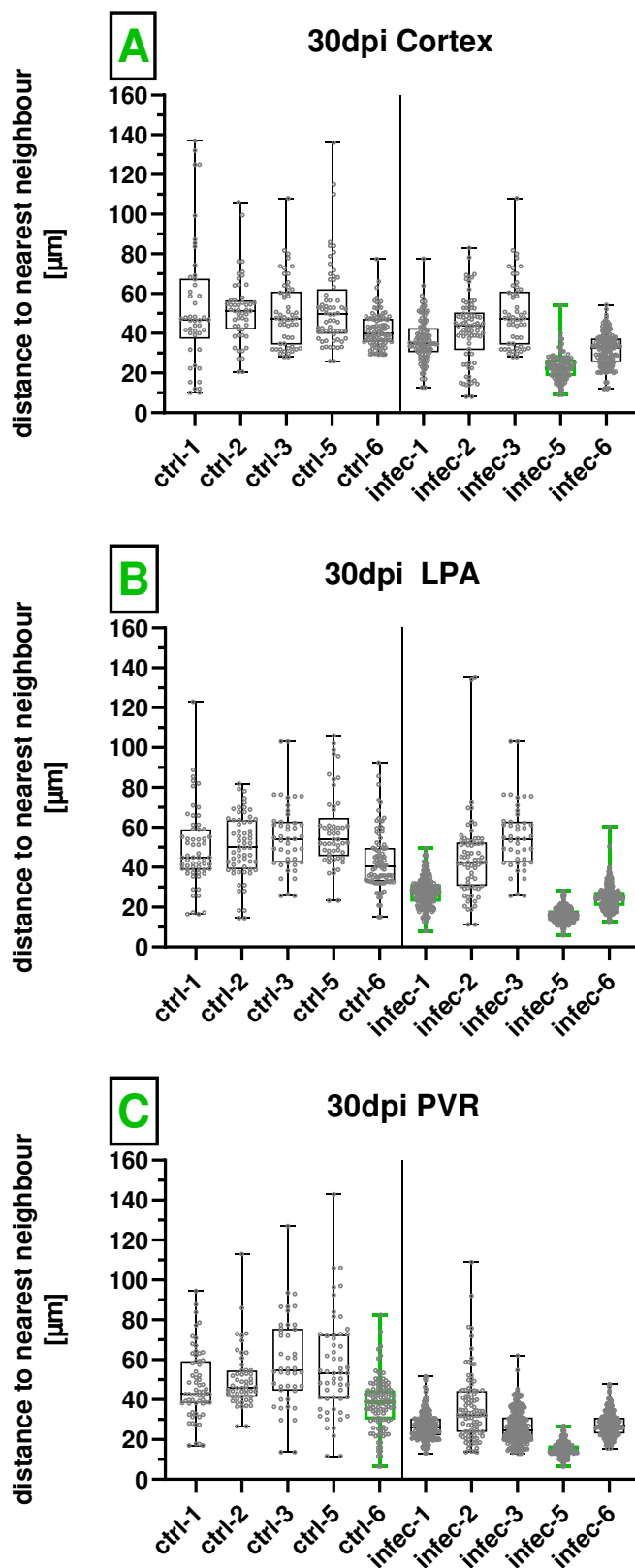
Im direkten Gruppenvergleich (Kontroll- gegen infizierte Gruppe mit je n=5) ist der kortikale Zell-Zell-Abstand (A) in der Kontrollgruppe signifikant größer ($p = 0,0476$ nach Mann-Whitney Test) zur infizierten Gruppe. Abgesehen von der Kontrollmaus ,ctrl-5' gibt es keine Ausreiser (grün). Diese konnte die doch erheblich variierende Verteilungsbreite des Zell-Zell-Abstandes in der 10dpi Kontrollgruppe nach 10dpi erklären. Dazu könnte ,ctrl-5' einen erheblichen Beitrag leisten. In (B) und (C) lassen sich keine eindeutigen Ausreiser finden.



Anhangsabbildung 4:
distance to nearest neighbour 20dpi nach Maus

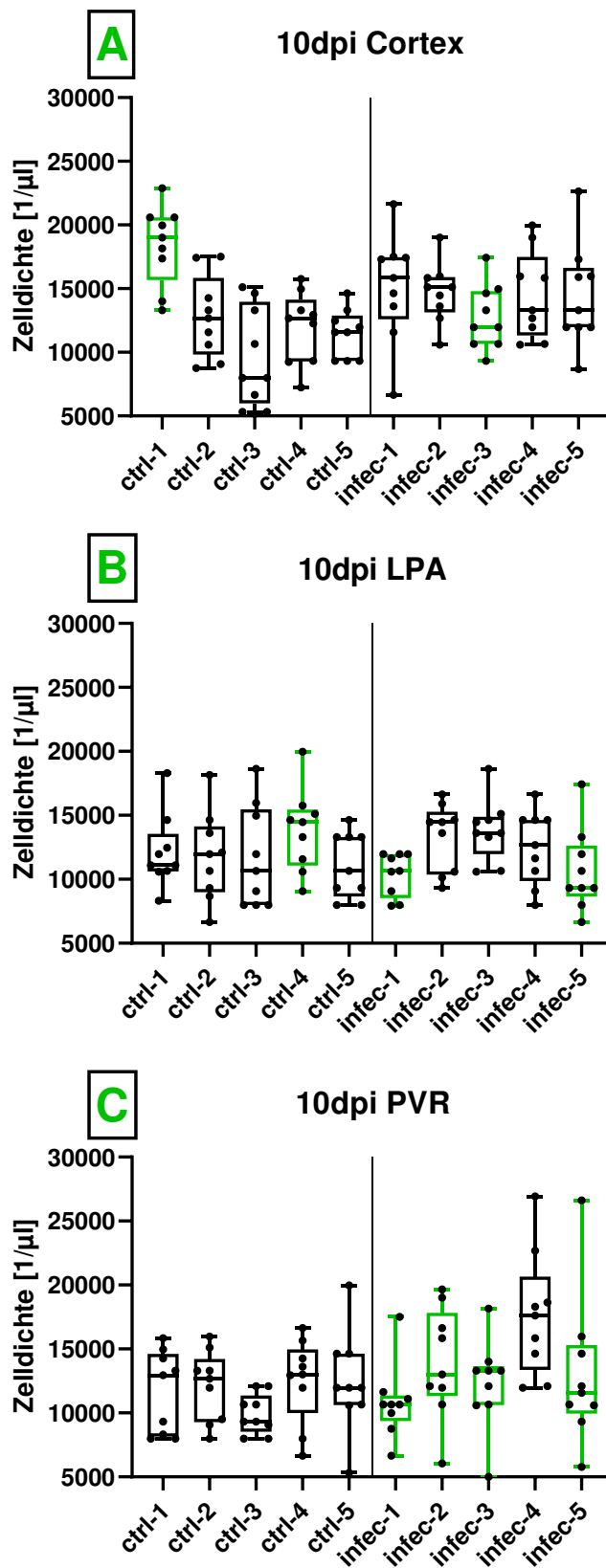
In der Abbildung sind die Zell-Zell-Abstände der anti-iba-1⁺-Zellen der zehn 20dpi Mäuse im Cortex (A), in der LPA (B) und dem PVR (C) nach Maus als Box-Whisker-Plots nebeneinander aufgetragen, um interindividuelle Unterschiede innerhalb der Untersuchungsgruppen zu finden, wie in [Anhangsabbildung 2](#) vorgeschlagen. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Auch in diese graphische Darstellung fließen außerdem (anders als bei der Zelldichte) keine Korrekturen hinsichtlich der untersuchten Dicken der Bilderstapel ein.

Abgesehen von der Kontrollmaus ‚ctrl-5‘ (grün) scheint der Zell-Zell-Abstand in allen 10 Mäusen vergleichbar verteilt zu sein. ‚Ctrl-5‘ weist dagegen in allen drei Arealen ([A], [B] und [C]) reduzierte Zell-Zell-Abstände auf. Die Unterschiede zwischen den gesamten Untersuchungsgruppen waren in [Anhangsabbildung 2](#) dagegen in keinem Areal signifikant.



Anhangsabbildung 5:
distance to nearest
neighbour 30dpi nach
Maus

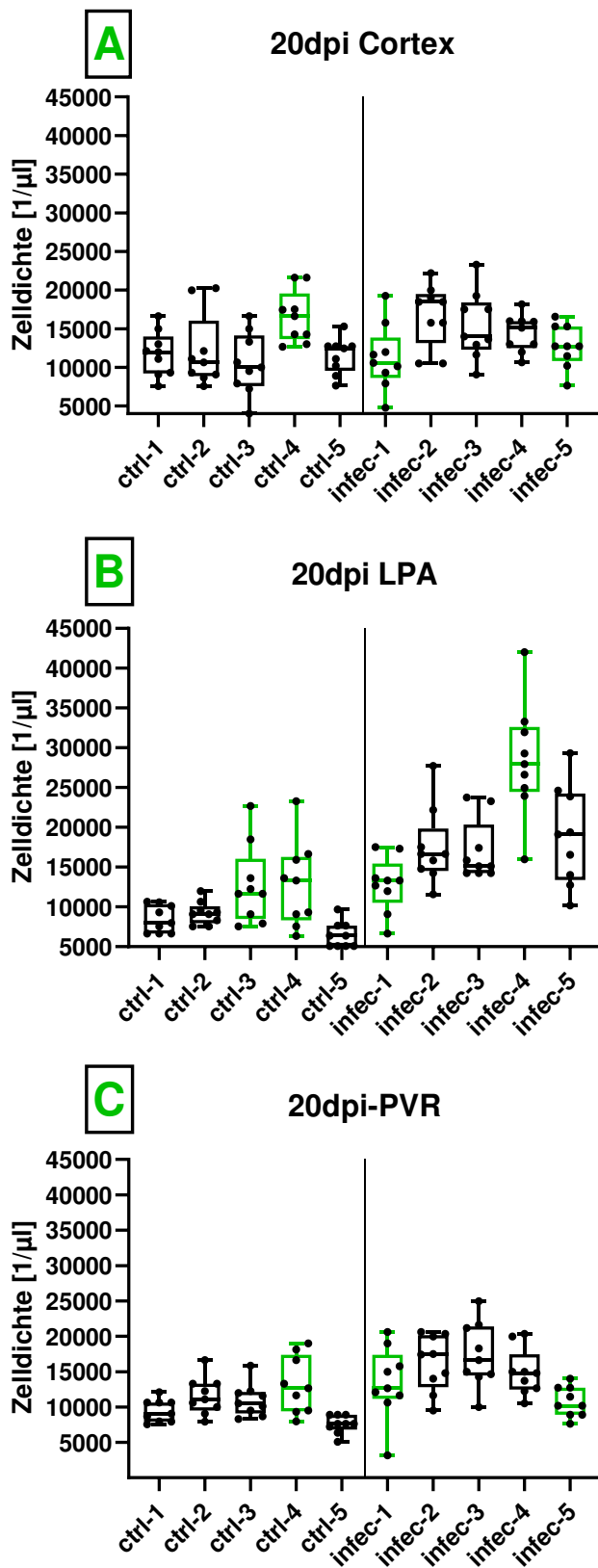
In der Abbildung sind die Zell-Zell-Abstände der anti-iba-1⁺-Zellen der zehn 30dpi Mäuse im Cortex (A), in der LPA (B) und dem PVR (C) nach Maus der Vollständigkeit halber analog zu den zwei vorangegangenen Abbildungen als Box-Whisker-Plots nebeneinander aufgetragen, um interindividuelle Unterschiede innerhalb der Untersuchungsgruppen zu finden, wie in Anhangsabbildung 2 vorgeschlagen. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen (n=5) nach 30dpi bereits signifikant. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die *Whiskers* Minimum und Maximum. Auch in diese graphische Darstellung fließen außerdem (anders als bei der Zelldichte) keine Korrekturen hinsichtlich der untersuchten Dicken der Bilderstapel ein. Nach 30dpi lässt sich in allen Arealen ([A], [B] und [C]) innerhalb der infizierten Untersuchungsgruppe starke interindividuelle Unterschiede mit konsekutiv relativ breiter Verteilung der Zell-Zell-Abstände. Entsprechend fallen an Ausreißern in (A) ,infec-5', in (B) ,infec-1', ,infec-5' und ,infec-6' sowie in (C) ,infec-5' am ehesten auf (alle grün). Die Identifikation als ,Ausreißer' fällt aber aufgrund der sonst auch inhomogenen Verteilung eher schwer. In (B) und (C) liegen die Mediane der Kontrollmäuse ,ctrl-3' und ,ctrl-5' vergleichbar hoch, aber rund 10µm oberhalb der anderen drei Mäuse.



Anhangsabbildung 6: Zelldichte 10dpi nach Maus

In der Abbildung sind die Zelldichten der zehn 10dpi Mäuse nach Maus in allen untersuchten Hirnarealen ([A], [B] und [C]) als Box-Whisker-Plots nebeneinander aufgetragen. Die Abbildung soll verdeutlichen, dass es interindividuelle Unterschiede zwischen den Mäusen einer Gruppe gibt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Die Box-Whisker-Plots der Mäuse, die dazu beitragen könnten, dass die Ergebnisse zwischen infizierter und Kontrollgruppe mit jeweils n = 5 (vgl. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) nicht signifikant erscheinen, sind grün dargestellt.

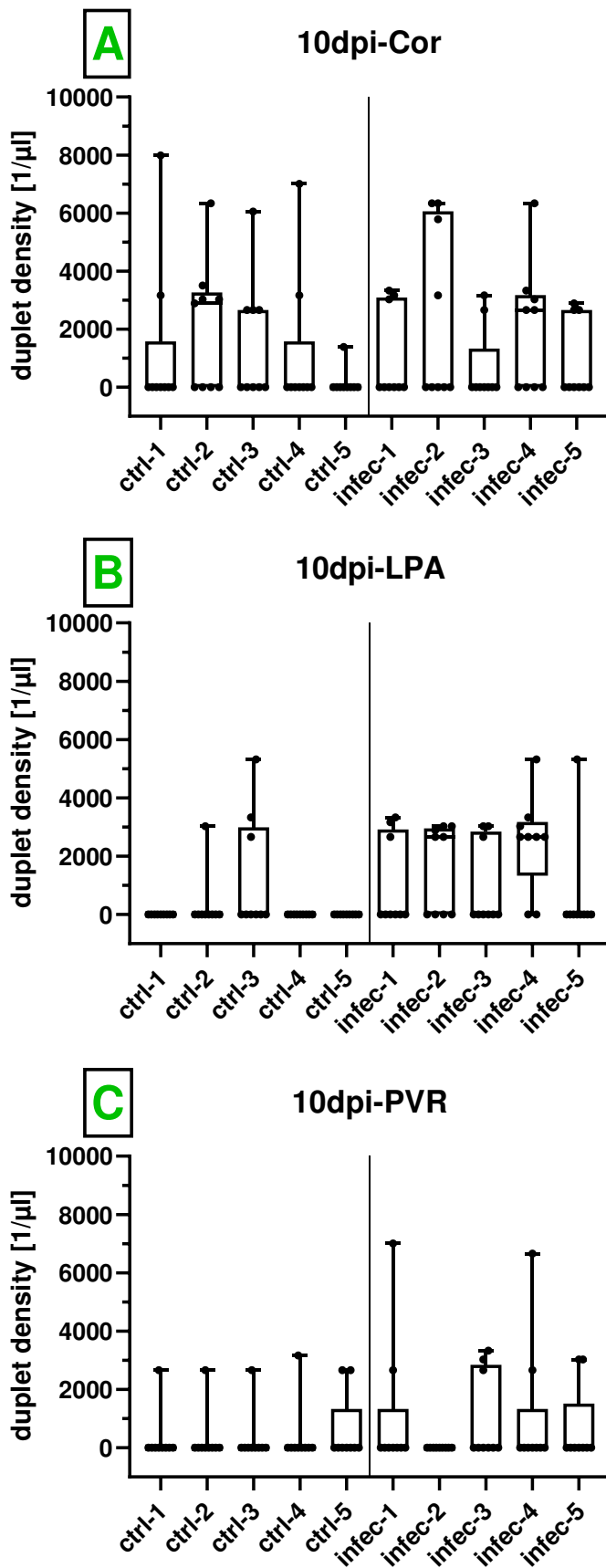
Im Cortex (A) liegt die mediane Zelldichte von ‚infec-3‘ deutlich unterhalb der der anderen vier infizierten Mäuse. Parallel dazu liegt ‚ctrl-1‘ deutlich oberhalb der restlichen vier Kontrollmäuse. So nähern sich die beiden Untersuchungsgruppen in ihrer Gesamtheit einander an. Ähnlich lässt sich in der LPA (B) festhalten, dass ‚ctrl-4‘ im Median oberhalb und ‚infec-1‘ und ‚infec-5‘ unterhalb der anderen Mäuse ihrer jeweiligen Gruppe liegen. So nähern sich auch diese beiden Untersuchungsgruppen in ihrer Gesamtheit einander an. In (C) liegen ‚infec-1‘ und ‚infec-5‘ für den PVR ebenfalls unterhalb der Mediane ihrer Gruppe; ‚infec-2‘ und ‚infec-3‘ liegen noch etwas höher, allerdings immer noch deutlich unter ‚infec-4‘. In (C) liegt ‚ctrl-3‘ im Median ebenfalls deutlich unterhalb ihrer Gruppe, was aber einen signifikanten Unterschied zwischen den gesamten Gruppen begünstigt.



Anhangsabbildung 7: Zelldichte 20dpi nach Maus

In der Abbildung sind die Zelldichten der zehn 20dpi Mäuse nach Maus in allen untersuchten Hirnarealen ([A], [B] und [C]) als Box-Whisker-Plots nebeneinander aufgetragen. Die Abbildung soll verdeutlichen, dass es interindividuelle Unterschiede zwischen den Mäusen einer Gruppe gibt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Die Box-Whisker-Plots der Mäuse, die dazu beitragen könnten, dass die Ergebnisse zwischen infizierter und Kontrollgruppe mit jeweils n = 5 (vgl. Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) nicht signifikant erscheinen, sind grün dargestellt.

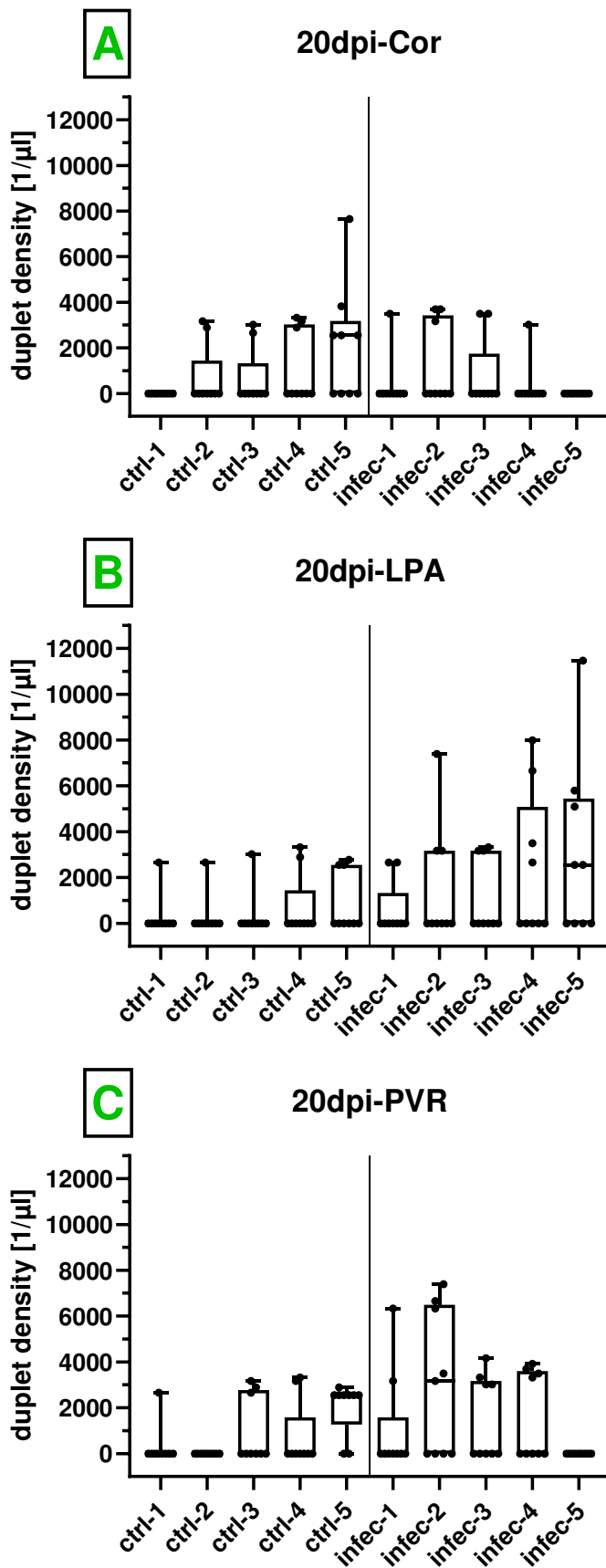
Im Cortex (A) liegen die medianen Zelldichten von ‚infect-1‘ und ‚infect-5‘ deutlich unterhalb der der anderen drei infizierten Mäuse. Parallel dazu liegt der Median ‚ctrl-4‘ deutlich oberhalb der der restlichen vier Kontrollmäuse. So nähern sich die beiden Untersuchungsgruppen in ihrer Gesamtheit einander an. Ähnlich lässt sich in der LPA (B) festhalten, dass ‚ctrl-3‘ und ‚ctrl-4‘ im Median oberhalb und ‚infect-1‘ unterhalb der anderen Mäuse ihrer jeweiligen Gruppe liegen. So nähern sich auch diese beiden Untersuchungsgruppen in ihrer Gesamtheit einander an, wobei auch erwähnt werden sollte, dass ‚infect-4‘ deutlich aus ihrer Gruppe heraussticht, aber dies einen signifikanten Unterschied zwischen den Gesamtgruppen eher begünstigt. In (C) liegen ‚infect-1‘ und ‚infect-5‘ für den PVR ebenfalls unterhalb der Mediane ihrer Gruppe. Auch liegt ‚ctrl-4‘ hier im Median ebenfalls oberhalb ihrer Gruppe.



Anhangsabbildung 8:
Duplettdichte 10dpi
nach Maus

In der Abbildung sind die Duplettdichten der zehn 10dpi Mäuse nach Maus in allen untersuchten Hirnarealen ([A], [B] und [C]) als Box-Whisker-Plots nebeneinander aufgetragen. Die Abbildung soll eigentlich verdeutlichen, dass es interindividuelle Unterschiede zwischen den Mäusen einer Gruppe gibt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Es fällt auf, dass der Median in beinahe allen Tieren gleich 0 ist und die Box-Plots entsprechend gar nicht richtig zur Darstellung kommen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in den meisten Tieren nicht einmal in der Hälfte der untersuchten Schnitte des jeweiligen Tiers Duplets gefunden werden konnte. Lediglich bei ,ctrl-2' und ,infec-4' in (A), ,infec-2' sowie ,infec-4' in (B) weisen eine mediane Duplettdichte ungleich 0 auf. In (C) findet sich gar keine Maus mit einer medianen Duplettdichte größer 0. Allerdings lässt sich auch festhalten, dass die Mäuse der infizierten Untersuchungsgruppe in allen Arealen zumindest tendenziell höhere Duplettdichten aufweisen.

Dies erklärt die unnormale Verteilung in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** für den Vergleich der Duplettdichten zwischen den gesamten Untersuchungsgruppen.



Anhangsabbildung 9:
Duplettdichte 20dpi
nach Maus

In der Abbildung sind die Duplettdichten der zehn 20dpi Mäuse nach Maus in allen untersuchten Hirnarealen ([A], [B] und [C]) als Box-Whisker-Plots nebeneinander aufgetragen. Die Abbildung soll eigentlich verdeutlichen, dass es interindividuelle Unterschiede zwischen den Mäusen einer Gruppe gibt. Die Boxen zeigen jeweils die Werte des 1. bis 3. Quartils sowie den Median. Die Whiskers Minimum und Maximum. Es fällt auf, dass der Median in beinahe allen Tieren gleich 0 ist und die Box-Plots entsprechend gar nicht richtig zur Darstellung kommen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in den meisten Tieren nicht einmal in der Hälfte der untersuchten Schnitte des jeweiligen Tiers Duplets gefunden werden konnte. Lediglich bei ‚ctrl-5‘ in (A), ‚infec-5‘ in (B) sowie ‚ctrl-5‘ und ‚infec-2‘ in (C) weisen eine mediane Duplettdichte ungleich 0 auf. Allerdings lässt sich auch festhalten, dass die Mäuse der infizierten Untersuchungsgruppe in der LPA und dem PVR zumindest tendenziell höhere Duplettdichten aufweisen. Im Kortex scheint die Duplettdichte tendenziell in der Kontrollgruppe größer als in der infizierten Gruppe zu sein. Dies erklärt die unnormale Verteilung in Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. für den Vergleich der Duplettdichten zwischen den gesamten Untersuchungsgruppen.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Physiologischen Institut, Lehrstuhl für Neurophysiologie, unter Betreuung von Prof. Dr. Olga Garaschuk durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch / in Zusammenarbeit mit Dr. Katherine Figarella (wissenschaftliche Mitarbeiterin).

Nahezu alle Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labor- und wissenschaftliche Mitarbeiter [Elizabeta Zirdum, Andrea Weible, Dr. Nicole Fröhlich, Dr. Katherine Figarella und Dr. Yury Kovalchuk] von mir eigenständig durchgeführt.

Die immunhistochemische Färbung, die photonenmikroskopischen Aufnahmen und Auszählung der darin aufgenommenen immigrierten Immunzellen nach 30dpi wurden aus einer vorangegangenen Masterarbeit (Annika Speidel, 2020) aufgegriffen.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach vorangehender Anleitung durch Dr. Katherine Figarella, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 14.05.2024

9 Veröffentlichungen

Olmedillas, M. *et al.* (2023) 'Plaque vicinity as a hotspot of microglial turnover in a mouse model of Alzheimer's disease', *GLIA*, pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.24458>.

Uzcategui, N.L. *et al.* (2023) 'Live imaging of microglia during sleeping sickness reveals early und heterogeneous inflammatory responses', *Frontiers in Immunology*, 14, pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1253648>.

10 Danksagung

Mein Dank geht zum einen an meine Doktormutter Prof. Dr. Olga Garaschuk für ihre Unterstützung und die Möglichkeit, meinen Teil zur Wissenschaft in einem so interessanten Fachbereich beitragen zu dürfen.

Mein Dank geht auch an Elizabeta Zirdum und Andrea Weible, die mir in der zunächst ungewohnten Umgebung „Labor“ immer mit Rat zur Seite standen.

Besonderer Dank geht aber allen voran an Dr. Katherine Figarella, die mich während meiner Arbeit trotz widriger Umstände mitbetreut und stets viel Zeit für mich und meine Fragen gefunden hat.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko für seine Geduld und sein Feedback danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern, meiner Partnerin und meinen Freunden, sowohl in der fränkischen als auch in der neuen schwäbischen Heimat, bedanken. Ihr wart mir immer eine stete Stütze. Ohne euch hätte ich die arbeitsintensive Zeit nicht so gut durchgestanden.

Tübingen, den 14.05.2024