

**CD33 auf humanen Mikroglia und seine Rolle bei der Entstehung
von Morbus Alzheimer**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Marcus Grobe-Einsler

aus Neuss

2016

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. Harald Neumann
2. Gutachter: PD Dr. Marcus Müller

Tag der Mündlichen Prüfung: 8.12.2015

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Direktor: Professor Dr. Oliver Brüstle

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Mikroglia	8
1.1.1 Mikroglia im zentralen Nervensystem.....	8
1.1.2 Funktion von Mikroglia.....	10
1.1.3 Humane Mikroglialinien für <i>in vitro</i> Versuche	11
1.2 Siglecs	12
1.2.1 Generelle Einleitung	12
1.2.2 Einteilung der Siglecs	13
1.2.3 Der ITAM-Signalweg	15
1.2.4 Der ITIM Signalweg	15
1.2.5 Struktur des CD33-Rezeptor	16
1.3 Morbus Alzheimer	21
1.3.1 Generelle Einleitung	21
1.3.2 Amyloide Plaques.....	21
1.3.3 Neurofibrilläre Tangles	22
1.3.4 Neuropathologie des Morbus Alzheimer.....	22
1.3.5 Der CD33-Rezeptor und spätmanifestes Morbus Alzheimer.....	23
1.4 Ziel der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Materialien	26
2.1.1 Reagenzien	26
2.1.2 Wachstumsfaktoren und Zytokine	27
2.1.3 Puffer und Lösungen	27
2.1.4 Kits	28
2.1.5 Zellkulturmedium	29
2.1.6 Primer.....	29
2.1.7 Primär-Antikörper	29
2.1.8 Zusätzliche Hilfsmittel für Färbungen	30
2.1.9 Sekundär-Antikörper.....	30

2.1.10	Isotypen-Antikörper	30
2.1.11	Verbrauchsmaterial	30
2.1.12	Technische Ausrüstung	32
2.1.13	Software	33
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur von iPSdM-Mikroglialinien.....	33
2.2.2	Nachweis der Gen-Transkription	33
2.2.3	Gelextraktion	34
2.2.4	Ficoll-Gradient zur Gewinnung von Leukozyten	35
2.2.5	Durchflusszytometrie	35
2.2.6	Immunozytochemie von iPSdM-Mikroglialinien	35
2.2.7	Immunohistochemie von Hirnschnitten.....	36
2.2.8	Auswertung der Immunohistochemie	37
2.2.9	Statistische Analyse	38
2.3	Förderung	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Nachweis der Transkription des CD33-Rezeptors in iPSdM-Mikroglialinien unter verschiedenen Stimulations-Bedingungen mittels PCR	39
3.2	Qualitativer Protein-Nachweis von CD33 <i>in vitro</i> auf iPSdM-Mikroglialinien mittels Immunozytochemie	41
3.3	Qualitativer Protein-Nachweis von CD33 <i>in vitro</i> auf iPSdM-Mikroglialinien mittels Durchflusszytometrie	43
3.4	Quantitativer Protein-Nachweis von CD33 <i>in vitro</i> auf iPSdM-Mikroglialinien mittels Durchflusszytometrie	46
3.5	Nachweis der Transkription des <i>cd33</i>-Gen in humanem Hirngewebe.....	50
3.6	Nachweis des CD33-Rezeptors in humanem Hirngewebe mittels Immunohistochemie.....	51
3.7	Quantitative Analyse der CD33-Expression auf humanen Mikroglia bei Alzheimer- und Kontroll-Patienten.....	54
4.	Diskussion	61
4.1	Das <i>cd33</i>-Gen wird in iPSdM in mRNA transkribiert und der CD33-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert.....	61
4.1.1	<i>cd33</i>-Gen-Transkription in humanen iPSdM.....	61

4.1.2	Expression des CD33 Rezeptors in humanen iPSdM	62
4.2	Sialidase-Behandlung von iPSdM-Mikroglialinien führt zu einem gesteigerten Detektionsniveau des CD33-Rezeptors auf der Zelloberfläche	64
4.3	Nachweis von <i>cd33</i>-Transkription und Expression des CD33-Rezeptors in menschlichem Hirn-Gewebe	67
4.4	Alzheimer-Patienten zeigen eine gesteigerte Expression des CD33- Rezeptors im Vergleich zu Kontroll-Patienten	67
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

APP	Amyloid precursor protein
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
c-myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
Cy3	Cyanin 3
DAP12	DNAX activation protein of 12 kDa
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Fab	Fragment antigen binding
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GWAS	Genome wide association studies
Iba-1	Ionized calcium binding adaptor molecule-1
INF- γ	Interferon- γ
IL-3	Interleukin-3
IL-4	Interleukin-4
iPS	Induced pluripotent stem-cell
iPSdM	induced pluripotent stem-cell derived microglia
ITAM	Immunotyrosine like activatory motive
ITIM	Immunotyrosine like inhibitory motive
Klf4	Krüppel-like factor 4
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid

M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
mRNA	messenger ribonucleic acid
Neu5Ac	N-Acetylneuraminic acid
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminic acid
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B-cells
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NGS	Normal goat serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Oct3/4	Octamer 3/4
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase chain reaction
SH2	Src homology 2
SHP	SH2 containing tyrosine phosphatases
Siglec	Sialic acid binding immunoglobuline like lectin
SIRP β 1	Signal regulatory protein β 1
Sox2	Sry box-containing gene 2
TBE	Tris Borat EDTA
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor- α
TLR	Toll like receptor
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Mikroglia

1.1.1 Mikroglia im zentralen Nervensystem

Das zentrale Nervensystem (ZNS) besteht neben den Neuronen, welche funktionell der Weitergabe von Information durch Leitung von elektrischen Potenzialen dienen, auch noch aus einer zweiten Zellpopulation; den Neuroglia. Diese oft als „Stützzellen“ fehlverstandene Zellpopulation weckte innerhalb der letzten Jahre zunehmend das Interesse der Forschung. Die Neuroglia können weiter in zwei Unterformen kategorisiert werden: die Makroglia, welche als Oligodendrozyten neuronale Axone schützend umhüllen, als Astrozyten die Homöostase des ZNS aufrechterhalten und somit maßgeblich zur Funktionalität der Neurone beitragen sowie die Mikroglia.

Embryologisch stammen die Mikroglia von myelotischen, also hämatopoetischen Vorläuferzellen ab und sind somit nicht, wie die anderen Zellen des ZNS, Abkömmlinge des Neuroektoderms, sondern mesodermalen Ursprungs (siehe Abbildung 1). In das Gehirn gelangen sie während der frühen Embryonalzeit aus dem Dottersack durch die noch nicht vollständig ausgereiften Blutgefäße, um im ZNS eine eigene Zellpopulation zu bilden, welche sich durch Mitose weitestgehend selbst unterhält. Eine „Regeneration von außen“, also ein Einwandern neuer Mikroglia oder deren Vorläufer aus einem Stammzellpool ist somit nicht möglich.

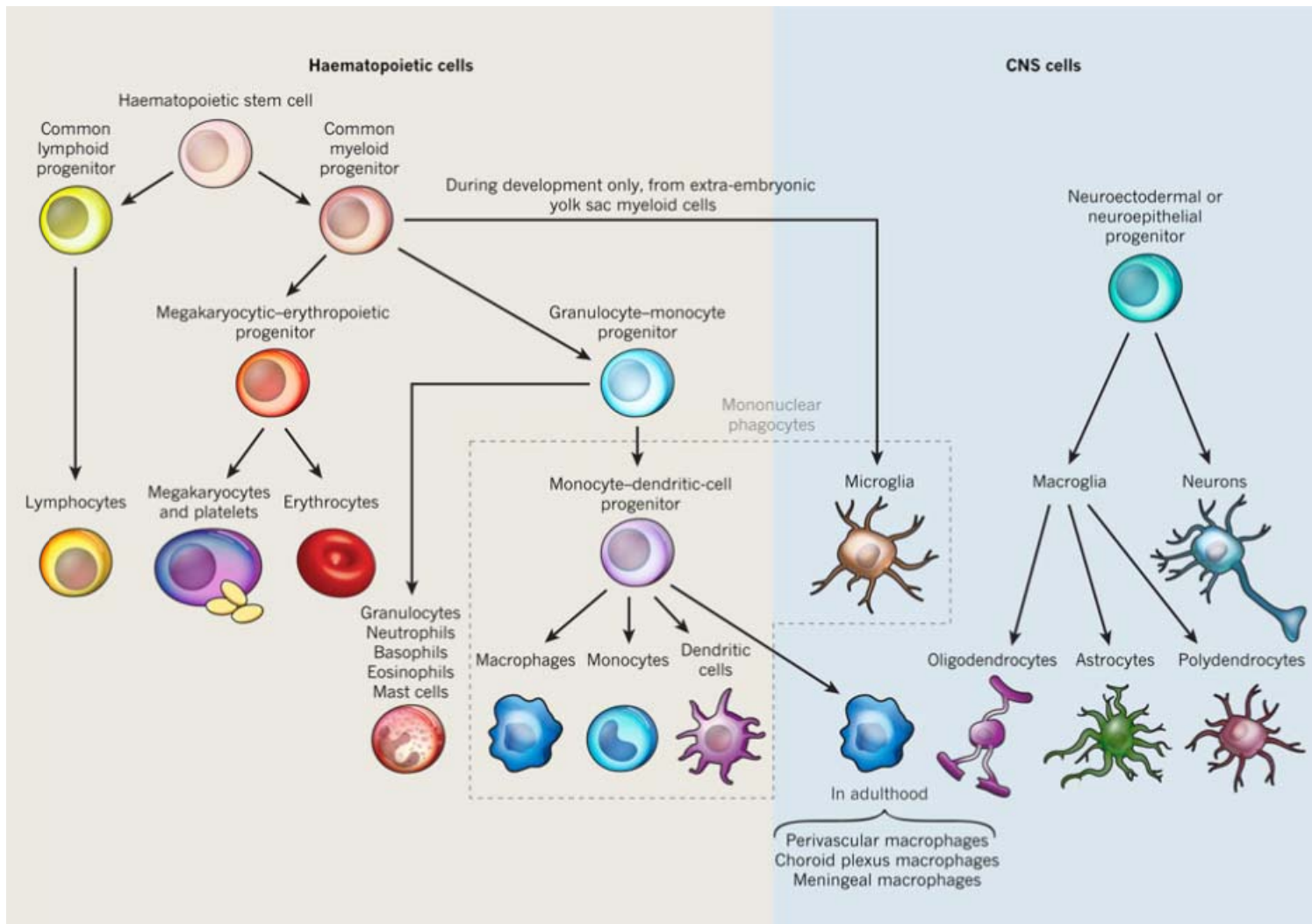


Abbildung 1: Übersicht von Zelltypen des zentralen Nervensystems und deren Entwicklung. Mikrogliale Vorläuferzellen wandern während der Entwicklung in das Parenchym des zentralen Nervensystems ein, dort sind sie die einzigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Ransohoff und Cardona, 2010).

1.1.2 Funktion von Mikroglia

Da das menschliche Gehirn nicht wie der Rest des Körpers mit Lymphgefäßen und Lymphozyten durchzogen ist, sind die Mikroglia als die einzigen Repräsentanten des angeborenen Immunsystems im ZNS zu sehen.

Gemeinhin werden Mikroglia auch als Hirn-Makrophagen bezeichnet, was ihrer Funktion und ihres Ursprunges zwar zumindest teilweise entspricht, ihre tatsächliche Funktion übersteigt die einer gewöhnlichen Fresszelle jedoch bei weitem. Mikroglia machen ca. 10 % der Zellpopulation im ZNS aus und kommen im Gehirn in zwei verschiedenen Grundzuständen vor (Ransohoff und Perry, 2009). Dabei können sie über Zwischenstufen von dem so genannten Ruhezustand, der ersten Form, in den aktivierten Zustand, die zweite Form übergehen.

Im Ruhezustand verharren die rundlichen Zellkörper der Mikroglia im zentralen Nervensystem als gleichmäßig verteilte, ortsständige Zellen mit unzähligen feinen migratorischen Ausläufern, welche in das umgebende Nervenfasernetz hineinragen und dieses kontinuierlich abtasten (Nimmerjahn et al., 2005). In diesem Zustand können sie immunsupprimierende sowie neurotrophe Faktoren sezernieren (Ranshoff und Perry, 2009).

Eine Aktivierung der Mikroglia kann durch mehrere Faktoren ausgelöst werden. Hierzu zählen bspw. Inflammation (Entzündung), Ischämie (Sauerstoffunterversorgung) oder Nekrose (Zelltod) (Zhou et al., 2005). Reaktiv migrieren die aktivierten Mikroglia dann entlang eines Chemokingradienten in das geschädigte Gewebe um dort zu proliferieren und ihre Morphologie zu plumperen Zellen mit weniger Fortsätzen zu verändern.

Die in das geschädigte Gewebe eingewanderten aktivierten Mikroglia akkumulieren, um als adäquate Reaktion bspw. nekrotisches Gewebe, Antigen-Antikörper Komplexe oder Zelldebris zu phagozytieren oder Sauerstoffradikale zur Abwehr von Mikroorganismen zu produzieren.

Darüber hinaus können Mikroglia Zytokine und neurotrophe Faktoren sezernieren und auf diesem Weg Immunreaktionen initiieren und modulieren oder die Stoffwechsellleistungen aufrechterhalten (Rivest et al., 2009). Somit haben sie neben ihrer phagozytotischen und immunologischen Funktion auch eine neuro-protektive Aufgabe. Neuerdings rücken Mikroglia immer mehr in den Fokus des Interesses, da rezente

Forschungsergebnisse Mikroglia immer wieder mit der Pathogenese diverser neurologischer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose, Morbus Parkinson und amyotrophe Lateralsklerose in Zusammenhang bringen.

1.1.3 Humane Mikroglialinien für *in vitro* Versuche

Humane Mikroglia stehen sowohl für *in vivo* als auch für *in vitro* Versuche in nur sehr begrenztem Umfang zur Verfügung. Sowohl die Isolation als auch die Kultur dieser Zellen sind mit erheblichem Aufwand verknüpft und geeignetes Spendermaterial steht nur sehr begrenzt zur Verfügung. Um diese Problematik zu umgehen bieten die embryonalen Stammzellen als Pool für die Differenzierung von Mikroglia eine geeignete Option. Die Verwendung dieser embryonalen Stammzellen zu Forschungszwecken birgt jedoch durch die zur Zellgewinnung notwendige Zerstörung eines Embryos eine ethische Problematik, welche auch abseits der Wissenschaft kontrovers diskutiert wurde und bis heute immer neue Diskussionen und gesetzliche Auflagen mit sich brachte.

Für die Entwicklung einer Alternative waren zwei Forschungsdurchbrüche entscheidend, für die 2012 auch der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde. Takahashi und Yamanaka konnten 24 Kandidaten-Gene identifizieren, welche durch virale Transduktion eine Pluripotenz wiederherstellen konnten (Takahashi und Yamanaka, 2006). Später konnte der Kreis auf vier notwendige Gene eingegrenzt werden: *Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog (c-myc)*, *Krüppel-like factor 4 (Klf4)*, *Octamer 3/4 (Oct3/4)* und *SRY box-containing gene 2 (Sox2)*.

Mit Hilfe dieser Vorarbeit konnten schließlich auch aus humanen Fibroblasten induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) gewonnen werden (Takahashi et al., 2007), was in einer rasanten Entwicklung auf diesem Feld resultierte und zur Entwicklung einer Vielzahl von iPS Zelllinien führte. Bei den in diesem Projekt verwendeten *induced pluripotent stem cell derived microglia (iPSdM)* handelt es sich um von Dr. Kristin Roy aus iPS Zellen differenzierten Mikrogliazellen (noch nicht publiziert).

Dieser Zelltyp ermöglicht die stabile Zellkultur und experimentelle Analyse von humanen Mikroglia, ohne auf embryonales Spendermaterial angewiesen zu sein.

Das Protokoll zur Differenzierung der iPS zu iPSdM beinhaltet die Zugabe von Faktoren, welche die natürliche Entwicklung von Mikroglia im Dottersack nachstellen. Dr. Roy hat in ausführlichen Versuchsreihen iPSdM als adäquates Korrelat von primären humanen Mikroglia validiert (noch nicht publiziert).

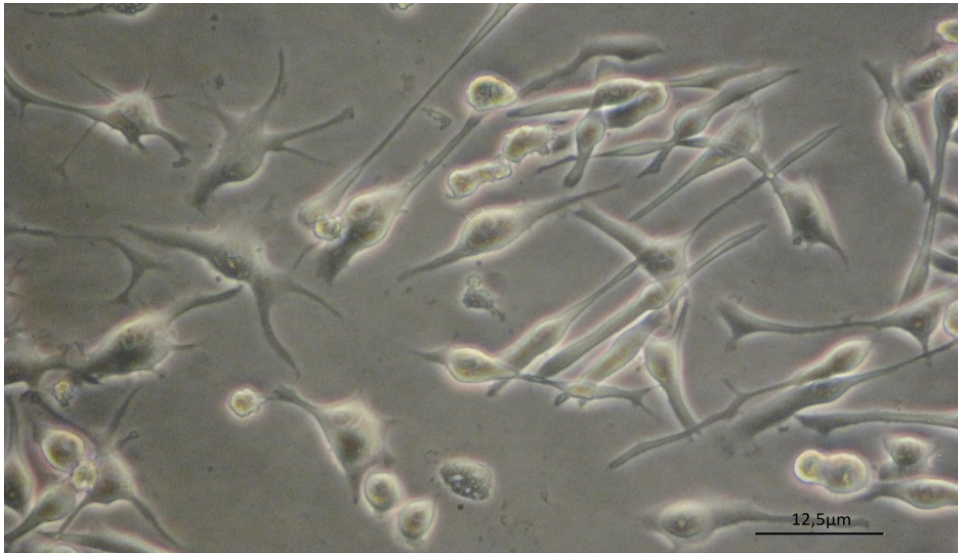


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt iPSdM in Zellkultur. Die rundlichen Zellkörper besitzen die typische mikrogliale Morphologie mit mehreren Fortsätzen, welche in die Umgebung hineinreichen. Maßstab 12,5 μm .

1.2 Siglecs

1.2.1 Generelle Einleitung

Für die Interaktion der Mikroglia mit ihrer Umgebung sind die auf ihrer Oberfläche exprimierten Rezeptoren verantwortlich, welche Signalmoleküle oder ganze molekulare Strukturen erkennen und ihrer Funktion entsprechende jeweils spezifische Reaktionen auslösen können.

Zu diesen Rezeptoren gehören auch die *Sialic acid binding immunoglobulin like lectins* (Siglecs), welche eine entscheidende Rolle bei der mikroglialen immunologischen Antwort, z.B. der Phagozytose übernehmen (Wang und Neumann, 2010).

Auf der Oberfläche aller eukaryoter Zellen befindet sich ein dichter Teppich aus verzweigten Zuckerketten, die sogenannte Glykokalyx. Rezeptoren, welche einzelne Merkmale dieser Glykokalyx, die Verzweigungsmuster und Seitenkettenmodifikationen einzelner Zuckerketten erkennen können, werden als Lektine bezeichnet. Diese können

sowohl Strukturen auf der eigenen Zelloberfläche als *cis*-Bindung, als auch Strukturen auf fremden Zelloberflächen als *trans*-Bindungen erkennen und entsprechend ihrer Funktion spezifische Signalkaskaden initiieren.

Siglecs sind eine Untergruppe der Lektine. Sie erkennen die für sie namensgebenden Sialinsäuren - saure Oligosaccharide aus Zuckerkonjugaten der Glykokalyx. Ihr extrazelluläres, aminotermiales Ende besteht aus zwei Teilen, wobei beide für die Erkennung und Bindung von Sialinsäuren verantwortlich sind: Ein evolutionär dem variablen Teil eines Immunglobulins ähnlichen (V-artigem) Teil und einem evolutionär dem konstanten Bereich eines Immunglobulins ähnlichen (C2-artigen) Teil.

Siglecs besitzen nur eine Transmembrandomäne, weshalb man sie als Typ-1 Transmembranproteine klassifiziert. Am C-terminalen intrazellulären Ende kann entweder ein *immunoreceptor tyrosin based activatory motiv* (ITAM), oder häufiger ein *immunoreceptor tyrosin based inhibitory motiv* (ITIM) vorkommen, welches antagonistisch zum ITAM wirkt (s.u.). Einige Siglecs besitzen zusätzlich zum ITIM noch ein sogenanntes *ITIM-like motif*, welches sich vom ITIM lediglich durch eine geringere Affinität zu den Molekülen der von ihnen ausgelösten Signalkaskade unterscheidet (Crocker et al., 2007; McMillan und Crocker, 2008; Von Gunten und Bochner, 2008).

1.2.2 Einteilung der Siglecs

Anhand von Sequenzübereinstimmungen können unter den Siglecs zwei Gruppen unterschieden werden: Die zwar untereinander sehr heterogenen, jedoch evolutionär stark konservierten Siglecs, wozu Siglec -1, Siglec-2, Siglec-4 und Siglec-15 zählen, sowie die *cluster of differentiation 33 (CD33)-related Siglecs*, welche sich teilweise durch große Homologität auszeichnen, jedoch einer raschen evolutionären Entwicklung unterliegen und spezies-spezifische Unterschiede aufweisen. Zu dieser Gruppe der *CD33-related Siglecs* zählt neben Siglec-5 bis Siglec-11 und Siglec-14 auch Siglec-3 (CD33).

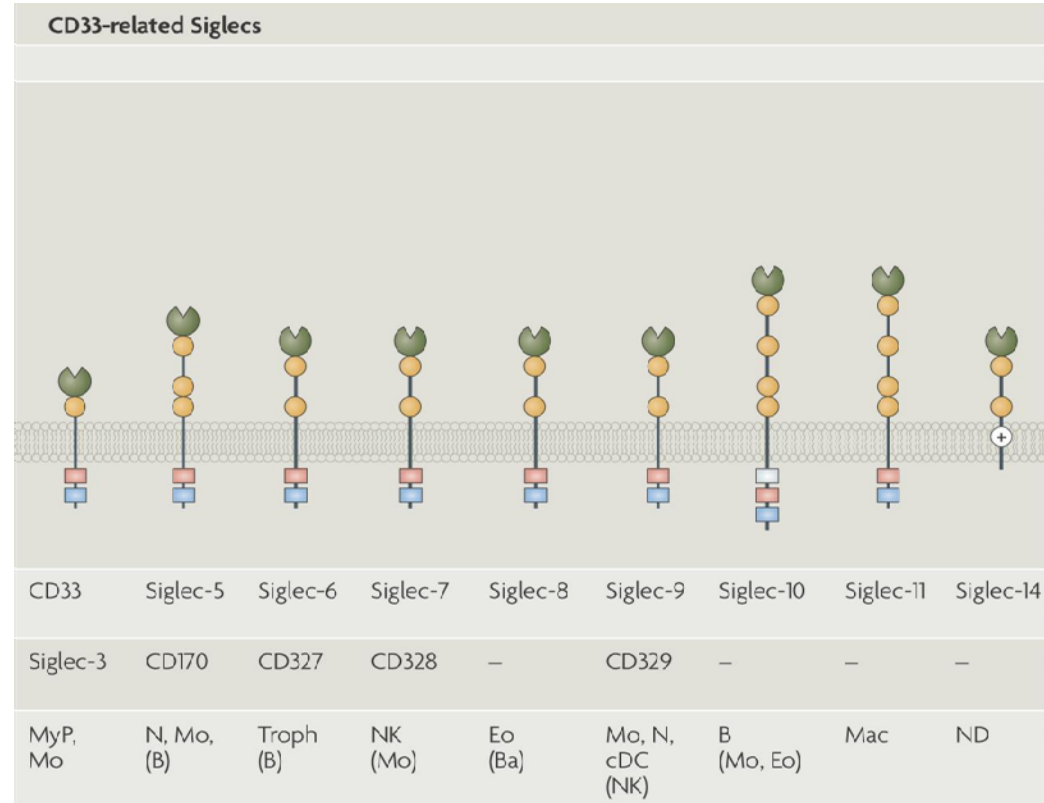
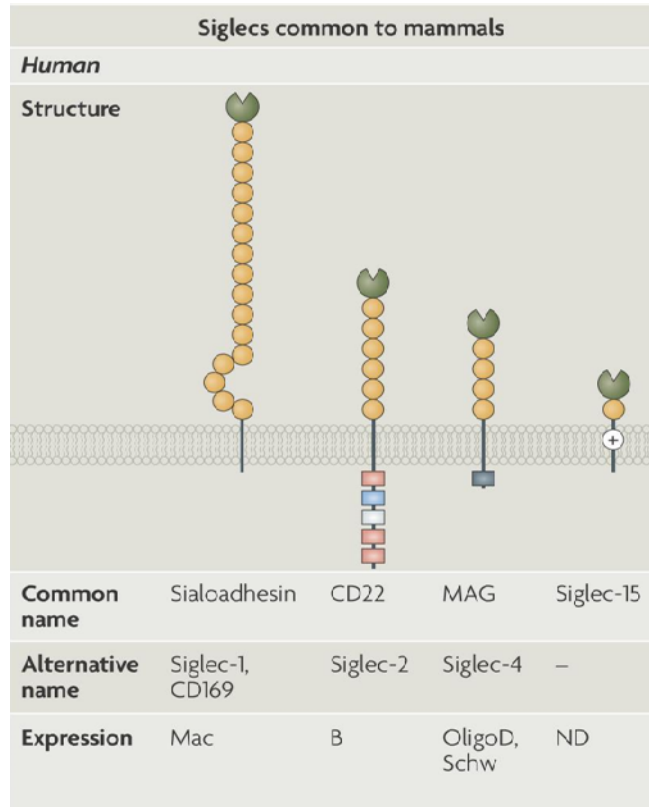


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt die beim Menschen vorkommenden Siglecs unterteilt in zwei Gruppen: Siglec-1, Siglec-2, Siglec-4, und Siglec-15 sind untereinander heterogen und evolutionär stark konserviert, wohingegen die „CD33-related siglecs“ untereinander eher homogen sind, jedoch einer raschen Evolution unterliegen und spezies-übergreifende Unterschiede aufweisen (Modifiziert nach Crocker et al., 2007)

1.2.3 Der ITAM-Signalweg

Während der extrazelluläre Teil der Siglecs für die Ligandenerkennung und –bindung verantwortlich ist, determiniert der intrazelluläre Teil die immunologische Funktion des Rezeptors. Einige Siglecs besitzen eine intrazelluläre ITAM-Domäne, welche eine aktivierende Signalkaskade nach sich zieht, während andere Siglecs eine ITIM-Domäne besitzen und inhibitorisch wirken.

Der ITAM-Signalweg ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess, welcher eine komplizierte intrazelluläre Signalkaskade involviert, an deren Ende die Phagozytose beispielsweise von Debris oder Fremdstoffen steht (Ziegenfuss et al., 2008). Über eine Transmembran-Domäne mit geladenen Aminosäuren akkumulieren aktivierende Immunorezeptoren wie *triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2) oder *signal regulatory protein β 1* (SIRP β 1) mit intrazellulären ITAM-Domänen (z.B. von *DNAX activation protein of 12 kDa* (DAP12) oder einer γ -Kette von Fc-Rezeptoren). Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor werden Mitglieder der Src-Kinase-Familie rekrutiert, um Tyrosinreste des ITAM zu phosphorylieren. Diese dienen nun als Adapter für einen Teil der Syk-Proteinkinase, die *Src homology 2* (SH2) (siehe Abbildung 4). Als Konsequenz werden aktivierende Signalwege in Gang gesetzt (Hamerman et al., 2009; Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

1.2.4 Der ITIM Signalweg

Die meisten Siglecs besitzen intrazellulär eine ITIM-Domäne und wirken antagonistisch zum ITAM-Signalweg, wirken also inhibitorisch und verhindern die Phagozytose. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Phagozytosekapazität Siglec-11-exprimierender Mikroglia signifikant herabgesetzt ist (Wang und Neumann, 2010).

Funktionell führt eine Ligandenbindung zu einer Rekrutierung von *SH2 containing tyrosine phosphatases* (SHP1 und/oder SHP2), welche durch Dephosphorylierungen den ITAM-Signalweg unterbrechen (Crocker et al., 2007; Paul et al., 2000; Taylor et al., 1999; Ulyanova et al., 1999) (siehe Abbildung 4).

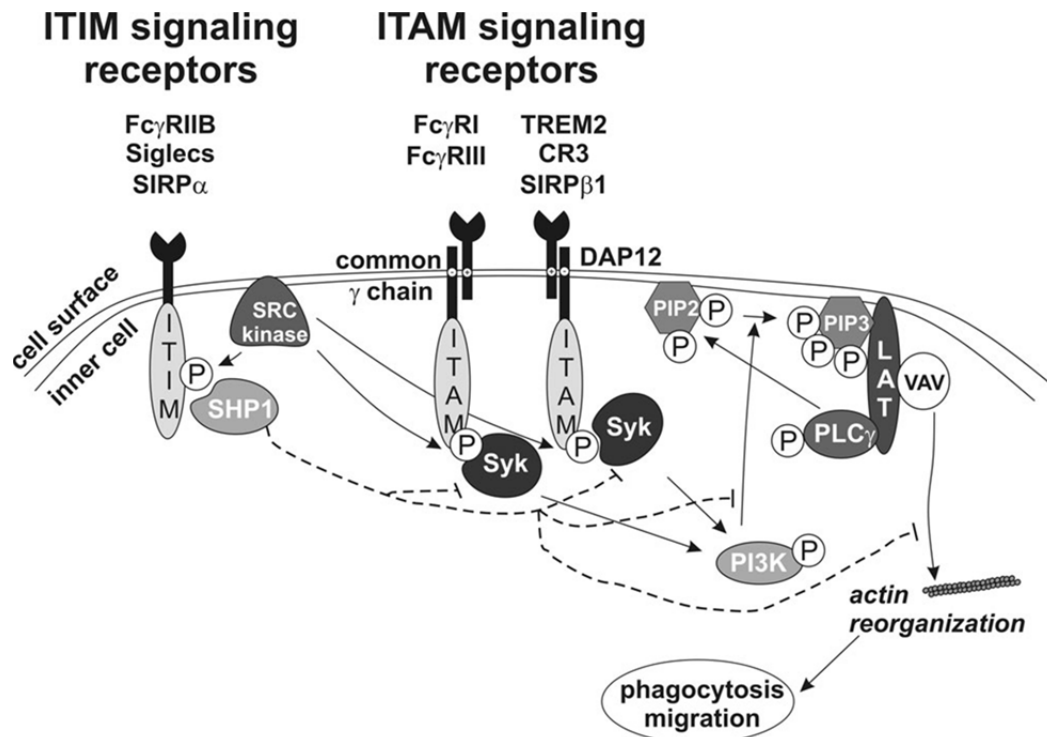


Abbildung 4: Der ITIM-Signalweg führt bei Ligandenbindung zur Rekrutierung von SHP1/2, welche durch entsprechende Dephosphorylierungen den ITAM-Signalweg antagonisieren. Der ITAM-Signalweg führt durch Kumulation von aktivierendem Rezeptor und entsprechendem Liganden mit intrazellulären ITAM-Domänen zu einer Phosphorylierung der Tyrosinreste der ITAM-Domäne durch Mitglieder der Src-Familie. Teile der Syk-Proteinkinase können nun gebunden werden, wodurch eine aktivierende Signal-Kaskade mit konsekutiver Phagozytose in Gang gesetzt wird. (Aus Linnartz et al., 2013)

1.2.5 Struktur des CD33-Rezeptor

Wie alle Siglecs ist auch CD33 (Siglec-3) ein Transmembranprotein vom Typ-1, es besitzt nur eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre ITIM-Domäne. Generell gilt humanes CD33 als Marker der myeloiden Reihe (Crocker *et al.*, 2007; McMillan und Crocker, 2008; Von Gunten und Bochner, 2008), wobei in der Vergangenheit vereinzelt auch eine schwache Expression auf Zellen lymphoiden Ursprungs gezeigt werden konnte (Handgretinger *et al.*, 1993; Hernández-Caselles *et al.*, 2006; Pérez-Olivía *et al.*, 2011). Trotzdem wurde CD33 bei Leukämien zusammen mit einigen weiteren Proteinen als diagnostischer Marker für die Differenzierung zwischen myeloiden und lymphoiden Leukämien eingesetzt (Crocker und Varki, 2001; Feuillard *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 1995; Matutes *et al.*, 1985). In der Vergangenheit war CD33 therapeutisches Ziel bei der

Behandlung myelotischer Leukämien, wobei durch eine an einen Antikörper gekoppelte zytotoxische Substanz (Gemtuzumab, Mylotarg[®]) gezielt myelotische (Leukämie-) Zellen angegriffen werden sollten (Naito et al., 2000; Sievers *et al.*, 2001; Van der Velden et al., 2001). Dieses Präparat musste 2010 jedoch aufgrund unzureichender Wirksamkeit gegenüber der Standardtherapie bei insgesamt erhöhter Mortalität wieder vom Markt genommen werden (*Food and Drug Administration (FDA) news release, June 21, 2010*). Detaillierte Gründe für die enttäuschende klinische Bilanz sind nicht abschließend geklärt.

Bisher können vier verschiedene Splice-Varianten des humanen CD33 unterschieden werden, welche sich zwar in ihren extrazellulären und intrazellulären terminalen Anteilen unterscheiden, jedoch einen hoch homologen bis identischen zentralen Abschnitt besitzen.

Dieser besteht aus einer extrazellulären membranahnen immunoglobulin-ähnlichen C2 Domäne, einer einfachen Transmembrandomäne und einer ebenfalls membranahnen, aber intrazellulären ITIM-Domäne (Crocker et al., 2007; McMillan und Crocker, 2008; Von Gunten und Bochner, 2008) (siehe Abbildung 5).

Zusätzlich zu den in Abbildung 5 aufgezeigten Splicevarianten wurde kürzlich eine weitere fünfte Variante mit einer fehlenden C2-Domäne beschrieben (Malik et al., 2013). Diese Splice-Variante ist nicht mehr in der Lage *cis*- und *trans*-Bindungen zu seinen Liganden einzugehen und somit wäre die Aufrechterhaltung eines konstitutorisch-inhibitorischen Signals nicht mehr möglich. Diese Splice-Variante wurde als protektiv für Morbus Alzheimer beschrieben.

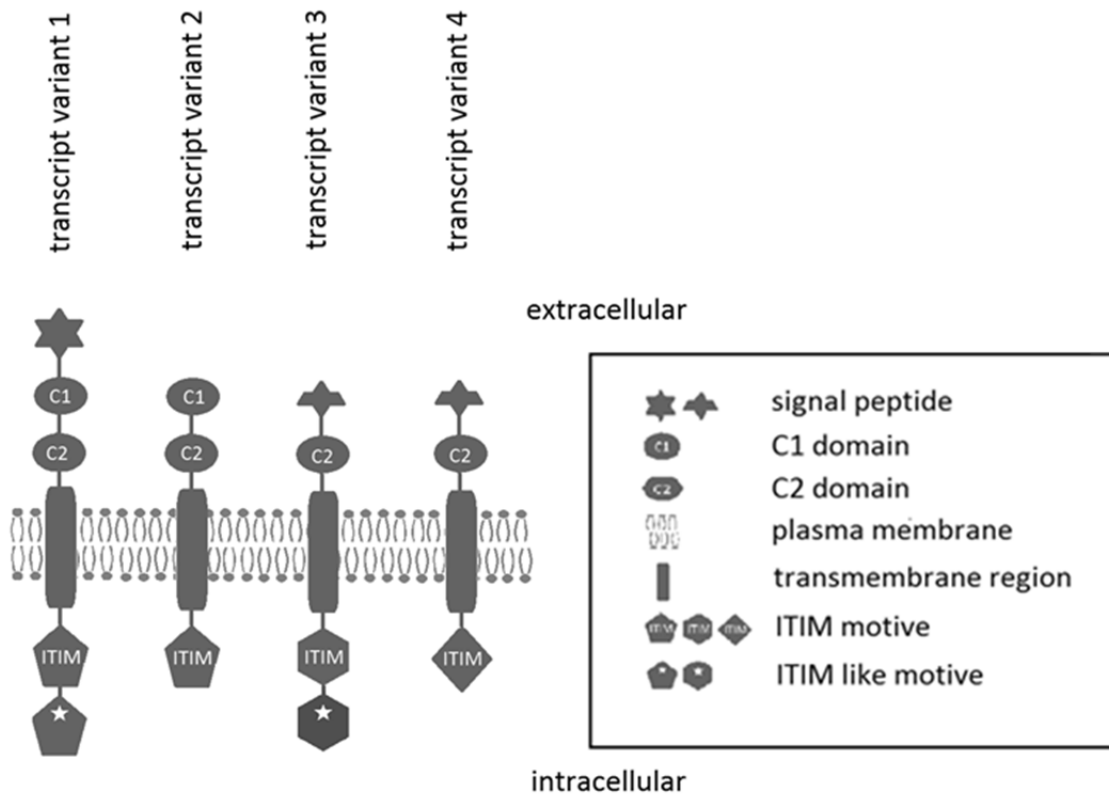


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt schematisch die 4 bekannten Splice- Varianten von CD33 entsprechend der Sequenzen der Ensembl-Datenbank. Alle 4 Splice-Varianten haben eine extrazelluläre C2-Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre (untereinander leicht variable) ITIM Domäne gemeinsam. Die Varianten unterscheiden sich lediglich in den Modifizierten C-terminalen intrazellulären und N-terminalen extrazellulären Enden (eigene Abbildung).

Aufgrund der evolutionär bedingten und oben beschriebenen spezies-übergreifenden Unterschiede innerhalb der *CD33 related Siglecs*, kann auch beim CD33-Rezeptor die humane eindeutig von der murinen Form unterschieden werden (siehe Abbildung 6), wobei die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz im extrazellulären Teil lediglich 62 % beträgt (Brinkmann-Van der Linden et al., 2003; Tchilian et al., 1994).

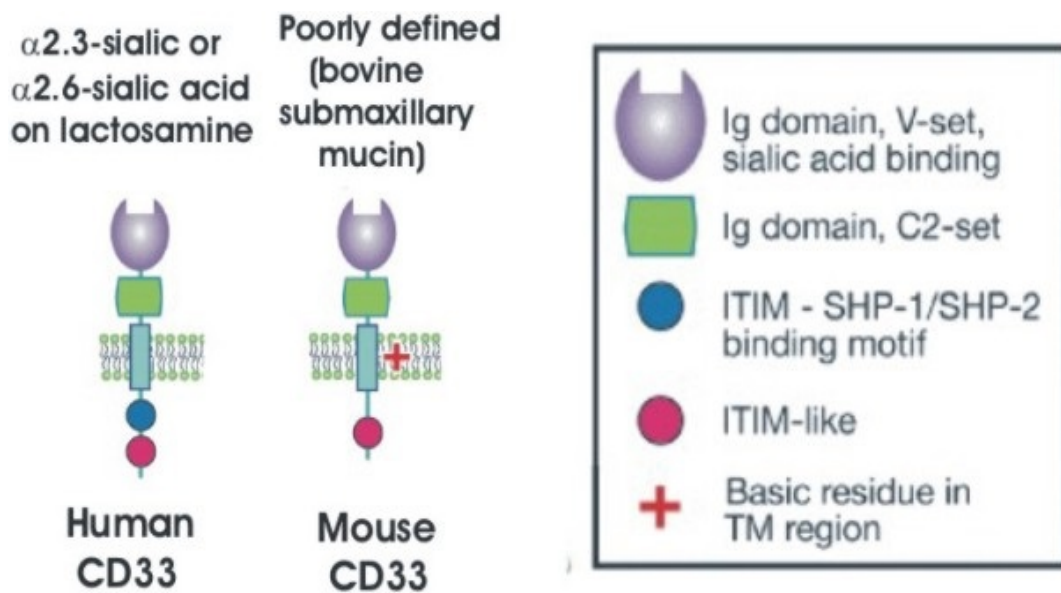


Abbildung 6: Die auffälligen Unterschiede in der Struktur von humanem und murinem CD33-Rezeptor bewirken ein unterschiedliches Bindungsverhalten bezüglich der Liganden (modifiziert nach Varki et al., 2009).

1.2.5.1 Bindungsverhalten des humanen CD33-Rezeptor

Aufgrund der strukturellen Unterschiede von humanem und murinem CD33-Rezeptor ergeben sich auch Unterschiede im Bindungsverhalten. Während humanes CD33-Rezeptor die in α 2.6-Stellung an Laktosamine gebundene Sialinsäuren gegenüber den in α 2.3-Stellung gebundenen Formen bevorzugt (Brinkmann-Van der Linden und Varki, 2000), werden diese von murinem CD33-Rezeptor nicht als Ligand erkannt. Stattdessen bindet es O-verlinkte, muzinreiche Glykane aus von Rindern isolierten *glandulae submandibulares* (Brinkmann-Van der Linden et al., 2003).

Sialinsäuren sind ubiquitärer Bestandteil der Glykokalyx. Trotzdem ist bislang relativ wenig über die Auswirkungen von Sialinsäure-Seitenkettenmodifikationen bekannt. Es wird zwischen acetylierten *N-Acetylneuraminic acid* (Neu5Ac) und glykosilierten *N-Glycolylneuraminic acid* (Neu5Gc) Sialinsäuren unterschieden, wobei die acetylierte Form beim Menschen, im Gegensatz zu allen anderen großen Säugern, aufgrund einer *loss of function* Mutation die vorherrschende ist (Chou et al., 1998). Die Auswirkungen

solcher Seitenkettenmodifikationen auf die Funktion Siglec-exprimierender Zellen sind bislang nur wenig erforscht und es existieren zum Teil widersprüchliche Forschungsergebnisse.

Es konnte anhand des Bindungsverhaltens von Fusionsproteinen aus humanem CD33-Rezeptor und dem Fc-Segment eines Immunglobulins an Lymphozyten von Menschen und Orang-Utans gezeigt werden, dass der humane CD33-Rezeptor die Bindung der acetylierten Form zu bevorzugen scheint (Brinkmann-Van der Linden et al., 2000). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ein CD33-Fc-Fusionsprotein an Muzine aus Speicheldrüsen eines Schweins bindet, was Hinweise auf eine Bevorzugung der glykosylierten Form liefert (Brinkmann-Van der Linden und Varki, 2000).

Bei der Interpretation all dieser Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass ähnlich dem Cholesterinstoffwechsel auch Sialinsäuren nicht immer *de novo* synthetisiert werden müssen, sondern auch durch die Nahrung aufgenommen, verstoffwechselt und in die körpereigene Glykokalyx eingebaut werden können. Auf diesem Weg „schleichen“ sich fremde Sialinsäuren in den Organismus ein, die das Bindungsverhalten der Siglecs beeinflussen könnten (Banda et al., 2012; Tangvoranuntakul et al., 2003).

Analog diesem Vorgang kann *in vitro* durch Hinzufügen fremder Sialinsäuren bspw. in Zellkultur-Medium die Seitenkettenmodifikation der Sialinsäuren der Glykokalyx modifiziert werden, sodass das tatsächliche Bindungsverhalten des CD33-Rezeptors nicht mehr ausreichend beurteilt werden kann. In beiden genannten Studien wurde spezie-fremdes Serum mit der jeweils anderen Seitenkettenmodifikation der Sialinsäuren verwendet. Das Studiendesign sollte also darauf ausgelegt sein, fremde Sialinsäuren nur sehr gezielt einzusetzen, was in dieser Form noch nicht erfolgte. Dies sollte in dem experimentellen Design dieser Arbeit erstmals Berücksichtigung finden.

1.3 Morbus Alzheimer

1.3.1 Generelle Einleitung

Der Morbus Alzheimer ist eine erstmals im Jahre 1907 von Alois Alzheimer beschriebene neurodegenerative Erkrankung, welche mit Gedächtnis- und Wortfindungsstörungen einhergeht. Zwei Drittel aller Demenzfälle weltweit werden als Morbus Alzheimer klassifiziert (Ott et al., 1995). In der Literatur werden Prävalenzen von einer Gesamtrate von 6,2 % von Frauen über 65 Jahren in Deutschland angegeben. Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenzrate an auf bis zu 48,9 % für die Gruppe der über 95 Jährigen Frauen (Hy und Keller, 2000).

Nach aktuellem Kenntnisstand werden zwei Unterformen des Morbus Alzheimer nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens unterschieden, wobei die seltenere und deutlich früher auftretende frühmanifeste von der signifikant häufiger und erst in höherem Alter auftretenden spätmanifesten Form unterschieden werden kann (Masuhr und Neumann, 2007). Diesen beiden Unterformen scheinen neben dem Patientenalter bei Auftreten der Erstsymptome meist jedoch auch unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde zu liegen.

Entscheidend für die Diagnose des Morbus Alzheimer ist der *post mortem* erhobene histopathologische Befund. Hierbei sind zwei Merkmale wegweisend: Neurofibrilläre Tangles (NFT) und amyloide Plaques. Beide waren in der Vergangenheit Objekt intensiver Forschung und beiden liegen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde. Beide Theorien konnten jedoch auch in Zusammenhang gebracht werden - Es gibt Hinweise, dass ein erhöhtes Tau-Protein-Level den toxischen Effekt von Amyloid β potenziert (Ittner et al., 2010)

1.3.2 Amyloide Plaques

Das „Amyloid precursor protein“ (APP) ist physiologisch ein membrangebundenes Protein, welches nach Spaltung durch die β - oder γ -Sekretase jedoch in neurotoxische Amyloid-Proteine umgewandelt werden kann, die polymerisieren und so die extrazellulär liegenden amyloiden Plaques bilden.

Ob und in welcher Form von amyloiden Plaques tatsächlich die Gefahr der Neurotoxizität ausgeht, ist Gegenstand andauernder Diskussionen. Es wird vermutet, dass es sich bei den Plaques um ungefährliche Ablagerungen von aggregierten Amyloid-Oligomeren handelt. Vielmehr sind vermutlich die Oligomere der Ursprung der Neurotoxizität (Lambert et al., 1998; Roher et al., 1996).

In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass es Personen gibt, die trotz größerer Mengen von Amyloid-Ablagerungen im Gehirn nicht an Demenz erkranken. Darüber hinaus führten Versuche einer medikamentösen Inhibition der γ -Sekretase und der künstliche Abbau bereits gebildeter Plaques zur Verschlimmerung oder wenigstens zu keiner Besserung der klinischen Symptomatik (Doody et al., 2013; Salloway et al., 2009).

1.3.3 Neurofibrilläre Tangles

NFT sind intrazelluläre Konglomerate, die durch pathologische Hyperphosphorylierung von intrazellulärem Tau-Protein mit konsekutiver Instabilität des Zytoskelettes entstehen. Sie sind Gegenstand weiterer Theorien über die Pathogenese des Morbus Alzheimer, wobei mittlerweile auch Thesen einen Zusammenhang zwischen NFT und amyloiden Plaques suggerieren (Ittner et al., 2010). NFT sind jedoch nicht Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit, weswegen sie an dieser Stelle zur Vollständigkeit nur kurz Erwähnung finden.

1.3.4 Neuropathologie des Morbus Alzheimer

Nach neuereem Kenntnisstand müssen die histopathologischen Befunde mit Forschungsergebnissen vereinbart werden, nach denen amyloide Plaques nicht pathognomisch für den Morbus Alzheimer sind. Savva *et al.* (Savva et al., 2009) untersuchten Gehirnschnitte von dementen und nicht-dementen Patienten in Bezug auf Neurodegeneration, amyloide Plaques und NFT. Dabei konnten sie im Wesentlichen zwei Populationen unterscheiden: Die jüngeren und die älteren Patienten. In der Gruppe der jüngeren Patienten unterschieden sich die Demenz und Kontroll-Patienten im mengenmäßigen Auftreten der Plaques und Tangles, während dieser Unterschied bei

den älteren Patienten nicht mehr zu finden war. Lediglich die Neurodegeneration konnte als diagnostischer Faktor bestehen. Folglich kann bei amyloiden Plaques und NFT nicht von einer alleinigen Ursache des Morbus Alzheimer ausgegangen werden, es handelt sich lediglich um den Endpunkt eines Stoffwechselweges, in dessen Verlauf eine neurotoxische Komponente mitspielt. Die Frage ist nicht, ob oder wie viele Plaques und Tangles vorliegen, sondern wie sie entstehen und wie der Körper damit umgeht.

Hier steht die differente Reaktion des Immunsystems im Vordergrund der Überlegungen, warum bei einigen Patienten Plaques und Tangles zu Morbus Alzheimer führen und bei anderen Patienten nicht. In diesem Zusammenhang stehen die Zellen des Immunsystems im Gehirn, die Mikroglia, im Vordergrund der Betrachtungen.

Des Weiteren sind bislang alle Versuche, pharmakologisch in die fragliche Pathogenese des Morbus Alzheimer einzugreifen, gescheitert. Dies betrifft Studien zu γ -Sekretase-Inhibitoren sowie sämtliche kurative Ansätze bezüglich der NFT (Doody et al., 2013; Salloway et al., 2009).

Zurzeit beschränkt sich die Therapie des Morbus Alzheimer daher im Wesentlichen auf drei zugelassene Cholinesteraseinhibitoren (Donepezil, Rivastigmin und Galanthamin) und einen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) - Rezeptor Antagonist (Memantine) (Howard et al., 2012; Jeffrey und Cummings, 2004). Hierbei handelt es sich primär um symptomatische Therapieansätze. Eine deutliche Verzögerung der Progression kann mit diesen Medikamenten jedoch nicht erzielt werden.

1.3.5 Der CD33-Rezeptor und spätmanifeste Morbus Alzheimer

Erst kürzlich wurden neue Gen-Polymorphismen identifiziert, welche mit dem spätmanifesten Morbus Alzheimer assoziiert sind (Hollingworth et al., 2011, Naj et al., 2011). Einer dieser Polymorphismen liegt im Gen für den CD33-Rezeptor, wahrscheinlich in der Promotorregion. Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle der CD33-Rezeptor bei der Pathogenese bzw. Progredienz des Morbus Alzheimer spielen kann und welche Zellen ihn exprimieren.

Da Mikroglia Abkömmlinge der myeloiden Linie darstellen, für welche der CD33-Rezeptor als Marker gilt (s.o.), liegt es nahe davon auszugehen, dass Mikroglia die

CD33-exprimierende Population im ZNS darstellen. Dies konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Angaben über die Pathogenese sind bislang rein spekulativ, es gibt jedoch naheliegende Pathomechanismen welche unter Berücksichtigung der mikroglialen Funktionen im ZNS in Betracht zu ziehen sind. Vorerst ist nicht klar von welcher Qualität die im CD33-Gen nachgewiesene Mutation ist. Somit könnte es sich sowohl um eine Hoch-, als auch um eine Herab-Regulation handeln. Konsekutiv könnte somit Einfluss auf sämtliche Funktionen der Mikroglia genommen werden:

- Phagozytose: Mikroglia sind die phagozytierenden Zellen im ZNS, eine Beeinflussung der Phagozytosekapazität könnte bei Inhibition somit bspw. zur Akkumulation vom Amyloid- β oder bei Aktivierung zur Zersetzung von amyloiden Plaques zu neurotoxischen β -Amyloid Monomeren führen.
- Inflammation: Durch Einflussnahme auf die mikrogliale inflammatorische Antwort könnten Entzündungen des ZNS eine inadäquate Reaktion hervorrufen, was letztlich neurotoxische Folgen nach sich ziehen würde.
- Abwehr: Durch Alternation der mikroglialen Abwehrmechanismen könnte es zu einer Autoaggressivität im Sinne einer Überreaktion oder aber zu einer ausbleibenden Antwort auf entsprechende Reize kommen. In diesem Sinne wäre auch eine direkte Mikroglia-Neuron-Interaktion denkbar.

1.4 Ziel der Arbeit

Dem CD33-Rezeptor kommt bei der Pathogenese des Morbus Alzheimer eine besondere Rolle zu, da im Gegensatz zu anderen Risikogenen nicht nur krankheitsassoziierte, sondern auch protektive Polymorphismen beschrieben sind. Es scheint sich bei CD33 folglich um einen Rezeptor mit regulativer Funktion zu handeln.

Ziel der Arbeit war auch mögliche Funktionen des CD33-Rezeptors zu untersuchen, um seine mögliche Rolle bei der Pathogenese und Progredienz des Morbus Alzheimer näher definieren zu können. Darüber hinaus sollten CD33-Expressionsanalysen einen möglichen Zusammenhang zwischen Mikroglia und Morbus Alzheimer aufklären.

Bei den *in vitro* Experimenten sollte erstmals auch ein Umfeld ohne Xeno-Sialinsäuren geschaffen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Chemicon Europe, Hofheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ddH ₂ O	Selbst gefiltert und autoklaviert
D-(+)-Glukose Lösung (45 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's modified eagles medium (DMEM)/F12 (1:1) mit L-Glutamin und 15 mM HEPES	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM mit L-Glutamin, m/o Natrium Pyruvat, mit 4.5 g/l D-Glukose	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Fetal calf serum</i>	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll Plaque Plus	GE Health Care, Little Chalfont, UK
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Knockout Serum replacement</i>	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mowiol 4-88	Kremer Pigmente, Aichstetten, Deutschland
<i>Non-essential amino acids</i> (10 mM)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Natrium Pyruvat (100 mM)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N2 Zusatz (100x)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Normal goat serum</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sialidase (Neuraminidase) 100 U/mg	Roche, Basel, Schweiz
TritonX	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin (0.25 %)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Wachstumsfaktoren und Zytokine

<i>Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> (GM-CSF)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Recombinant human macrophage colony stimulating factor</i> (M-CSF)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Recombinant human Interleukin-3</i> (IL-3)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Recombinant human Interleukin-4</i> (IL-4)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Recombinant human Interferon-γ</i> (INF- γ)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

2.1.3 Puffer und Lösungen

0.01 M Natrium Zitrat Puffer, pH 6	5.88 g Tri-Natrium Zitrat(dihydrat) pH Einstellung mit 1 M HCl 1 ml Tween 20 <i>ad 2 l aqua bidest.</i>
------------------------------------	--

4 % Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd in 100 ml 1x PBS
10x Bovines Serum Albumin	10 g BSA in 100 ml 1 x PBS
10x Tris-Borat-EDTA-Puffer	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0.5 EDTA <i>ad 1 l aqua bidest.</i>
EDTA	46.53 g EDTA 170 ml aqua bidest. pH Einstellen auf 8.5 mit 5 M NaOH <i>ad 250 ml aqua bidest.</i>
Mowiol	4.8 g Mowiol 4-88 12 g Glycerol 24 ml 0.2 mM Tris Puffer, pH 8.5 1.32 g 1,4-Diazobicyclo-(2.2.2)octan 12 ml <i>aqua bidest.</i>
0.2 mM Tris Puffer, pH 8.5	24.765 g in 150 ml <i>aqua bidest.</i> pH 8.5 einstellen
Poly-L-Lysine (5 µg/ml)	5 µg Poly-Lysin gelöst in 1 ml <i>aqua bidest.</i>
Poly-L-Ornithin (0.01 mg/ml)	9.2745 g Borsäure <i>ad 1l aqua bidest.</i> 100 mg Poly-L-Ornithin
Saccharose, 30 %	30 % Saccharose 0.1 % Natrium Azid <i>ad 500 ml PBS</i>

2.1.4 Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.5 Zellkulturmedium

N2-Medium

DMEM/F12 (1:1) mit L-Glutamin mit HEPES (15 mM)
 1 % N2 Zusatz
 0.5 mM L-Glutamin
 5.3 µg/ml D-Glukose
 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

Gefrier Medium

50 % *Knockout-Serum replacement*
 40 % Medium
 10 % Dimethyl Sulfoxid (DMSO)

2.1.6 Primer

GAPDH_vorwärts 5'-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG-3'
 GAPDH_rückwärts 5'-TTC AGC TCA GGG ATG ACC TT-3'
 CD33_vorwärts 5'-GCTGTGGGCAGGGGCCCT-3'
 CD33_rückwärts 5'- TGGCTCCTTCCCGGAACCAGT-3'

2.1.7 Primär-Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Reaktivität</u>	<u>Wirt</u>	<u>Firma</u>
CD11b	Maus, Mensch	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD33	Mensch	Maus	Abcam, Cambridge, UK
CD33	Mensch	Kaninchen	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
CD45	Mensch, Maus	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD68	Maus	Ratte	AbD Serotec, Oxford, UK
Iba1	Mensch, Maus	Kaninchen	Wako, Höchststadt, Deutschland

2.1.8 Zusätzliche Hilfsmittel für Färbungen

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Sigma Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim, Deutschland

2.1.9 Sekundär-Antikörper

<u>Fluorophor</u>	<u>Reaktivität</u>	<u>Wirt</u>	<u>Firma</u>
Phycoerythrin (PE)	Maus	Ziege	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Phycoerythrin	Ratte	Ziege	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Alexa488	Kaninchen	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cyanin 3 (Cy3)	Ratte	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy3	Maus	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	Maus	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.10 Isotypen-Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Firma</u>
IgG1 κ Maus	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
IgG2a κ Ratte	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.11 Verbrauchsmaterial

6-well Tissue Culture Plate	Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
8.0 μ m Culture Plate Inserts 12 mm Durchmesser	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Cell Scraper	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Cell strainer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Cryovials (2 ml)	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland
Tissue Tek, Disposable Vinyl Specimen Molds	Sciences Services GmbH, München, Deutschland
Falcon tubes (15 ml)	Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Falcon tubes (50 ml)	Sarstedt Ag & CoKG, Nümbrecht, Deutschland
Filtropur (0.25 µm, 0.4 µm)	Sarstedt Ag & CoKG, Nümbrecht, Deutschland
Graduate pipette Tipps (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Lab-Tek Chamber Slide mit Deckel Permanox Slide Sterile 4 Well	Labomedic, Bonn, Deutschland
Mikroskop Deckgläser	P. Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitril Handschuhe	Ansell Healthcare Europe NV, Brussels, Belgien
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Safe-seal micro tubes (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt Ag & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen (5 ml, 10 ml)	Omnifix, Braun Meisungen AG, Meisungen, Deutschland
Vacuum driven disposable bottle top filter	Millipore Corporation, Bitterica, MA, USA

2.1.12 Technische Ausrüstung

- 20°C Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
+ 4°C Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
BD FacsCalibur	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Cell Matell (pipette boy)	Thermo Fisher Scientific Inc., Hudson, NH, USA
Eppendorf Mastercycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hera cell 150 (Incubator)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Hera freeze (- 80°C Kühlschrank)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Hera safe (laminar-air flow workbench)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Megafuge1.0R (Zentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Axiovert200M	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Fluoview1000 Konfokal Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Systec D-150 (autoclave)	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wasserbad WB/OB7-45	Memmert GmbH & CoKG, Schwabach, Deutschland

2.1.13 Software

Cell Quest	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Flow Jo	Tree Star, Ashland, OR, USA
Fluo View F1000	Olympus, Hamburg, Deutschland
Image-J	National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
Olympus FluoView1.4	Olympus, Hamburg, Deutschland
SPSS	IBM, Armonk, NY, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur von iPSdM-Mikroglialinien

Alle iPSdM-Mikroglialinien wurden in N2-Medium bei 37°C und 5 % CO₂ auf 10 cm Kulturschalen in Kultur gehalten. Bei Erreichen einer ca. 90 %igen Zelldichte wurden die Zellen mit 0,25 % Trypsin für 5 min von der Kulturschale gelöst. Daraufhin wurde die Zellsuspension in Medium überführt, bei 1300 Umdrehungen/min für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium gelöst und die Zellen im Verhältnis zwischen 1:5 und 1:10 auf frischen Kulturschalen ausgesät.

Um iPSdM-Zellen einzufrieren, wurden sie in Gefriermedium (10 % DMSO, 50 % KO-SR, 40 % N2 Medium) gelöst und graduell auf -80°C heruntergekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.2 Nachweis der Gen-Transkription

Zur Analyse der Gen-Transkription wurden ca. 200.000 iPSdM-Zellen ausgezählt, auf 6cm-Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag für 24 Stunden mit LPS (1000 ng/ml), IFN γ (1000 U/ml), IL-4 (20 ng/ml), Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) (100 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml) oder M-CSF (10 ng/ml) stimuliert. Unstimulierte

Zellen dienten als Kontrolle. Die *ribonucleic acid* (RNA) wurde mithilfe eines RNeasy Mini Kit nach Anleitung extrahiert, die RNA-Konzentration bestimmt und eine Reverse Transkriptase-*Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) mit 11 µg RNA-Ansatz nach Protokoll mit dem „SuperScript First-Strand Synthesis System“ von Invitrogen durchgeführt.

Die Konzentration der *complementary desoxyribonucleic acid* (cDNA) wurde am Nano-Drop gemessen und die Ansätze auf 200ng/µl verdünnt.

Zum Nachweis des CD33-Rezeptors wurden die passenden „vorwärts-“ und „rückwärts-“ Primer zu je 2 µl (10 pmol/µl) mit in einem Mix aus 6 µl (1200 ng) cDNA, 5 µl 10xPCR-Puffer (+Mg), 2 µl (10 mM) desoxy-Nukleotid-Triphosphat (dNTP) und 0,2 µl Taq Polymerase in 32,8 µl ddH₂O unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

Deckeltemperatur	105°C		
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierungs-Schritt	90°C	1:30 min	} 40x
<i>Annealing</i> -Schritt	60°C	1 min	
<i>Elongation</i> -Schritt	72°C	1 min	

Das PCR-Produkt wurde in einem 1,5-fachen Agarose Gel bei 120 V und 110 mA mit einer 100 Basenpaar-Leiter aufgetrennt und analysiert.

2.2.3 Gelextraktion

Die Gelextraktion von PCR-Banden aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Quiagens MinElute Gel Extraction Kit nach beiliegendem Protokoll. Das Produkt wurde von SeqLab sequenziert.

2.2.4 Ficoll-Gradient zur Gewinnung von Leukozyten

Zunächst wurden 10 ml einer Eigen-Vollblutspende von 10 ml in EDTA im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Anschließend wurde die Lösung in einem 50 ml-Röhrchen vorsichtig auf 25 ml Ficoll überschichtet. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 80 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute und 20°C bei gelöster Bremse. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Leukozyten aus der mittleren Phase in 35 ml PBS überführt und erneut unter gleichen Bedingungen für 15 Minuten zentrifugiert. Die so gewonnenen Leukozyten wurden entsprechend dem Protokoll für Durchflusszytometrie behandelt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die adhärenen Zellen wurden dreimal zum Waschen mit 3-5 ml PBS beschichtet, geschwenkt, das PBS wieder entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 2-4 ml PBS gelöst und in 1,5 ml Eppendorf-Behälter transferiert. Bei der optionalen Sialidase-Behandlung wurden die Zellen anstelle von PBS mit N2-Medium gewaschen und darin unter Zugabe von Sialidase (1:400) für 2,5 Stunden bei 36°C unter Schütteln inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden für eine Stunde auf Eis mit Primärantikörper gegen CD33 (Klon WM53 1:200) oder der passenden Isotypen Maus-IgG (1:100) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln mit PE-konjugiertem Sekundärantikörper (2.5 µg/ml) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen waschen mit PBS wurde das Pellet in 300 µl PBS gelöst und das Antikörpersignal per Durchflusszytometrie gemessen und analysiert.

2.2.6 Immunozytochemie von iPSdM-Mikroglialinien

24 Stunden vor der Färbung wurden ca. 30.000 Zellen auf Kammer-Zellkultur-Trägern ausgesät. Vor der Immunozytochemie wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA für 10 min fixiert.

Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit einer Lösung aus 10 % BSA, 5 % *normal goat serum* (NGS) und 0,1 % Triton-X für eine Stunde lang geblockt.

Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper gegen CD33 (1:200) und *Ionized calcium binding adaptor molecule-1* (Iba-1) (1 µg/ml) inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für zwei Stunden im Dunkeln mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen (4 µg/ml) und Cy-3 Ziege-anti-Maus (2.5 µg/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde abschließend für 30 Sekunden in DAPI (0.1 µg/ml) inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zur weiteren Analyse wurden die Objektträger mit Mowiol und Deckgläschen eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

2.2.7 Immunohistochemie von Hirnschnitten

Es wurden Paraffin-Schnitte aus Gehirnen von Alzheimer Patienten und einer Kontrollgruppe in 7 µm Dicke verwendet. Das verwendete Hirngewebe wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dietmar R. Thal, Professor für Neuropathologie an der Universität Ulm, zur Verfügung gestellt und stammt aus der Hirnbank Ulm, die gemäß Ethik-Votum Nr. 54/08 Gewebe asserviert und Gewebeschnitte für wissenschaftliche Forschungszwecke weitervergift. Zur Vorbehandlung wurden die paraffinierten Schnitte dreimal für drei Minuten in Xylol deparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte für je zwei Minuten zweimal in 100 % Ethanol, zweimal in 95 % Ethanol, einmal in 70 % Ethanol und schließlich 1 Minute in Wasser inkubiert.

Daraufhin wurden die Schnitte in einem Dampfkocher per Mikrowelle in Zitrat-Puffer (2,94 g/l, pH 6,0) für ca. 10 Minuten aufgekocht, der Dampfkocher anschließend unter fließendem, kaltem Wasser abgekühlt und die Schnitte im Zitrat-Puffer liegend für 20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden sie zweimal mit Wasser abgespült und dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen.

Die Schnitte wurden mit 10 % NGS in PBS geblockt und anschließend mit dem ersten Primärantikörper Kaninchen-anti-humanes-CD33 (1:1000) in 0,5 % NGS über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörperkontrolle wurde ein Schnitt ohne Primärantikörper in PBS inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte erneut dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, und mit dem ersten Sekundärantikörper Cy-3-konjugierter Ziege-anti-Hase (*fragment antigen binding* (Fab) - Fragment) im Verhältnis 1:1000 in 0,5 % NGS für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte im zweiten Primärantikörper Ratte-anti-Maus-CD68 im Verhältnis 1:1000 unter gleichen Bedingungen wie der erste Primärantikörper über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde nach einem Waschschrift der zweite Sekundärantikörper FITC-Ziege-anti-Maus im Verhältnis 1:500 für 1 Stunde in 0,5 % NGS bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben, erneut gewaschen und der Objektträger mit Mowiol und Deckglas versehen. Die Schnitte wurden bis zur Analyse am Konfokal-Mikroskop bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.8 Auswertung der Immunohistochemie

Bei der Auswertung der Hirnschnitte wurden zunächst die Sekundärantikörper-Kontrollen mikroskopiert und der Schwellenwert so hoch gesetzt, dass möglichst wenig Cy-3 Signal detektiert wird. Somit wurde das Signal unspezifischer Bindungen ausgeblendet. Mit denselben Einstellungen wurden nun Aufnahmen der CD33-CD68 Färbungen von Alzheimer- und Kontroll-Patienten angefertigt.

Zur weiteren Analyse wurde die Fluoreszenz der Bilder am Computer mit Image-J Software gemessen, indem manuell eine Maske um die CD68-positiven Zellen gelegt und deren Intensität der CD33-Färbung gemessen wurde. Hiervon wurde die Intensität der Hintergrund-Fluoreszenz abgezogen und die Ergebnisse graphisch ausgewertet. Die Fluoreszenz der Kontrollpatienten wurde gleich eins gesetzt und die Fluoreszenz-Intensität der Alzheimer-Patienten im Verhältnis dazu angegeben. Es wurden für die Alzheimer- und Kontroll-Patientenpaare 1-5 jeweils 5 Bilder verschiedener Regionen eines Hirnschnitts ausgewertet. Für das Patientenpaar 6 wurden qualitätsbedingt vier Bilder des Kontroll-Patienten und drei Bilder des Alzheimer-Patienten eines Hirnschnitts ausgewertet. Die abweichenden Werte wurden in die Berechnungen mit einbezogen.

2.2.9 Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit vorliegenden statistischen Daten sind mit dem Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Student-t-Test für zwei Gruppen mit SPSS Software. Die Signifikanzintervalle betragen:

*** $p < 0,001$

** $p < 0,01$

* $p < 0,05$

n.s. $p > 0,05$

2.3 Förderung

Dieses Projekt wurde aus BONFOR-Fördermitteln finanziert.

3. Ergebnisse

Als für die CD33-Expression in Frage kommende Zellpopulation wurden im Rahmen der Arbeit die Mikroglia untersucht. Da der CD33-Rezeptor spezieübergreifend wesentliche Unterschiede sowohl in Struktur als auch in Funktion aufweist, kam die Verwendung von murinen Mikroglia nicht in Frage. Da die *in vivo* Untersuchung von humanen Mikroglia ebenfalls keine praktikable Alternative darstellt, wurde im weiteren Verlauf für *in vitro* Studien auf Mikroglia aus induzierten pluripotenten Stammzellen zurückgegriffen.

3.1 Nachweis der Transkription des CD33-Rezeptors in iPSdM-Mikroglialinien unter verschiedenen Stimulations-Bedingungen mittels PCR

Zunächst wurde die Transkription des *cd33*-Gens in iPSdM nachgewiesen. Hierzu wurde *messenger ribonucleic acid* (mRNA) aus iPSdM isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA übersetzt. Mithilfe dieser cDNA wurde dann mit entsprechenden Primern mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) die Transkription des *cd33*-Gens *in vitro* nachgewiesen (siehe Abbildung 7). Für die Detektion von CD33-cDNA wurde der vorwärts-Primer „GCTGTGGGCAGGGCCCT“ und ein rückwärts-Primer mit der Sequenz „TGGCTCCTCCCGGAACCAGT“ verwendet.

Zusätzlich sollte das Transkriptionslevel unter Stimulation mit verschiedenen Zytokinen untersucht werden, um Rückschlüsse auf Modifikationsmöglichkeiten des Immunsystems und die immunologische Funktion des Rezeptors ziehen zu können. Hierzu wurde zusätzlich zu cDNA aus unstimulierten Zellen auch eine Stimulation mit:

- Lipopolysaccharid (LPS)
- Interferon- γ (IFN- γ)
- Interleukin-4 (IL-4)
- Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α)
- *Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)
- Interleukin-3 (IL-3)
- *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)

für 24 Stunden in Kultur vorgenommen, bevor die Transkriptionsrate von *cd33* unter den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen analysiert wurde.

Um die Intensität der PCR-Banden auszuwerten, wurde für alle Proben zusätzlich eine PCR mit einem Primerpaar gegen das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen (*gapdh*) angefertigt. Als Kontrollen wurde neben mehrfach destilliertem Wasser als Leerkontrolle auch cDNA aus THP-1 Zellen als Positivkontrolle mit nachgewiesener *cd33* Transkription verwendet. Als Marker wurde eine 100 Basenpaar-Leiter gewählt, die gezeigte Referenz-Bande in Abbildung 7 markiert ein 200 Basenpaare großes Produkt, das PCR-Produkt der *cd33*-Pirmer liegt also bei 170 Basenpaaren.

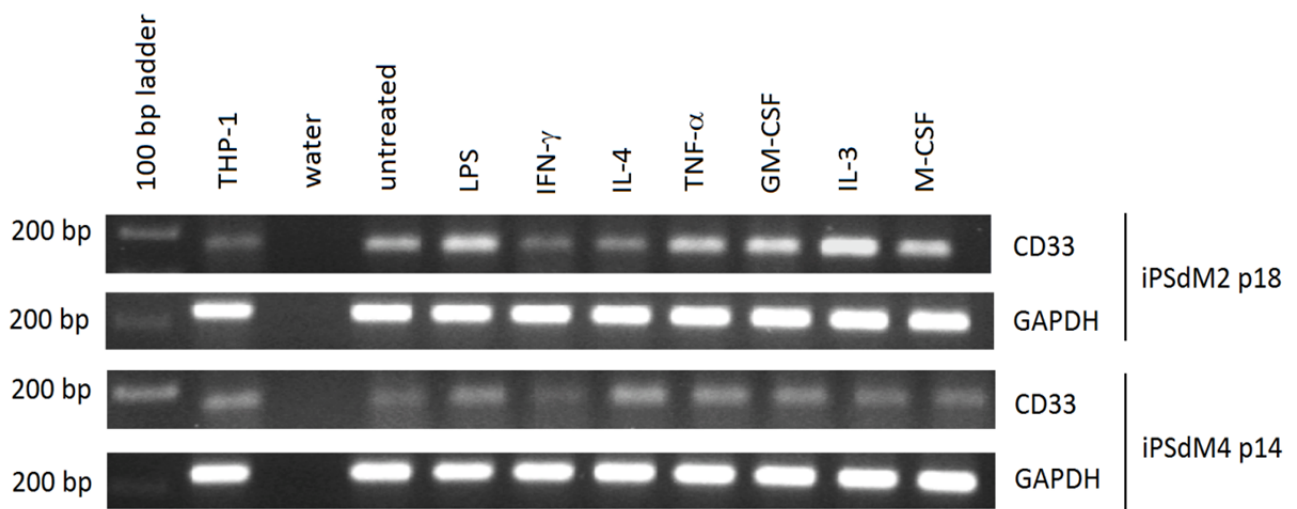


Abbildung 7: Nach Isolation von mRNA aus induced pluripotent stem cell derived microglia (iPSdM) wurde diese in cDNA übersetzt und mittels PCR auf die Transkription des *cd33* Gens untersucht. Als Kontrollen wurden THP-1 cDNA (Positivkontrolle) und Wasser (Negativkontrolle) verwendet. Als Intensitätskontrolle wurde für die Proben zusätzlich eine PCR mit einem Primerpaar gegen *gapdh* durchgeführt. Als Marker wurde eine 100 Basenpaar-Leiter verwendet, die gezeigte Bande markiert 200 Basenpaare, das PCR Produkt der *cd33*-PCR liegt daher bei 170 Basenpaaren. Die Abbildung zeigt Banden für beide analysierten iPSdM-Mikroglialinien und Unterschiede in der Intensität der Banden zwischen den verschiedenen Stimulationsbedingungen. LPS und IL-3 steigern *in vitro* die Transkriptionsrate des *cd33* Gens.

Die Auswertung der PCR (siehe Abbildung 7) zeigt erstens, dass das *cd33*-Gen auf beiden gezeigten iPSdM-Mikroglialinien transkribiert wird und zweitens Unterschiede in der Intensität der Banden zwischen den verschiedenen gezeigten Stimulationen vorhanden sind.

Eine Stimulation mit LPS und IL-3 zieht hier eine erhöhte Transkriptionsrate des *cd33*-Gens nach sich.

3.2 Qualitativer Protein-Nachweis von CD33 *in vitro* auf iPScM-Mikroglialinien mittels Immunocytochemie

Um zusätzlich zu der Transkription auch einen Nachweis für die Translation, bzw. die Expression eines funktionsfähigen Proteins auf der Zelloberfläche zu liefern, wurde auf zwei verschiedene Verfahren zurückgegriffen. Zunächst sollte mittels Immunocytochemie und anschließender Konfokalmikroskopie der Nachweis des CD33-Rezeptors auf der Zelloberfläche visualisiert werden. Anschließend sollten die Ergebnisse mittels Durchflusszytometrie bestätigt und quantifiziert werden.

Hierzu wurden auf Objektträgern ausgesäte iPScM mit den Primär-Antikörpern gegen CD33 und Iba-1 als Mikroglia-Marker inkubiert. Der CD33-Rezeptor wurde Cy-3 markiert (rot) und Iba-1 mit Alexa Fluor 488-markiert (grün). Die Ergebnisse der Färbung sind in Abbildung 8 gezeigt.

Die CD33-Färbung (rot) zeigt die Expression des CD33-Rezeptors und seiner Verteilung auf der Zelloberfläche. Es konnte nun also neben der Transkription des *cd33*-Gens auch die Expression des Proteins auf humanen Mikroglia *in vitro* gezeigt werden.

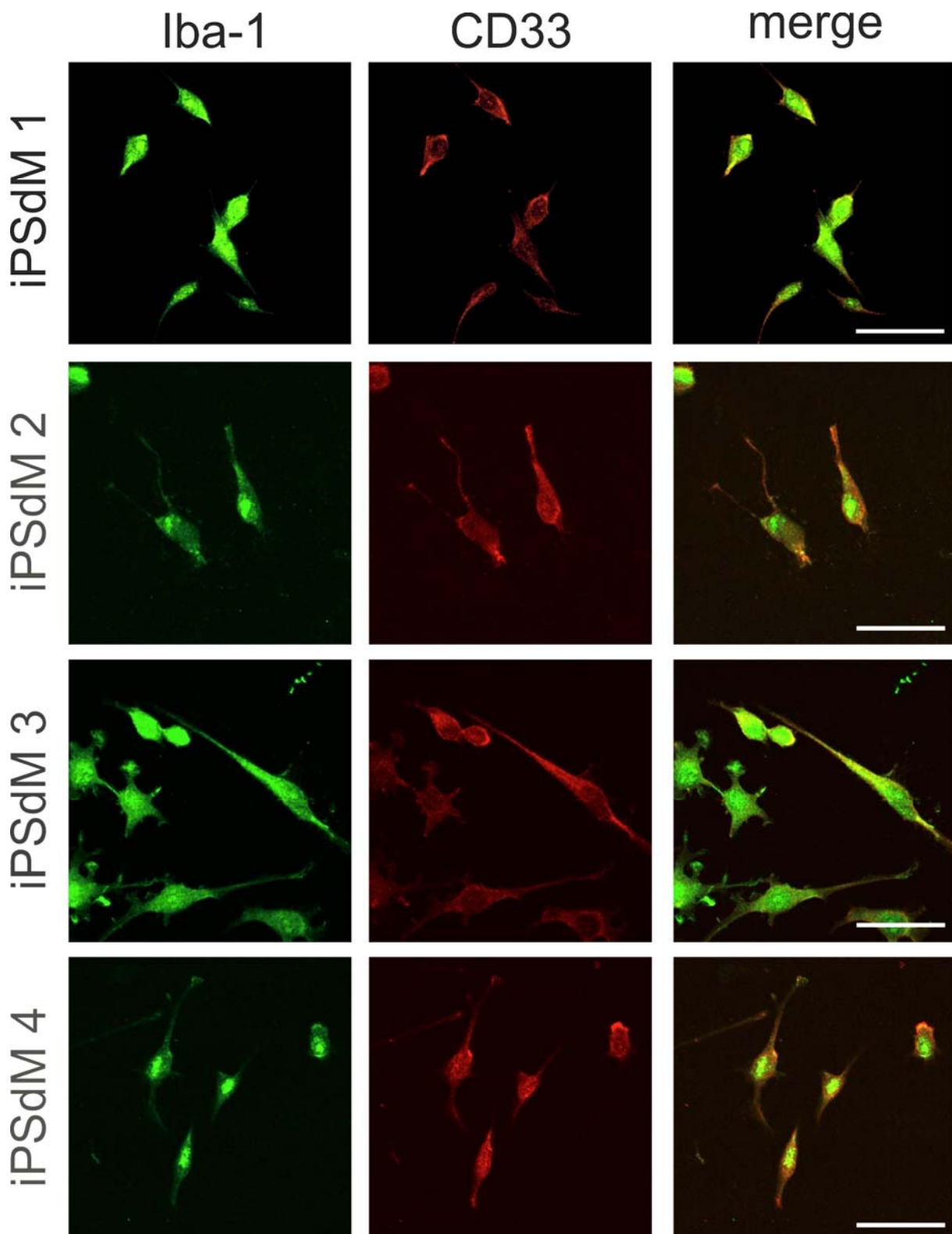


Abbildung 8: Immunocytochemie von iPSdM 1-4. Iba-1 wurde als Mikroglia-Marker verwendet. Die CD33-Färbung zeigt eine Expression auf allen vier iPSdM-Mikroglialinien. Maßstab: 50 μ m.

3.3 Qualitativer Protein-Nachweis von CD33 *in vitro* auf iPScM-Mikroglialinien mittels Durchflusszytometrie

Da immunozytochemisch der Nachweis des CD33-Rezeptors auf humanen Mikroglia *in vitro* erbracht werden konnte, sollten diese Ergebnisse nun mittels Durchflusszytometrie bestätigt und quantifiziert werden.

Vorher wurde der verwendete CD33-Antikörper mittels einer Positivkontrolle aus humanen Leukozyten auf seine Funktionalität überprüft. Hierzu wurde eine Vollblutspende durch einen Ficoll-Gradienten aufgetrennt und so die Leukozyten isoliert. Die Zellen wurden gegen CD33, bzw. mit einer Isotypen-Kontrolle inkubiert, mittels PE-Sekundärantikörper markiert und wie in Abbildung 9 gezeigt durchfluss-zytometrisch analysiert.

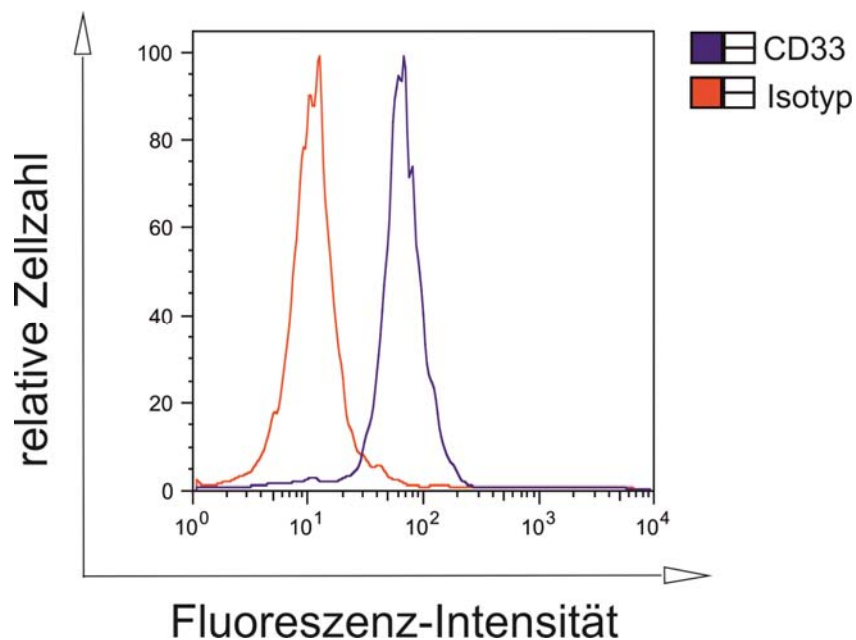


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt eine repräsentative durchflusszytometrische Auswertung einer Färbung von humanen Leukozyten als Positivkontrolle gegen CD33 (in blau dargestellt) und die entsprechende Isotypen-Kontrolle (in rot dargestellt) als Histogramm. Die humanen Leukozyten wurden aus Spender-Vollblut über einen Ficoll-Gradienten isoliert und gegen CD33 gefärbt. Die deutliche Verlagerung der beiden Peaks zueinander zeigt eine klare Expression des CD33-Rezeptors auf der Zelloberfläche der Leukozyten an.

Die Abbildung 9 zeigt eine eindeutige Verlagerung des CD33-Peaks (in blau dargestellt) gegenüber dem Isotypen-Peak (in rot dargestellt). Das Ergebnis zeigt, dass die isolierte Leukozytenpopulation CD33 auf der Oberfläche exprimiert und dass der verwendete Primär-Antikörper gegen CD33 funktionell ist.

Analog zu der gezeigten Immunocytochemie von CD33 wurden auch bei der Durchflusszytometrie die iPSdM als Mikroglia identifiziert. Hierzu wurden iPSdM 1 von der Kulturplatte gelöst und jeweils einmal mit einem Primär-Antikörper gegen CD11b und gegen CD45 als Mikroglia-Marker, bzw. einem entsprechenden Isotypen-Antikörper und mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper gefärbt.

Abbildung 10 zeigt die durchflusszytometrische Auswertung der so markierten iPSdM-Mikroglialinie 1. Der deutliche Shift der beiden Peaks zueinander zeigt eine Expression dieser Mikroglia-Marker auf der Zelloberfläche der untersuchten iPSdM an und identifiziert diese als Mikroglia.

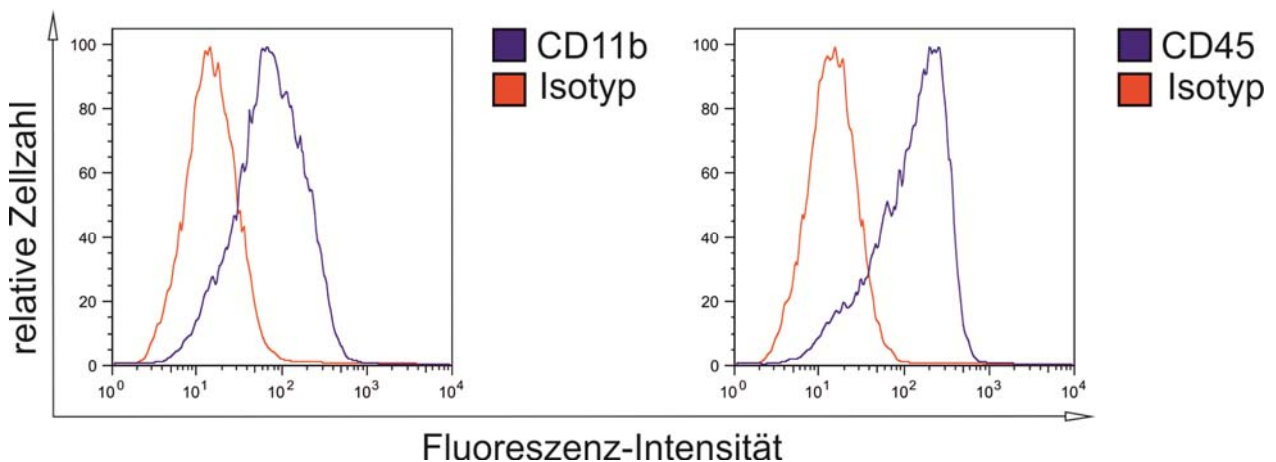


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt eine Durchflusszytometrie von iPSdM 1 als Histogramm. Die Zellen wurden mit einem Primärantikörper gegen CD11b, bzw. gegen CD45 (beide in blau dargestellt) und einer entsprechenden Isotypen-Kontrolle (in rot dargestellt) gefärbt. Der deutliche Shift der beiden Peaks zueinander zeigt eine Expression dieser als Marker mikroglialer Zellen verwendeten Proteine auf der Zelloberfläche an.

Mit dem an der Positivkontrolle getesteten Primär-Antikörper gegen CD33 wurde der Nachweis des CD33-Rezeptors auf der Zelloberfläche von iPSdM 1, 2, 3 und 4 erbracht.

Hierzu wurden die iPsdM-Mikrogliallinien analog zu der CD11b- und CD45-Färbung mit dem CD33-Antikörper bzw. einer entsprechenden Isotypen-Kontrolle gefärbt und anschließend mit einem fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Abbildung 11 zeigt die durchflusszytometrische Auswertung der beschriebenen Färbung.

Die durchflusszytometrische Auswertung der Färbung (siehe Abbildung 11) zeigt, dass alle vier untersuchten iPsdM-Mikrogliallinien den CD33-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

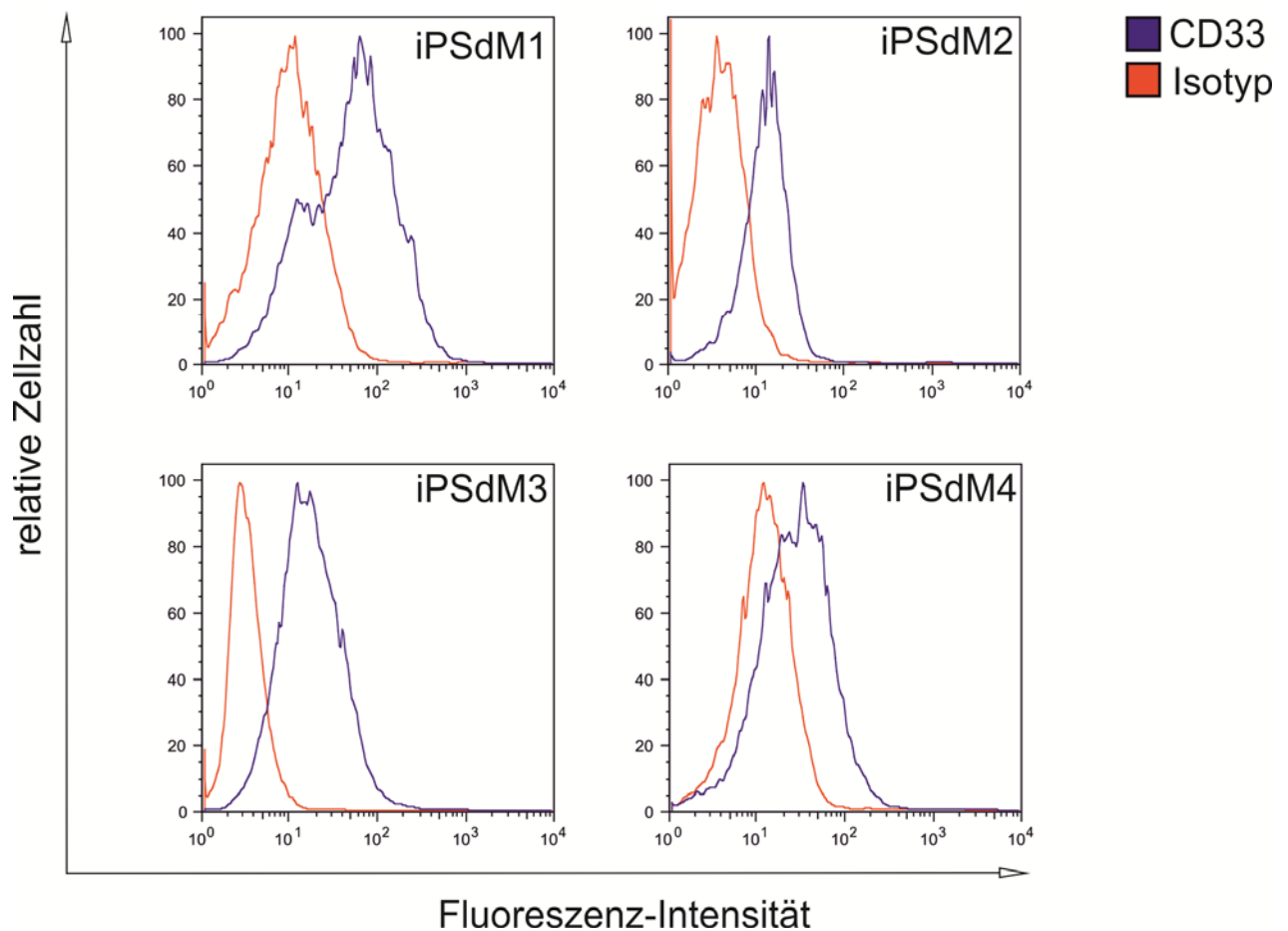


Abbildung 11: Gezeigt ist die Auswertung einer Durchflusszytometrie von iPsdM 1 bis 4 als Histogramm. Die Zellen wurden mit einem Primärantikörper gegen CD33 (in blau dargestellt) bzw. einer entsprechenden Isotypen-Kontrolle (in rot dargestellt) inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper markiert. Das stärkere Fluoreszenz-Signal gegenüber der Isotypen-Kontrolle weist die CD33-Expression nach. Alle analysierten Zelllinien iPsdM 1 bis 4 exprimieren den CD33-Rezeptor auf ihrer Oberfläche.

3.4 Quantitativer Protein-Nachweis von CD33 *in vitro* auf iPSdM-Mikroglialinien mittels Durchflusszytometrie

Nachdem die Mikroglia *in vitro* als CD33-exprimierende Population im ZNS identifiziert wurden, sollte evaluiert werden, ob eine Funktionslosigkeit des Proteins oder eine alterierende Expression durch Mutationen in der Promotorregion Einfluss auf die Pathogenese von Morbus Alzheimer nehmen.

Hierzu liefert eine quantitative Analyse von CD33 auf iPSdM *in vitro* erste Anhaltspunkte. Da CD33 als membrangebundener Rezeptor von Sialinsäuren der zelleigenen und zellfremden Glykokalyx umgeben ist, kann davon ausgegangen werden, dass entsprechende Liganden in der Glykokalyx in *cis*- oder *trans*-Position an CD33 binden, es somit blockieren und folglich für Antikörperdetektion maskieren können.

Bei konstanter Expression von CD33 auf der Zelloberfläche kann in Abhängigkeit von der Menge blockierender, zelleigener CD33-Liganden ein unterschiedliches Aktivitätsmuster resultieren.

Um diese These zu belegen, wurde eine quantitative Analyse des CD33-Rezeptors auf der Zelloberfläche *in vitro* unter Normalbedingungen und nach Sialidase-Behandlung durchgeführt. Sialidasen spalten Sialinsäuren in der Glykokalyx ab und sollen so das blockierte CD33 für die Antikörper-Detektion demaskieren.

Vor der Färbung gegen CD33 wurden durch eine Sialidase-Behandlung die Sialinsäuren der Glykokalyx abgespalten.

Abbildung 12 A und 12 B zeigen die durchflusszytometrische Auswertung des Experiments mit iPSdM 1 bis 4. Dargestellt ist die Zellpopulation als quantitative Auswertung für zwei verschiedene Konditionen. Abbildung 12 A zeigt die CD33-Expression unter Kontrollbedingungen für iPSdM 1 bis 4 ohne Sialidase-Behandlung, Abbildung 12 B zeigt die Ergebnisse nach Sialidase-Behandlung für 2 ½ Stunden bei 36°C. Die jeweils erste Zeile zeigt die Isotypen-Kontrolle, die jeweils zweite Zeile die entsprechende CD33-Färbung. Die angegebenen Werte entsprechen der relativen Anzahl der Zellen, deren Fluoreszenz oberhalb des Schwellenwertes liegen.

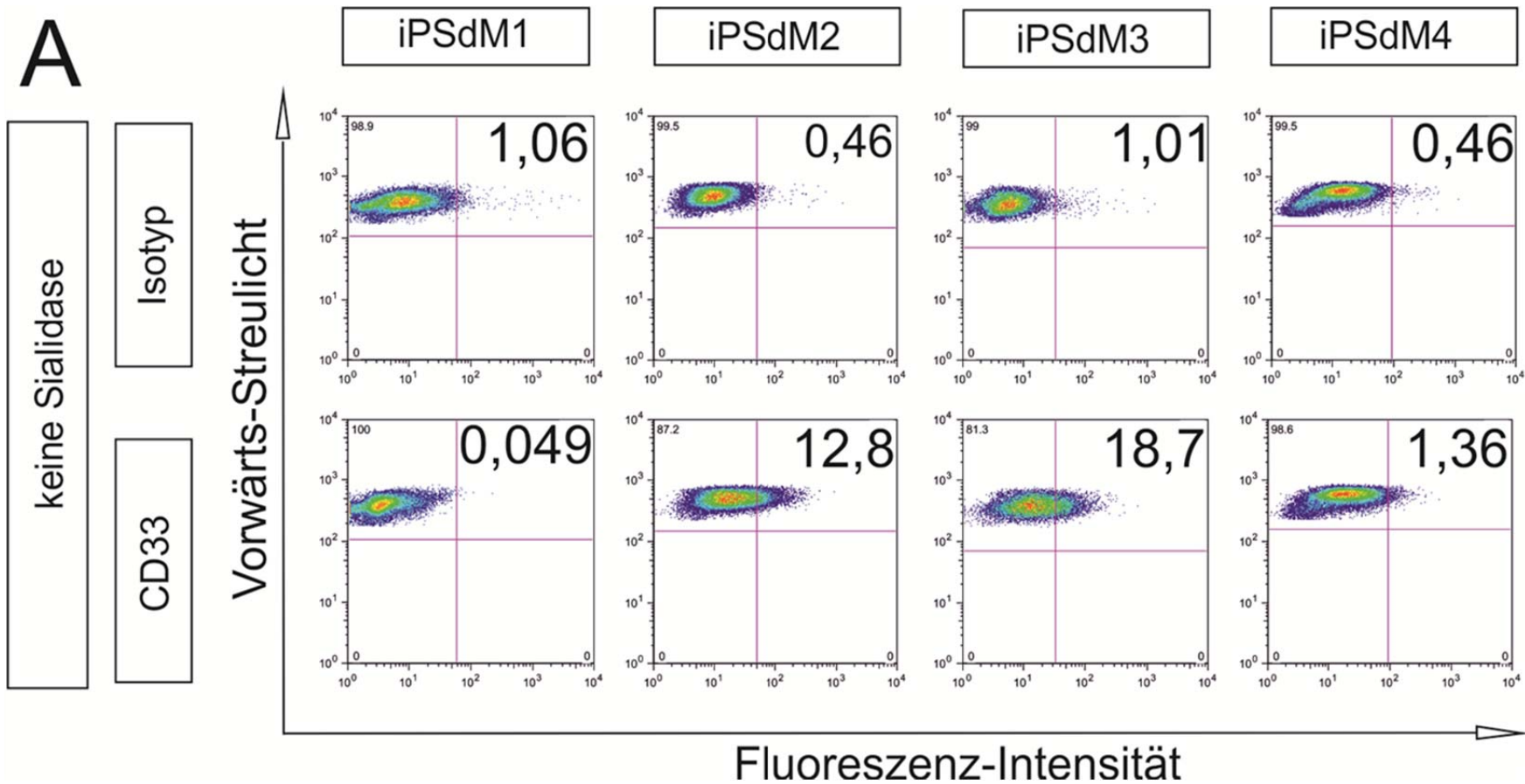


Abbildung 12 A: Die Abbildung zeigt die CD33-Expression auf der Oberfläche von iPSdM 1-4 als quantifizierbare Darstellung der Zellpopulation in der Durchflusszytometrie. Die erste Zeile zeigt die Auswertung der Isotypenkontrolle, die zweite Zeile zeigt die Auswertung der Färbung mit dem Primär-Antikörper gegen CD33.

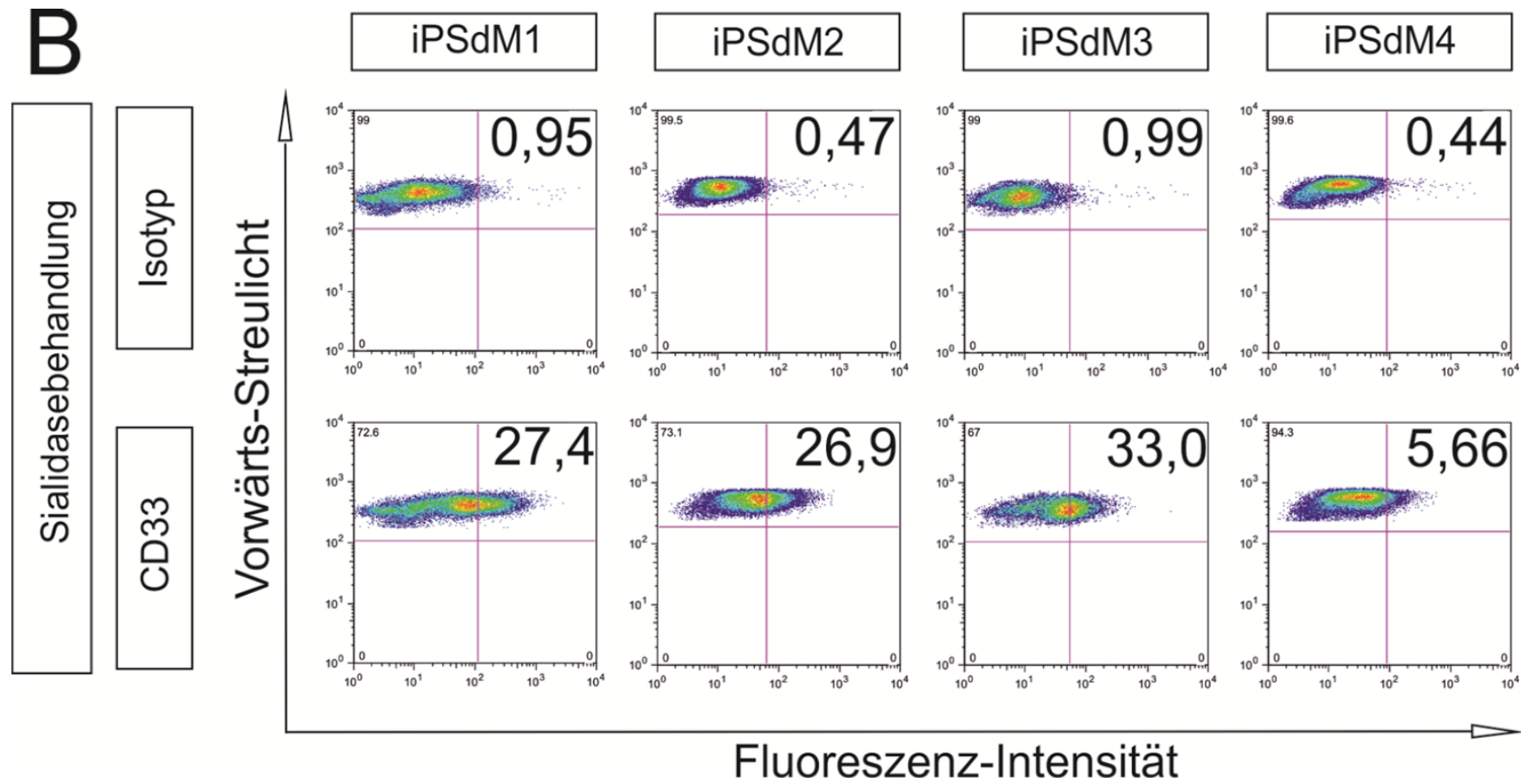


Abbildung 12 B: Die Abbildung zeigt analog der Darstellung in 12 A die Ergebnisse nach Sialidase-Behandlung.

Der Aktivierungsgrad der Mikroglia unterliegt trotz möglichst konstanten Bedingungen *in vitro* verschiedenen, nicht immer definierbaren Einflussfaktoren, wie unterschiedliche Zelldichte in der Kulturschale, leichten Temperaturunterschieden des Zell-Mediums, leichten Unterschieden im Aktivierungs-Niveau nach dem Auftauen von weggefrorenen Zellen oder Unterschiede im Ausmaß der Maskierung von CD33 durch zelleigene Sialinsäuren. Daher ist verständlicherweise analog zum Aktivierungsgrad der Mikroglia auch die Expression des CD33-Rezeptors bzw. dessen Detektionsrate nicht immer konstant.

Um einen Effekt der genannten Einflussfaktoren auf die quantitative Analyse von CD33 auf iPSdM zu vermeiden, werden die Kulturschalen mit iPSdM-Mikroglialinien zur Detektion unter Standard-Bedingungen und nach Sialidase-Behandlung parallel in Kultur gehalten und gleichzeitig von den Platten gelöst und mit den Antikörpern inkubiert. Jedes Experiment ist also eine Momentaufnahme des Expressions-Niveaus. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 12 gezeigt.

Gemeinsam bleibt allen gezeigten Ergebnissen der positive Nachweis der Expression des Rezeptors. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit dem immunzytochemischen und durchflusszytometrischen qualitativen Nachweis von CD33 aus den vorherigen Experimenten. Wird das Experiment nach einer 2 ½ stündigen Sialidase-Behandlung durchgeführt, kommt es zu einer Steigerung der Detektionsrate von CD33 auf den Zellen (siehe Abbildung 12 B). Abbildung 13 zeigt die durchschnittliche Hochregulation der Detektionsrate des Rezeptors nach Sialidasebehandlung für die in Abbildung 12 gezeigten Experimente. Es kommt im Schnitt zu einer Verdoppelung der Fluoreszenzdetektion nach Sialidasebehandlung.

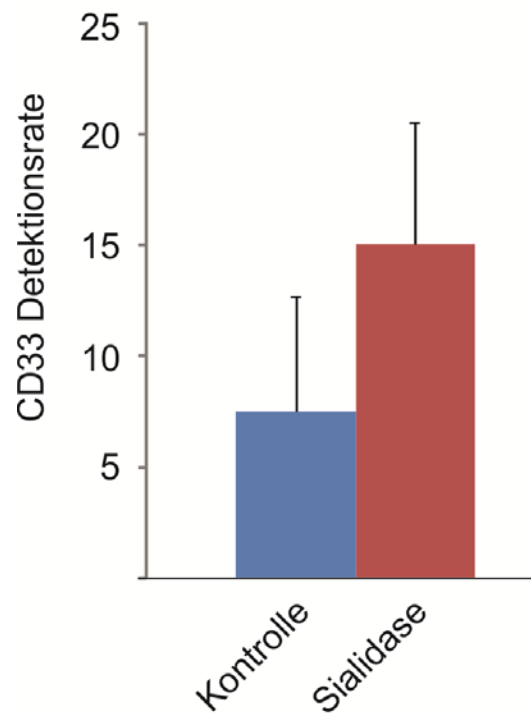


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt die mittlere Steigerung der Detektionsrate von CD33 gemessen durch Durchflusszytometrie nach Sialidasebehandlung wie in Abbildung 12 gezeigt. Im Schnitt bewirkt eine Sialidase Behandlung eine Steigerung der Detektionsrate um den Faktor zwei.

3.5 Nachweis der Transkription des *cd33-Gen* in humanem Hirngewebe

Nachdem CD33 in iPScDM nachgewiesen wurde, konnten die Ergebnisse im humanen Modell bestätigt werden. Hierzu wurde mRNA aus kompletten humanen Gehirnen revers transkribiert. Die gewonnene cDNA besteht aus einem *desoxyribonucleic acid* (DNA) - Mix aus allen im menschlichen Gehirn vorkommenden Zellen. Anschließend wurde die Probe mittels PCR auf die Sequenz für das *cd33*-Gen untersucht. Die Reaktion wurde unter denselben Konditionen und mit den gleichen Primern durchgeführt, wie sie für die iPScDM-cDNA gezeigt wurden.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der PCR mit THP-1-cDNA als Positivkontrolle und einer Leerkontrolle aus mehrfach destilliertem Wasser. Als Intensitätskontrolle wurde eine PCR mit Primern gegen das Haushaltsgen *gapdh* angefertigt.

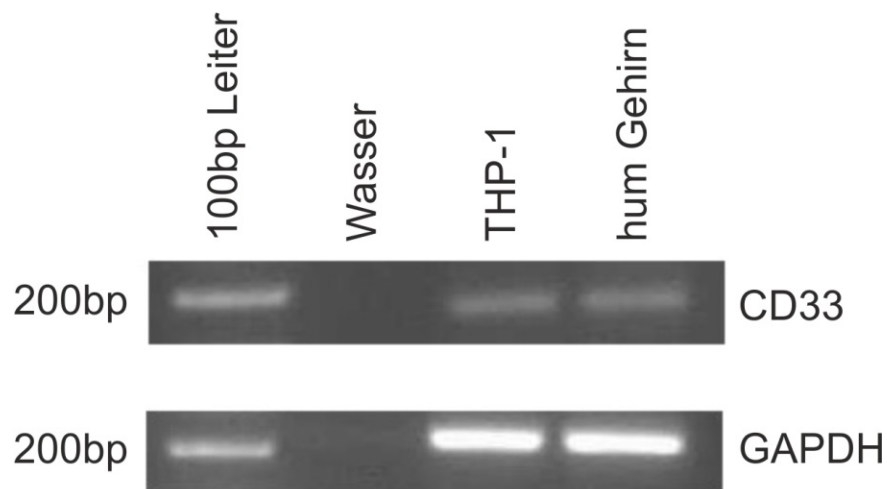


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer PCR aus cDNA einer Probe aus komplettem menschlichen Gehirn. Als Intensitätskontrolle wurde eine PCR mit Primern gegen das Haushaltsgen *gapdh* durchgeführt.

Die auf ein Agarose-Gel aufgetragenen PCR-Proben zeigen eine deutliche Bande für die PCR-Produkte der *cd33*-Primer in der Probe aus humanem Hirngewebe. Somit wurde die Transkription des *cd33*-Gen in humanem Hirngewebe nachgewiesen.

Aus Abbildung 14 geht hervor, dass es im menschlichen Gehirn eine Zellpopulation gibt, welche das *cd33*-Gen transkribiert. Da sowohl die Transkription des *cd33* Gens als auch die Expression des CD33-Rezeptors *in vitro* auf humanen iPSdM bereits gezeigt wurde, liegt es nahe, auch im menschlichen Gehirn die Mikroglia näher auf CD33 zu untersuchen.

3.6 Nachweis des CD33-Rezeptors in humanem Hirngewebe mittels Immunohistochemie

Um zu prüfen, ob sich die *in vitro* Ergebnisse auf Mikroglia in humanem Hirngewebe übertragen lassen, wurde bereits mit mRNA aus humanem Hirngewebe die Transkription des *cd33*-Gens nachgewiesen. Nun wurde auch das Protein auf der Zelloberfläche von humanen Mikroglia in Gehirnschnitten untersucht. Hierzu wurden Schnitte aus Paraffin-fixierten menschlichen Spendergehirnen angefertigt und auf eine CD33-Expression hin untersucht.

Die Schnitte wurden gegen CD33 und den Mikroglia-Marker CD68 gefärbt und mittels Konfokalmikroskop analysiert.

Das untersuchte Patienten-Kollektiv bestand zur einen Hälfte aus Patienten mit einer gesicherten Alzheimer-Demenz und zur anderen Hälfte aus nicht an Demenz erkrankten Kontroll-Patienten. Aus den Gehirnschnitten wurden randomisiert Paare aus einem Alzheimer- und einem Kontroll-Patienten gebildet und verglichen. Als Kontrolle für den verwendeten CD33-Antikörper wurde eine reine Sekundärantikörperfärbung durchgeführt und anschließend der Schwellenwert für die Intensitätsmessung so hoch gesetzt, dass für diese Färbung kein relevantes Signal aufgezeichnet wurde. Somit wurden Signale aus unspezifischen Bindungen nicht in relevantem Umfang detektiert. Durch eine CD68-CD33 Doppel-Färbung konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den gefärbten Zellen um Mikroglia handelt.

Abbildung 15 zeigt mit einem Konfokal-Mikroskop aufgenommene, repräsentative Bilder dieser Färbung.

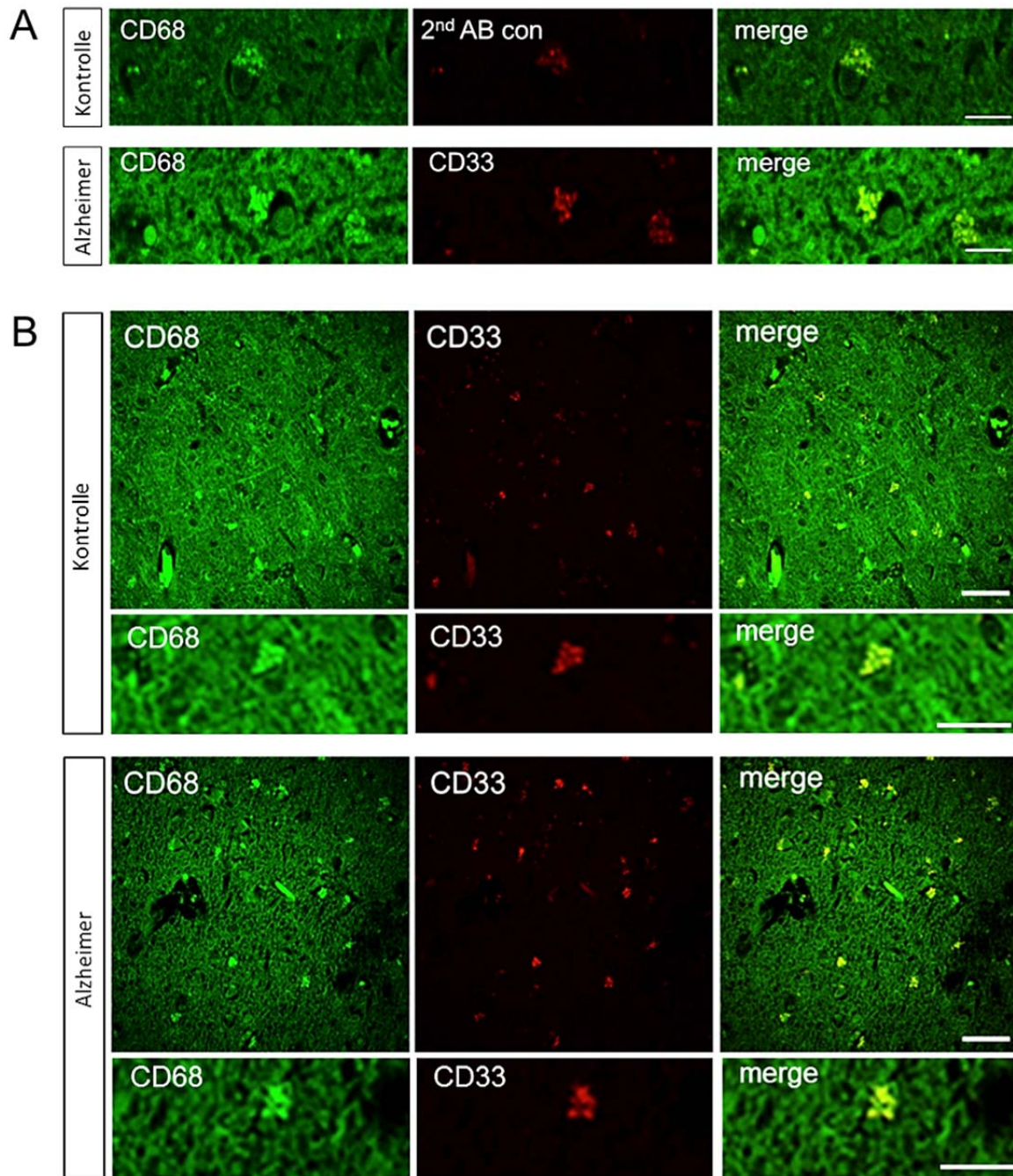


Abbildung 15: **A:** Obere Reihe: Konfokalmikroskopische Auswertung einer CD68-Färbung und einer Sekundär-Antikörper Kontrolle eines Kontroll-Patienten. Sämtliche Färbung der Sekundär-Antikörper-Kontrolle ist hier als unspezifisch zu werten. Untere Reihe: Zum Vergleich eine Färbung mit Primär-Antikörpern gegen CD68 und CD33 mit einer spezifischen Doppelfärbung einer Mikroglia-Zelle eines Alzheimer-Patienten. **B:** Konfokalmikroskopische Auswertung einer CD68- (grün) und CD33- (rot) Färbung bei einem Kontroll- (oben) und einem Alzheimer-Patienten (unten) im Vergleich. Unter den Übersichtsaufnahmen sind Vergrößerungen aus dem jeweiligen Bild gezeigt. Bei beiden Patienten finden sich CD33 positive Mikroglia. Maßstab Vergrößerungen: 20 μm , Übersichtsaufnahmen: 50 μm .

Die Färbung in Abbildung 15 A zeigt in der oberen Reihe eine konfokalmikroskopische Auswertung einer Färbung gegen CD68 in grün und einer reinen Sekundär-Antikörper Kontrolle ohne Primär-Antikörper in rot. Zusätzlich ist ein übereinandergelegtes Bild der beiden Färbungen gezeigt.

Die zweite Reihe zeigt im Vergleich die tatsächliche Färbung gegen CD68 (grün) und CD33 (rot) bei einem Alzheimer Patienten und zusätzlich auch hier ein übereinandergelegtes Bild. Die Abbildung zeigt eine CD68-positive Zelle, welche ebenfalls ein positives Signal in der CD33-Färbung zeigt.

Im nächsten Schritt wurden Paraffin-Schnitte von Kontroll- und Alzheimer-Patienten gegen CD68 und CD33 gefärbt (siehe Abbildung 15 B). Sowohl in den Schnitten der Kontroll-, als auch der Alzheimer-Patienten waren die durch die CD68-Färbung detektierten Mikroglia auch CD33-positiv. Hierdurch wurde die CD33-Expression aus den *in vitro* Versuchen mit iPScM auch in humanem Gewebe nachvollzogen.

3.7 Quantitative Analyse der CD33-Expression auf humanen Mikroglia bei Alzheimer- und Kontroll-Patienten

Nachdem die Transkription des *cd33*-Gen in humanem Hirngewebe und die Expression des CD33-Rezeptors in humanen Hirnschnitten nachgewiesen werden konnten, wurden die Gehirnschnitte als nächstes auf die Anzahl der Mikroglia hin untersucht und analysiert, wie viele Mikroglia bezogen auf die Gesamtzahl der Mikroglia eine nachweisbare CD33-Expression zeigen. Hierbei wurde nur eine qualitative Aussage bezüglich „Expression“ oder „keine Expression“ getroffen, zunächst ohne das Expressionsniveau zu berücksichtigen. Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus einer Gruppe aus sechs Alzheimer- und sechs Kontrollpatienten, welche für die Experimente randomisiert in Paare eingeteilt wurden. Abbildung 16 zeigt einzelne Informationen der betreffenden Patienten auf. Alle Schnitte stammen aus dem *gyrus temporalis superior* des *Neocortex*. Schnitte aus denselben Gehirnen wurden in der Vergangenheit bereits zu Untersuchungen von Mikroglia durch Gaikwad et al. verwendet (Gaikwad et al., 2009).

Fall	Alter	Geschlecht	Braak Stage	A β Phase	CDR Score	Diagnosen
Alzheimer 1	81	W	5	4	3	Alzheimer, Diabetes Mellitus, Pneumonie, Myocardinfarkt
Alzheimer 2	85	M	3	3	2	Mixed Dementia, Diabetes Mellitus, Pneumonie, Myocardinfarkt
Alzheimer 3	78	M	4	3	1	Alzheimer, Diabetes mellitus
Alzheimer 4	89	W	n.d.	n.d.	n.d.	Alzheimer, Diabetes mellitus, Sepsis
Alzheimer 5	89	W	n.d.	n.d.	n.d.	Alzheimer, Diabetes mellitus
Alzheimer 6	78	W	5	4	3	Alzheimer, Hypertonie
Kontrolle 1	66	W	-	-	-	Alkoholismus, Pneumonie, Hypertonie
Kontrolle 2	66	M	-	-	-	Diabetes mellitus, Myocardinfarkt
Kontrolle 3	69	W	-	-	-	Hypertonie
Kontrolle 4	66	M	-	-	-	Cerebrale Blutung
Kontrolle 5	70	M	-	-	-	Alkoholismus
Kontrolle 6	73	M	-	-	-	Bronchial Carcinom

Abbildung 16: Informationstabelle zu allen in den immunhistochemischen Färbungen vorkommenden Patienten. Braak Stage nach Braak et al. (Braak und Braak, 1991); A β -Phase nach Thal et al. (Thal et al., 2000); CDR-score nach Morris et al. (Morris, 1993). n.d. nicht definiert.

Abbildung 17 zeigt im Einzelnen die graphische Auswertung der Untersuchungen von Zellzahl und CD68/CD33-Koexpressionslevel für alle untersuchten Patienten in Zellen/mm², wobei jeweils die totale Zellzahl und der Anteil der CD33-positiven Zellen nebeneinander gezeigt sind.

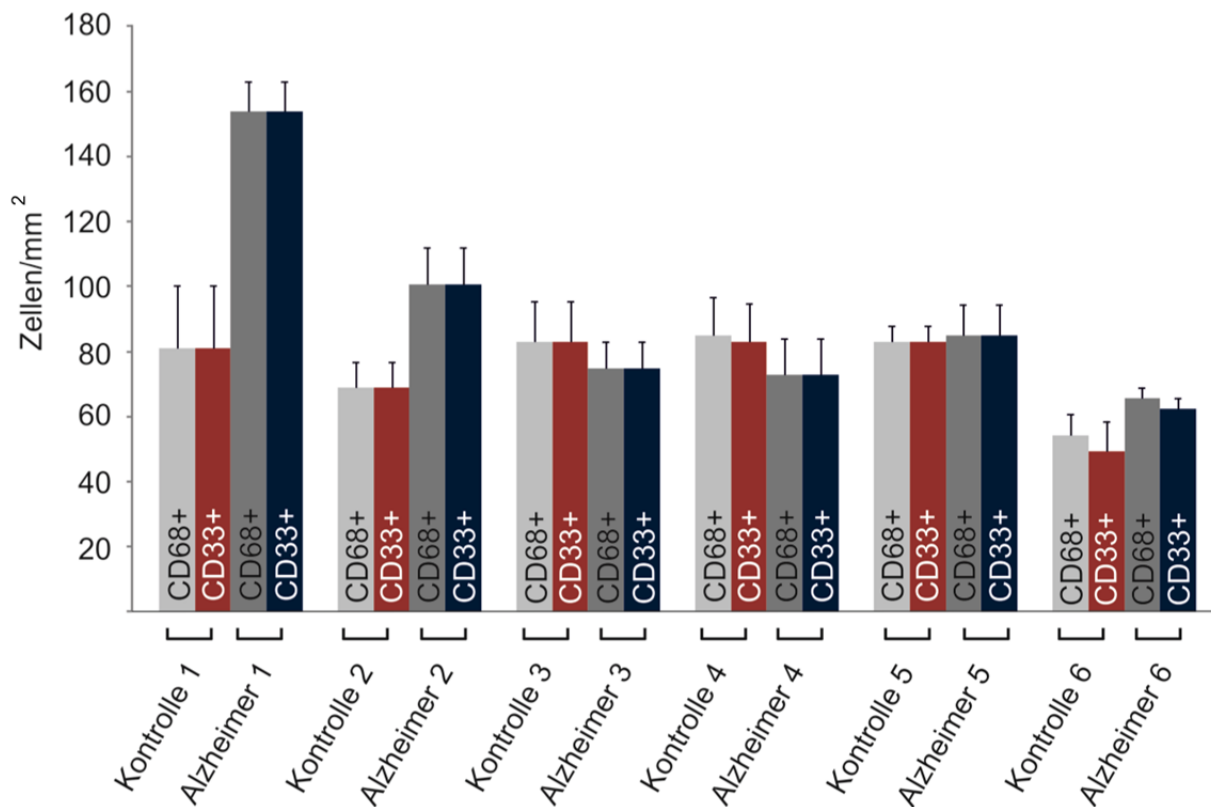


Abbildung 17: Die Abbildung zeigt die Anzahl der CD68-positiven Zellen aller untersuchten Patienten im Vergleich zu der Anzahl an Zellen mit einem positiven CD33-Signal.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, lassen sich aus den Daten der einzelnen Patienten Aussagen über die Gesamtheit der untersuchten Kontroll- und Alzheimer-Patienten treffen. Die Anzahl der CD68 positiven Zellen als Maß für die Mikrogliazahl liegt insgesamt bei den Alzheimer Patienten leicht höher als bei den Kontroll-Patienten. Die graphische Auswertung der Zellzahl ist in Abbildung 18 gezeigt, wobei die Anzahl der Zellen mit einem positiven Signal für den Mikroglia-Marker CD68 gleich eins gesetzt wurde und die Zellzahl der CD68-positiven Zellen bei den Alzheimer-Patienten in Relation dazu angegeben sind.

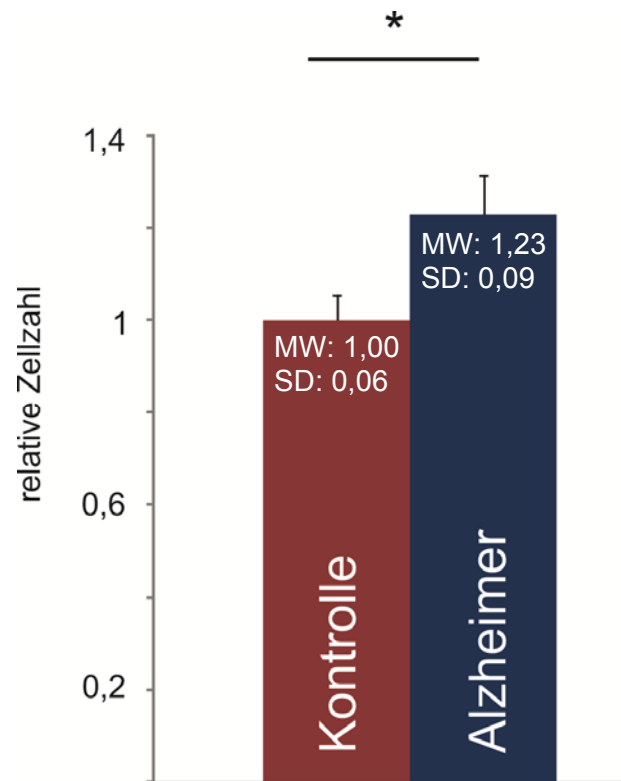


Abbildung 18: Untersuchung der Anzahl an Zellen mit einem positiven Signal für den Mikroglia-Marker CD68 bei Kontroll- und Alzheimer-Patienten. Die Zellzahl der Kontrollpatienten wurde gleich eins gesetzt und die Zellzahl der Alzheimer-Patienten in Relation dazu angegeben. MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Als nächstes wurde die Koexpression von CD68 und CD33 untersucht um zu analysieren wie viel Prozent der Zellen mit einem positiven Signal für CD68 auch eine CD33-Expression zeigen. Hierbei wurde nur eine qualitative Aussage getroffen, eine quantitative Aussage zum Expressionsniveau wird an anderer Stelle getroffen. Abbildung 19 zeigt die graphische Auswertung der CD68-CD33-Koexpression in Prozent. Sowohl in der Gruppe der Kontroll-Patienten als auch in der Gruppe der Alzheimer-Patienten wurde eine Koexpressionsrate von über 98 % gefunden, was bedeutet, dass fast alle untersuchten Zellen CD33 exprimieren.

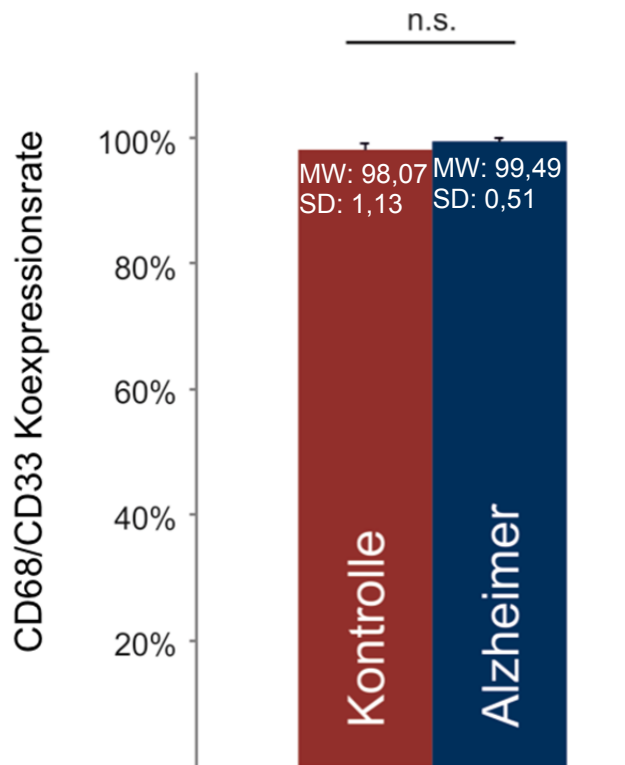


Abbildung 19: Die Abbildung zeigt die Koexpression von CD68 und CD33 bei Kontroll- und Alzheimer-Patienten. Bei beiden Kollektiven liegt eine hohe Koexpressionsrate von über 98 % vor. MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Aus den gezeigten Auswertungen können zwei grundlegende Aussagen getroffen werden. Erstens, dass die Anzahl der Mikroglia nur einen geringen Zusammenhang mit dem Alzheimer-Status aufweist und zweitens, dass der Großteil der detektierten Mikroglia eine CD33-Expression aufweisen.

Als nächster Schritt wurde das CD33-Expressionsniveau auf den Mikroglia bei Kontroll-Patienten im Vergleich zu Alzheimer-Patienten analysiert, um nach der qualitativen Aussage aus Abbildungen 17 und 18 nun auch eine quantitative Aussage treffen zu können.

Hierzu wurden die konfokalmikroskopisch angefertigten Bilder der CD68-CD33-Färbung auf die Fluoreszenz-Intensität des CD33-Signals hin untersucht und quantifiziert. Abbildung 20 zeigt die graphische Auswertung dieses Experiments für alle untersuchten

Patienten, in dem durchweg eine höhere Signalintensität bei den Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden wurde.

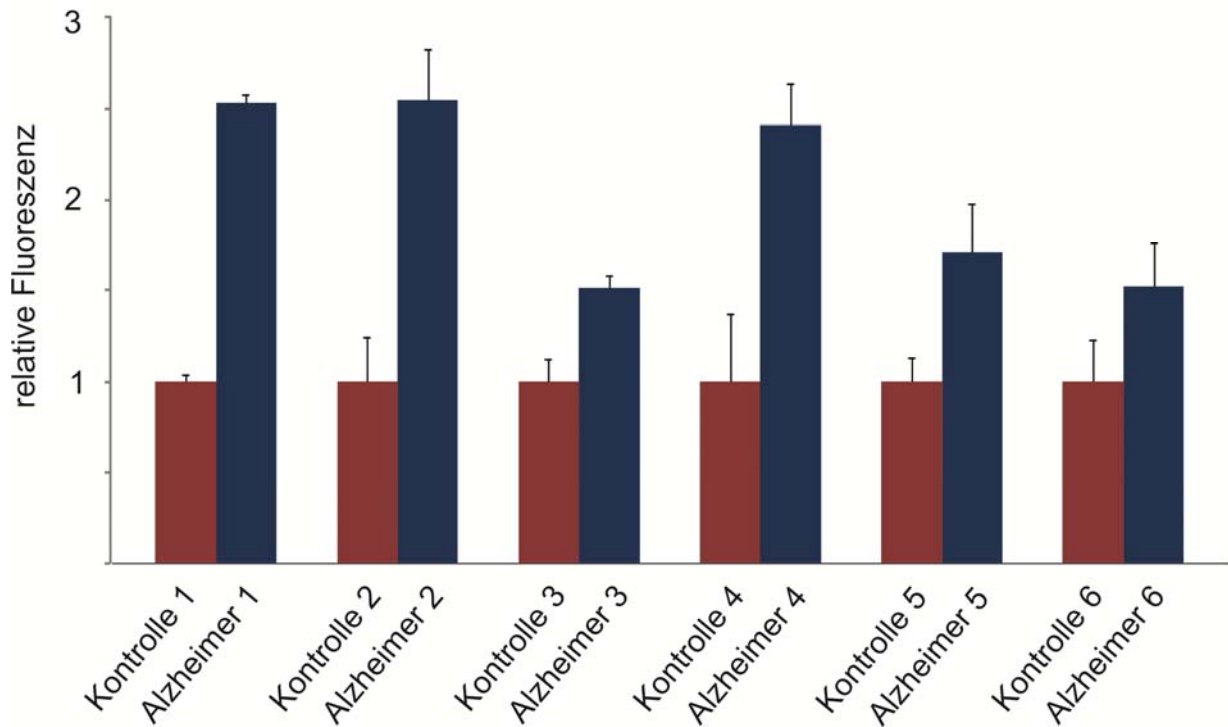


Abbildung 20: Die Grafik zeigt die Auswertung der Signalintensität für die CD33-Färbung bei Kontroll- und Alzheimer-Patienten im Vergleich. Die Intensität liegt bei allen untersuchten Alzheimer-Patienten höher als bei den jeweiligen Kontroll-Patienten.

Die Abbildung 21 zeigt zusammenfassend das Niveau der CD33-Überexpression der in Abbildung 20 gezeigten Alzheimer-Patienten im Vergleich zu den Kontroll-Patienten. Im Schnitt zeigt sich eine Hochregulation der CD33-Expressionsrate um den Faktor 2,08. Dies entspricht einem hoch signifikanten Unterschied zwischen den Kollektiven.

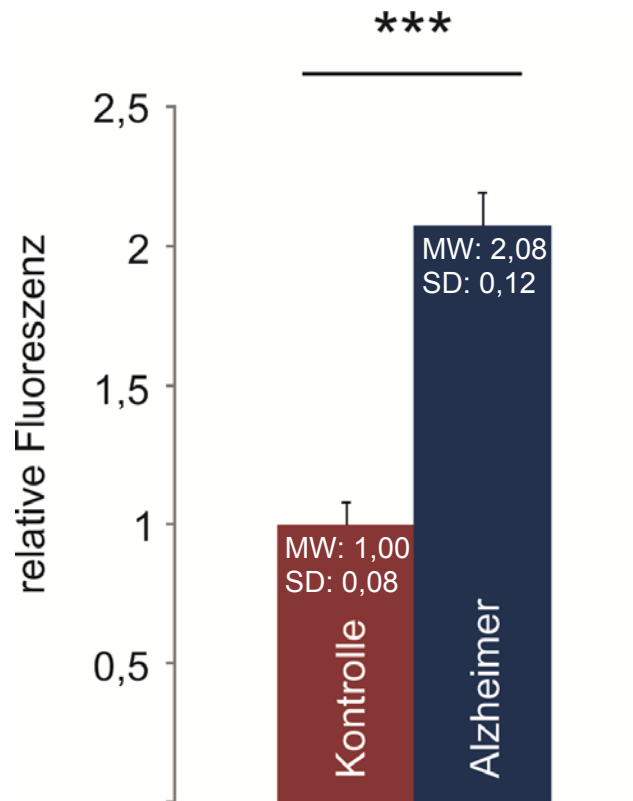


Abbildung 21: Graphische Auswertung der relativen CD33-Signalintensität auf CD68-positiven Zellen von Kontroll- und Alzheimer-Patienten als Maß für das Expressionsniveau von CD33 auf humanen Mikroglia. Die Signalintensität der Kontroll-Patienten wurde gleich eins gesetzt und die Signalintensität der Alzheimer-Patienten in Relation dazu angegeben. Es zeigt sich eine um den Faktor 2,08 höhere Signalintensität bei den Alzheimer-Patienten im Vergleich zu den Kontroll-Patienten. MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Zusammen mit den qualitativen Ergebnissen aus den Abbildungen 17 bis 19 lässt sich herleiten, dass das stärkere Expressionsniveau des CD33-Rezeptors bei Alzheimer-Patienten wie in Abbildung 21 gezeigt nicht allein durch eine höhere Gesamt-Zellzahl in den analysierten Schnitten hervorgerufen werden kann, sondern durch eine gesteigerte Expression auf den einzelnen Zellen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch diesen Effekt zu vermeiden wurde bei der Berechnung des relativen Expressionsniveaus die Fluoreszenz pro Fläche berechnet, um einen eventuellen Effekt der höheren Zellzahl zu berücksichtigen. Es handelt sich also um eine gesteigerte Expressionsrate von CD33 in den Mikroglia der Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Kontrollpopulation.

4. Diskussion

Die kürzlich in *genome wide association studies* (GWAS) identifizierten Polymorphismen im *cd33* Gen (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011) zeigten eine hohe Korrelation mit dem Auftreten des Morbus Alzheimer. Daraufhin erschloss sich eine neue Perspektive für die Demenz-Forschung, die erst kürzlich schwere Misserfolge bei der Entwicklung medikamentöser Therapieoptionen des Morbus Alzheimer hinnehmen musste (Doody et al., 2013; Salloway et al., 2009).

Jedoch ergibt sich wie bei allen GWAS das Problem, dass die Ergebnisse zunächst nur eine Aussage zu Korrelationen treffen und keinen Beweis für eine Kausalität darstellen. Diese Kausalitäten zu ergründen muss dann Ziel weiterer Anstrengungen sein. Als größte Fehlerquelle der GWAS ist das verwendete Probenmaterial zu werten. Dominiert zum Beispiel in einer ausgewerteten Probe eine bestimmte Zellpopulation, so kann in einer weiteren weniger häufig in der Probe vorkommenden Population ein an sich signifikanter Wert im Verhältnis zur dominierenden Population untergehen. Die Entdeckung eines Polymorphismus im *cd33* Gen als Risikofaktor für Morbus Alzheimer erfordert also zunächst die Zuordnung zu einer bestimmten Zellpopulation welche CD33 exprimiert. Auf Grund der Verwandtschaft von Mikroglia zu anderen myeloiden Zellen wie den Monozyten, welche CD33 exprimieren, waren sie die Zellpopulation welche in der vorliegenden Arbeit auf CD33 untersucht wurde.

4.1 Das *cd33*-Gen wird in iPSdM in mRNA transkribiert und der CD33-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert

4.1.1 *cd33*-Gen-Transkription in humanen iPSdM

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst der Nachweis einer Transkription des *cd33*-Gens in cDNA aus iPSdM-Mikroglialinien unter verschiedenen Stimulationen und unter Standard-Bedingungen erbracht (siehe Abbildung 7). Stimulation durch LPS und IL-3 regulieren hierbei die *cd33*-Transkription herauf.

LPS ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und löst im menschlichen Organismus massive immunologische Reaktionen bis hin zum septischen Schock aus. Wird LPS, welches z.B. im Serum an LPS-bindendes Protein (LBP) bindet, auf der

Zelloberfläche vom CD14 gebunden, so dimerisiert CD14 mit dem *toll-like-receptor-4* (TLR-4), was zur Aktivierung des *nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) führt. In der Folge werden proinflammatorische Zytokine und Chemokine produziert (Janeway et al., 2005).

Das Zytokin IL-3 stimuliert die Bildung von unspezifischen Effektorzellen wie Makrophagen und Granulozyten im Knochenmark. Zusätzlich bewirkt es auch eine Differenzierung von dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen im Knochenmark (Janeway et al., 2005). LPS und IL-3 wirken demnach beide entzündungsfördernd.

Die Hochregulation eines inhibitorischen Rezeptors wie CD33 als Reaktion auf einen inflammatorischen Reiz könnte als endogene „Bremse“ zum Verhindern einer Überreaktion aufgefasst werden.

4.1.2 Expression des CD33 Rezeptors in humanen iPSdM

Im nächsten Schritt wurde nach der Transkription auch die Expression des Proteins auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Dies erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden – mittels Immunozytochemie und mittels Durchflusszytometrie. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden iPSdM als adäquates Korrelat humaner Mikroglia verwendet. In der Herstellung der iPSdM-Mikroglialinien wurde durch die verwendeten Stimulationen die natürliche Entwicklung der Mikroglia im Dottersack während der Embryogenese imitiert. Es handelt sich um eine Zelllinie aus ethisch unbedenklichem Spendermaterial aus menschlichen Fibroblasten.

In den vorliegenden durchflusszytometrischen und immunozytochemischen Untersuchungen der iPSdM, sowie in den immunohistochemischen Untersuchungen an humanen Hirnschnitten sind repräsentativ Färbungen gegen CD68, CD45, CD11b und Iba1 auf der Zelloberfläche gezeigt. Die Proteine CD68, CD45, CD11b und Iba1 gelten als Mikroglia-Marker (Guillemin und Brew, 2004; Napoli et al., 2009), ein Expressionsnachweis dieser Proteine auf der Zelloberfläche soll dazu dienen die betreffende Zelle als Mikroglia zu identifizieren.

Verschiedene Autoren brachten Mikroglia in der Vergangenheit in Verbindung mit der Pathogenese von Morbus Alzheimer, was sie weiterhin zum Gegenstand intensiver Forschungen werden ließ. Qui et al. beschrieben eine von den Mikroglia ausgehende Produktion proteolytischer Enzyme wie Metalloproteasen, welche Amyloid- β degenerieren sollen (Qui et al., 1997). Auch das vermehrte Auftreten von aktivierten Mikroglia in unmittelbarer Umgebung amyloider Plaques wurde als Hinweis gedeutet, dass Mikroglia Amyloid- β phagozytieren (Frautschy et al., 1998). Des Weiteren bewirkt die Anwesenheit von Amyloid- β die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Mikroglia (Benveniste et al., 2001), was als Erklärungsversuch für die bei Morbus Alzheimer auftretende Neurodegeneration gewertet werden kann. Zudem exprimieren Mikroglia Rezeptoren, welche eine entscheidende Rolle bei der Phagozytose von Amyloid- β und Zelldebris spielen (Napoli und Neumann, 2009).

Aus dem hier erbrachten experimentellen Nachweis einer *cd33*-Transkription (siehe Abbildung 7) und einer Expression des CD33-Rezeptors auf den iPSdM-Mikroglialinien (siehe Abbildung 8 und 11) geht hervor, dass Mikroglia neben den peripheren, myeloiden Zellen im Blut ein CD33-exprimierendes Korrelat im ZNS darstellen. Folglich scheint die Kausalität zwischen Mutationen im *cd33*-Gen und dem vermehrten Auftreten von spätmanifestem Morbus Alzheimer, wie es von Hollingworth et al. und Naj et al. beschrieben wurde, eng mit den Mikroglia in Verbindung zu stehen (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011).

Durch die Funktion der Mikroglia als Vertreter des Immunsystems im zentralen Nervensystem wäre eine Modulation der immunologischen Kompetenz durch Mutationen in einem auf Mikroglia exprimierten inhibitorischen Rezeptor wie CD33, ein plausibler Erklärungsansatz für einen Beitrag in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer. Sollte der pathogene Effekt tatsächlich durch alterierte Expression hervorgerufen werden, könnte eine Veränderung der CD33-Expression auch exogen ausgelöst werden, z.B. durch Anhäufung von Liganden oder genereller Stimulation der exprimierenden Zellpopulation, den Mikroglia.

4.2 Sialidase-Behandlung von iPScM-Mikroglialinien führt zu einem gesteigerten Detektionsniveau des CD33-Rezeptors auf der Zelloberfläche

Liganden des CD33-Rezeptor sind bestimmte Sialinsäuren, wie sie auch in der Glykokalyx körpereigener Zellen vorkommen. Somit können körpereigene Sialinsäuren in *cis*- (von derselben Zelle stammend) oder *trans*- (aus einer Nachbarzelle stammend) die Bindung von Liganden an CD33 „blockieren“ (Crocker et al., 2007; Paulson et al., 2012). In einer solchen Bindung wird in der Mikroglia ein inhibitorisches Signal gemäß der intrazellulären Signalkaskade aufrechterhalten (Lajaunias et al., 2005; Taylor et al., 1999; Ulyanova et al., 1999).

Konsekutiv ist CD33 in einer solchen Bindung jedoch nach außen hin maskiert, da Antikörper welche gegen CD33 gerichtet sind keine Bindung mit dem blockierten Rezeptor eingehen können. Das nachweisbare Expressionsniveau von CD33 ist je nach Menge solcher *cis*- und *trans*-Bindungen aufgrund des Mangels an für die Antikörper-Bindung verfügbarem CD33 in diesem Zustand experimentell niedriger als es in Realität der Fall ist. Dieser Effekt kann so ausgeprägt sein, dass in diesem Zustand experimentell keine CD33-Expression nachweisbar ist. Dies ist aus Abbildung 12 A für iPScM 1 ohne Sialidasebehandlung ersichtlich.

Freeman et al. konnten im Rahmen ihrer Charakterisierung von CD33 zeigen, dass transient CD33-exprimierende COS-Zellen (eine immortalisierte fibroblastenähnliche Zelllinie aus Affen-Nierenzellen) Neu-5-Ac exprimierende Erythrozyten nur dann bindet, wenn sie vorher einer Sialidase-Behandlung unterzogen wurden, was im Wesentlichen auf demselben Effekt beruht (Freeman et al., 1995). Erst durch die Sialidase-Behandlung wurden hier oberflächliche Sialinsäuren abgespalten um die Bindungsstellen freizulegen.

Um einen solchen „Maskierungs-Effekt“ in der vorliegenden Arbeit zu umgehen und ein Bild des tatsächlichen Expressionsniveaus nachzuweisen, wurden die Sialinsäuren der Glykokalyx mittels einer Sialidase-Behandlung abgespalten. CD33 liegt hiernach frei an der Zelloberfläche für eine Antikörper-Bindung, das nachgewiesene Expressionsniveau entspricht nun also der tatsächlichen Menge an CD33 auf der Zelloberfläche. Auch für die in Abbildung 12 B repräsentativ gezeigte Momentaufnahme des Expressionsniveaus zeigt sich für iPScM 1 nach Sialidase-Behandlung eine Expression von CD33 auf der

Zelloberfläche, obwohl hier unter Kontrollbedingungen keine Expression nachweisbar war. Alle anderen gezeigten iPsdM-Mikroglialinien unterliegen demselben Effekt, wobei allerdings auch ohne Sialidase-Behandlung ein geringes Expressionsniveau nachweisbar war. In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals ein maskierender Effekt durch Sialinsäuren in *cis*- und *trans*-Bindung in den iPsdM-Mikroglialinien als humanes Mikroglia-Korrelat nachgewiesen werden.

Durch die Abspaltung der Sialidasen wird jedoch gleichzeitig auch das durch *cis*- und *trans*-Bindungen aufrechterhaltende inhibitorische Signal entfernt, was experimentell Einfluss auf das Verhalten der Mikroglia bzgl. der immunologischen Funktionen nimmt (Lajaunias et al., 2005; Taylor et al., 1999; Ulyanova et al., 1999). Ein ähnlicher Effekt wurde experimentell von Griciuc *et al.* nachgewiesen (Griciuc et al., 2013). Hier wurde CD33 auf der murinen Mikroglia-Zelllinie BV2 so moduliert, dass der Sialinsäurebindende Anteil komplett fehlt. Es resultierte eine Aufhebung des inhibitorischen Effektes von CD33 bezüglich der Phagozytosekapazität von Amyloid- β 42. Die Interaktion von CD33 mit Sialinsäuren nimmt also eine wichtige Rolle in der Vermittlung des inhibitorischen Effektes von CD33 auf immunologische Funktionen der Mikroglia ein.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Malik et al., die in ihrer Studie über einen protektiven Polymorphismus im *cd33*-Gen zeigten, dass diese Mutation neben einer geringeren Gesamtexpression von CD33 zur gesteigerten Bildung eines CD33-Isotypen mit fehlender Bindungskapazität für körpereigene Sialinsäuren führt (Malik et al., 2013). Konsekutiv entfällt das normalerweise vermittelte inhibitorische Signal von CD33, was die gleiche Konsequenz birgt wie eine niedrigere Expression von voll funktionsfähigem Protein. Das Alzheimer-Risiko ist vermindert im Vergleich zur Normalpopulation und im Vergleich zu Patienten mit gesteigerter CD33-Expression. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wäre eine Analyse des CD33-Rezeptorstatus von Alzheimer- und Kontrollpatienten, sowie von Patientenkollektiven ohne Alzheimer-Demenz trotz erhöhter Plaque-Burden interessant, um eine eventuell verminderte Inhibition durch CD33 zu untersuchen.

Die Untersuchung der Phagozytosekapazität der iPScM nach Sialidasebehandlung wäre ein weiterer interessanter Forschungsansatz. In der Konsequenz wäre somit auch eine Modifikation dieses blockierenden Effektes denkbar, wenn Fremd-Proteine aus der Nahrung, welche als CD33-Ligand fungieren, in der Glykokalyx verbaut werden und somit zu einer verstärkten Inhibition bei unveränderter Expression führen.

Im Gegensatz zu unseren nahe verwandten Spezies wie Menschenaffen und nahezu allen anderen Säugern ist Neu5-Ac beim Menschen die dominierende Sialinsäure, während Neu-5Gc nur in sehr geringen Mengen gefunden werden kann (Muchmore et al., 1998). Dies ist eine evolutionäre Eigenart der Menschen, welche durch eine Mutation im *CMA Sialinsäure-Hydroxylase* Gen verursacht wurde. Das hier codierte Enzym katalysiert normalerweise die Umwandlung von Neu5-Ac in Neu5-Gc (Chou et al., 1998; Irie et al., 1998). Gleichzeitig bevorzugt humanes CD33 jedoch Neu5-Gc als Liganden (Brinkmann-Van der Linden und Varki, 2000). Da Neu5-Gc vom Menschen selber nicht synthetisiert werden kann, muss eine exogene Quelle für das vorhandene Neu5-Gc im menschlichen Organismus verantwortlich sein. Tangvoranuntakul et al. konnten zeigen, dass nach oraler Aufnahme von Neu5-Gc dieses auch in Speichel- und Urin-Proben, sowie im peripheren Blut nachweisbar war (Tangvoranuntakul et al., 2003). Neu-5Gc wird also aus der Nahrung resorbiert und verwertet. Eine solche Resorption funktionierte auch in Mäusen für Neu5-Gc-Glykoproteine, welche in der Darmwand verbaut wurden, während freies Neu5-Gc durch den Urogenitaltrakt ausgeschieden wurde (Banda et al., 2012). Zusätzlich konnte Neu5-Gc in humanen Tumoren nachgewiesen werden, weshalb einige Forscher in Xeno-Autoantikörpern gegen nicht-humane Sialinsäuren sogar potenzielle Biomarker sehen (Padler-Karavani et al., 2011).

Vergleichbare Verwertungs-Vorgänge von Nahrungsbestandteilen kommen im menschlichen Stoffwechsel häufiger vor. Analog kann beispielsweise bei der Cholesterinsynthese eine energiesparendere Wiederverwertung von Nahrungsbestandteilen gefunden werden, obwohl der Körper durchaus im Stande ist eigenes Protein zu synthetisieren (Löffler et al., 2006).

4.3 Nachweis von *cd33*-Transkription und Expression des CD33-Rezeptors in menschlichem Hirn-Gewebe

Die bisher diskutierten Ergebnisse wurden ausschließlich aus iPSdM-Mikroglialinien gewonnen, welche als Modell für humane Mikroglia in Zellkultur dienen. Zusätzlich konnten die Transkription und Proteinexpression in der vorliegenden Arbeit auch in humanem Hirngewebe verifiziert werden. Hierzu wurde mRNA aus kompletten menschlichen Gehirnen in cDNA umgeschrieben und mittels PCR die *cd33*-cDNA nachgewiesen (siehe Abbildung 13).

Zur Analyse der verwendeten menschlichen Gehirnschnitte wurden die Patienten randomisiert und in 6 Paare aus jeweils einem Alzheimer- und einem Kontroll-Patienten aufgeteilt. Die Gehirnschnitte dieser Paare wurden jeweils zusammen gefärbt und ausgewertet, wobei der Schwellenwert der konfokalmikroskopischen Auswertung anhand einer zeitgleich angefertigten Sekundär-Antikörper Kontrolle für jedes Patientenpaar individuell bestimmt wurde. Für Untersuchungen der Intensität des CD33-Signals als Maß für das Expressionsniveau wurde die Fluoreszenzintensität der Kontrollpatienten jeweils gleich eins gesetzt und die Fluoreszenzintensität der Alzheimer-Patienten in Relation hierzu angegeben, um die Experimente untereinander vergleichbar zu machen.

Anhand der angefertigten immunohistochemischen Färbungen lässt sich eine Expression von CD33 in humanem Hirngewebe nachweisen (siehe Abbildung 15). Die aus dem humanen Hirngewebe gewonnen Ergebnisse bestätigen also bezüglich Transkription und Proteinexpression die zuvor aufgezeigten Ergebnisse aus humanen iPSdM.

4.4 Alzheimer-Patienten zeigen eine gesteigerte Expression des CD33-Rezeptors im Vergleich zu Kontroll-Patienten

Als Nächstes erfolgte die Auswertung der Hirnschnitte bezüglich der Anzahl CD68-positiver Zellen als Maß für die Anzahl der Mikroglia in den Schnitten. Zusätzlich wurden die CD33-positiven Zellen anteilig an den CD68-positiven Zellen gezählt. Abbildung 17 zeigt eine Übersicht dieser Parameter über alle sechs untersuchten Patientenpaare.

Im Weiteren wurden die Alzheimer und Kontrollpatienten gepoolt und die Zellzahl anhand der CD68-Expression, sowie die Koexpressionsrate von CD68 und CD33 quantifiziert (siehe Abbildung 17 bis 19). Obwohl aus Abbildung 17 eine sehr heterogene Verteilung der Zellzahl ersichtlich ist, ergibt sich insgesamt eine leicht höhere Zellzahl bei den Alzheimer Patienten verglichen mit den Kontrollpatienten. Da in der Einzeldarstellung der Patienten in Abbildung 17 jedoch auch Patientenpaare auftauchen, bei denen eine höhere Zellzahl bei den Kontroll-Patienten im Vergleich zu den Alzheimer-Patienten auftritt ist die rein statistische Auswertung der Zellzahl hier mit Vorsicht zu betrachten.

Die in Abbildung 19 gezeigte Koexpressionsrate von CD68 und CD33 beträgt für Alzheimer- und Kontroll-Patienten jeweils über 98 % ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Populationen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass fast alle der untersuchten Mikroglia eine CD33-Expression aufweisen. Unterschiedliche Expressionslevel von CD33 von Kontroll- und Alzheimer-Patienten ließen sich also nur durch eine gesteigerte Expressionsrate pro Zelle erklären.

Erst kürzlich beschäftigten sich zwei weitere Publikationen mit der Expressionsrate von CD33 in humanem Hirngewebe (Griciuc et al., 2013, Malik et al., 2013). Eine Auswertung bezüglich der Koexpressionsrate wurde jedoch in keiner dieser Studien zur CD33-Expression in Alzheimer-Patienten (Griciuc et al., 2013; Malik et al., 2013) durchgeführt, da meist ein Mix aus kompletten Hirnabschnitten auf Proteine untersucht und anschließend auf einen Mikroglia-Marker normiert wurde.

In der vorliegenden Studie wurde hingegen direkt die Fluoreszenz der markierten Antikörper in immuno-histochemischen Schnitten ausgewertet. Es wurde jedoch auch in den Aufnahmen der Immunohistochemie von Griciuc et al. und Malik et al. keine Zellen beschrieben, welche zwar einen Mikroglia-Marker exprimierten, aber keine CD33-Expression zeigten, was mit den hier gezeigten Ergebnissen kongruent ist.

Als nächstes wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expressionsrate von CD33 in humanem Hirngewebe untersucht. Abbildung 21 zeigt für alle sechs analysierten Patientenpaare eine durchgehend höhere Fluoreszenzintensität des markierten CD33-Antikörpers als Maß für die Expressionsrate. Aus der Quantifizierung der gesamten analysierten Patienten ergibt sich schließlich eine Steigerung der CD33-Expressionsrate

um den Faktor 2,08 gegenüber den Kontrollpatienten, deren Expressionsniveau gleich eins gesetzt wurde.

Da *cd33* als Risikogen für Morbus Alzheimer gilt (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011) legen diese Ergebnisse nahe, dass eine erhöhte Expression des CD33-Rezeptors zur Pathogenese von Morbus Alzheimer beiträgt. Auch die gesteigerte Expressionsrate von CD33 bei Alzheimerpatienten wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnte vor kurzem von Griciuc et al. bestätigt werden (Griciuc et al., 2013).

In ihrer Studie fanden die Autoren eine mittlere Hochregulation von CD33 bei Alzheimer-Patienten um den Faktor zwei im Vergleich zu Kontrollpatienten, was gut mit den in dieser Studie gezeigten Ergebnissen vereinbar ist. Griciuc et al. verwendeten für ihre Untersuchungen eine Suspension aus komplettem menschlichem Gehirn und färbten diese gegen CD33 und Iba-1 als Mikroglia-Marker. Die Daten wurden anschließend mittels Western-Blot ausgewertet und auf detektiertes Iba-1 normalisiert. In mRNA Untersuchungen konnte hier sogar eine 5-fache Hochregulation von *cd33*-mRNA nachgewiesen werden.

In weiteren Untersuchungen wurden in dieser Studie CD33 in einer Mikroglia-Zelllinie (BV2) überexprimiert und das Phagozytoseverhalten analysiert. Hierbei zeigte sich eine verringerte Phagozytosekapazität von Amyloid- β . Um diese Ergebnisse zu verifizieren und Effekte einer niedrigeren Expressionsrate von CD33 zu untersuchen wurden Mausversuche durchgeführt in denen passend zu den Überexpressions-Experimenten eine gesteigerte Phagozytosekapazität gefunden wurde.

Jedoch handelt es sich bei murinem CD33 um einen stark abgewandelten Rezeptor mit einer exzitatorischen statt inhibitorischen Signalkaskade, weshalb die Ergebnisse gegensätzlich hätten ausfallen sollen. Generell wurde jedoch eine verminderte Phagozytosekapazität bei erhöhtem CD33-Expressionsniveau gefunden. Die Degradationsrate des phagozytierten Amyloid- β war in dieser Studie jedoch unverändert, was die Frage nach einem weiteren Faktor in der Pathogenese aufwirft.

Darüber hinaus wurden ähnliche Untersuchungen an Monozyten aus peripherem Blut durchgeführt (Bradshaw et al., 2013). Das Expressionslevel von CD33 auf den Monozyten von Alzheimer-Patienten mit einer als risikohaft identifizierten Mutation des *cd33*-

Gens war hier 7-mal höher im Vergleich zu Blut aus einer Kontrollpopulation mit einer als protektiv geltenden Variante. Diese Ergebnisse geben einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Verwandtschaft peripherer Monozyten und Mikroglia im ZNS und bestätigen die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur Phagozytosekapazität in Abhängigkeit zum Expressionsniveau von CD33.

Unterschiede im Expressionsniveau wurden bei Malik et al. auch in Bezug auf die Morphologie der untersuchten Mikroglia aufgefunden. Es wird beschrieben, dass die Expression von CD33 in amoeboiden Mikroglia stärker ausgeprägt ist als in ruhenden Mikroglia (Malik et al., 2013). Diese Ergebnisse wurden nicht weiter quantifiziert, können mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit jedoch auch nicht verglichen werden, da die Morphologie der untersuchten Mikroglia nicht primärer Bestandteil der Arbeit war und daher aufgrund der gewonnenen Daten nicht sicher zu unterscheiden ist.

Aus der in Abbildung 17 und 18 gezeigten Auswertungen der Anzahl an Mikroglia lässt sich schlussfolgern, dass die Anzahl an Mikroglia bei Alzheimer Patienten trotz durchweg höherer CD33-Expression zwar insgesamt höher ist als bei den Kontroll-Patienten, dieser Trend jedoch nicht *per se* für alle untersuchten Patientenpaare gilt. Die höhere Expression von CD33 lässt sich also primär auf eine größere Menge an Protein pro Zelle und nicht eine reine Erhöhung der Zellzahl zurückführen. Um einen solchen Effekt zu vermeiden wurde in der gezeigten Auswertung der Ergebnisse die Fluoreszenz pro Fläche statt pro Zelle errechnet.

Zu dem Selben Schluss kommen auch Griciuc et al. in Ihrer Studie. Da komplettes Gehirn, also Mikroglia und alle weiteren Zellpopulationen mittels Western-Blot untersucht wurden, wurde die Proteinmenge auf die Menge an Iba-1 normalisiert um das CD33-Signal eindeutig den Mikroglia zuordnen zu können. Des Weiteren wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Mikroglia bei Alzheimer- und Kontroll-Patienten gefunden. Es wurde jedoch eine Expression von CD33 auf humanen Neuronen beschrieben. Diese Expression zeigte sich jedoch unabhängig vom Alzheimer-Status, trägt also zu den Ergebnissen nicht bei (Griciuc et al., 2013). Eine neuronale CD33-Expression lässt sich anhand der in dieser Arbeit angefertigten immunohistochemischen Untersuchungen jedoch nicht nachvollziehen.

Die in dieser Arbeit gezeigten immunohistochemischen Untersuchungen waren insofern herausfordernd, als dass die Qualität der Hirnschnitte einen deutlichen Unterschied zu den verwendeten Schnitten in den Studien von Griciuc et al. und Malik et al. zeigen (Griciuc et al., 2013; Malik et al., 2013).

Als problematisch erwies sich vor allem eine größere Menge an apoptotischem Material, dessen Signal sich durch blockieren mit NGS nicht vollständig eliminieren ließ. In der konfokalmikroskopischen Auswertung wurde daher der Schwellenwert für die Signal-Detektion erhöht und in der Auswertung manuell eine Maske um die gesuchten CD68-positiven Zellen gelegt und nur dort das Signal des markierten CD33-Antikörpers gemessen. Hierdurch wurde verhindert, dass apoptotisches oder unspezifisch angefärbtes Material die Messergebnisse verfälscht.

Savva *et al.* konnte in seinen neuropathologischen Auswertungen von Patienten welche zu ihrem Todeszeitpunkt an Demenz erkrankt waren und nicht an Demenz erkrankten Kontrollpatienten zeigen, dass sowohl neuritische Plaques, als auch NFT einem altersabhängigen Wandel unterliegen. Generell konnten zwei Gruppen gemäß dem Alter bei Todeseintritt unterschieden werden. Während sich die Menge an Plaques und Tangles bei den jüngeren Patienten mit und ohne Demenz erheblich unterschieden, glichen sich diese Werte bei den älteren Patienten beider Gruppen aneinander an. Bei den älteren Patienten konnte nach Ableben eine Menge an Plaques und Tangles nachgewiesen werden die ähnlich war mit Kontrollpatienten vergleichbaren Alters ohne Demenz (Savva et al., 2009).

Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass es die Pathogenese von Morbus Alzheimer nicht von der absoluten Menge amyloider Plaques oder NFT abhängig ist, sondern dass die Pathogenese eher von körpereigenen Genese-Mechanismen abhängt. Für aussagekräftigere Untersuchungen bezüglich der Pathogenese des Morbus Alzheimer müsste daher neben der Gruppe der Alzheimer-Patienten die Gruppe der gesunden Kontrollpatienten unterteilt werden in eine Gruppe mit wenigen oder keinen amyloiden Plaques und einer Gruppe die trotz größerer Mengen an Amyloid- β nicht an einer Demenz erkrankt ist.

Zusammen mit den Ergebnissen enttäuschender Versuche medikamentös in die Bildung von Amyloid- β einzugreifen, bzw. dessen Abbau zu fördern (Doody et al., 2013;

Salloway et al., 2009) und einer verstärkten Inhibition der Mikroglia durch überexprimiertes CD33 bei Alzheimer Patienten lässt die folgende Theorie zur Pathogenese des Morbus Alzheimer zu:

Gemäß ihrer physiologischen Funktion phagozytieren Mikroglia die Amyloid-Oligomere als neurotoxischen Korrelate der Plaque-Genese und lassen diese intrazellulär aggregieren, um die umliegenden Neurone vor dem neurotoxischen Einfluss dieser Oligomere schützen zu können. Die abgelagerten amyloiden Plaques wären dieser Theorie zufolge nur „Deponien“ und nicht direkt in der Pathogenese involviert. Bei verstärkter Inhibition der Mikroglia fände diese Aggregation aufgrund der verminderten Phagozytosekapazität extrazellulär statt und die neurotoxischen Korrelate in der Plaque-Genese würden direkt auf die Neurone wirken können. Es käme trotz unveränderter Menge an entstehenden Plaques zu einer gesteigerten Neurotoxizität.

Einen solchen inhibitorischen Einfluss könnten neben einer genetisch prädestinierten CD33-Überexpression auch exogene Faktoren bedingen. So kann ein Liganden-Überangebot zu einer gesteigerten Expression des Rezeptors führen. Da der bevorzugte Ligand von humanem CD33 die Xeno-Sialinsäure Neu5Gc zu sein scheint (Brinkmann-Van der Linden und Varki, 2000), wäre es denkbar, dass über die Nahrung aufgenommenes Neu5-Gc zu einer gesteigerten Expression von CD33 führt und konsekutiv zur Pathogenese des Morbus Alzheimer beiträgt.

Um diese These belegen zu können bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der Auswirkung verschiedener Sialinsäuren auf das Expressionsniveau von CD33 beim Menschen, sowie Amyloid- β Phagozytoseassays von Mikroglia nach Stimulation mit verschiedenen Sialinsäuren in Zellkultur.

Die immense Bedeutung des CD33-Rezeptor bei der Pathogenese von Morbus Alzheimer zeigt sich auch dadurch, dass im Gegensatz zu allen anderen beschriebenen Risikogenen auch protektive Polymorphismen beschrieben sind (Malik et al., 2013), CD33 also eine regulatorische Funktion zufällt, die sowohl zum Schutz vor der Erkrankung beitragen als auch die Pathogenese negativ beeinflussen kann. Die in dieser Arbeit gezeigte Überexpression von CD33 bei Alzheimer-Patienten eröffnet den zu prüfenden therapeutischen Ansatz, ob die Inhibition der CD33-Rezeptoren Einfluss auf die Alzheimer-Symptomatik oder gar auf die Progredienz der Erkrankung hat. Die

genaue Kenntnis der Spezies-abhängigen Eigenarten der Struktur und Expression von CD33 ist in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung, da damit auch die Modellspezies ausgewählt werden können, mit der Therapiekonzepte vor Anwendung am Menschen evaluiert werden können.

5. Zusammenfassung

Mikroglia repräsentieren das Immunsystem im ZNS und nehmen somit eine zentrale Rolle auch bei neurodegenerativen Erkrankungen ein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des CD33-Rezeptor auf humanen Mikroglia untersucht, um die mögliche Rolle der Mikroglia in der Pathogenese des Morbus Alzheimer genauer aufzuklären.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis einer Transkription des *cd33*-Gens mittels PCR und einer CD33-Rezeptor-Expression auf iPScM-Mikroglialinien mittels Immunocytochemie und Durchflusszytometrie erbracht werden. Durch Sialidase-Behandlung ließ sich das Detektionsniveau von CD33 in der Durchflusszytometrie deutlich erhöhen, da maskierende Sialinsäuren welche auf der Zelloberfläche *cis*- und *trans*-Bindungen mit CD33 eingehen um ein konstitutives inhibitorisches Signal aufrecht zu erhalten, durch Sialidasen abgespalten werden.

In menschlichem Gehirngewebe konnten die in den iPScM gewonnenen Daten bezüglich Transkription und Expression verifiziert werden. Bei der immunohistochemischen Analyse menschlicher Gehirnschnitte von Kontroll- und Alzheimer-Patienten zeigte sich eine gesteigerte Expressionsrate von CD33 auf den Mikroglia der Alzheimer-Patienten, welche auf eine höhere Expressionsrate von Protein pro Zelle verursacht wurde. Die Anzahl der Mikroglia in den untersuchten Gehirnschnitten zeigte eine gering erhöhte Zellzahl bei den Alzheimer-Patienten. Diese Daten sind gut mit kürzlich publizierten Arbeiten vereinbar, welche sich demselben Thema widmeten.

In Zukunft sollte der Effekt von verschiedenen Sialinsäuren auf die immunologische Kompetenz der Mikroglia besonders in Bezug auf Amyloid- β weiter untersucht werden und Zelllinien entwickelt werden, welche durch *Knockdown* und Überexpression unterschiedliche Expressionsniveaus von CD33 berücksichtigen.

Durch die genaue Kenntnis von Struktur, Funktion und Expressionsniveau eröffnen sich Perspektiven für klinische Anwendungsversuche und eine mögliche Validierung von CD33 als potenzielles Ziel neuer Therapiestrategien für Morbus Alzheimer.

6. Literaturverzeichnis

- Banda K, Gregg CJ, Chow R, Varki NM, Varki A. Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: mechanisms underlying gastrointestinal incorporation of the non-human sialic acid xeno-autoantigen N-glycolylneuraminic acid. *J Biol Chem* 2012; 287: 28852-28864
- Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39: 381-391
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239-259
- Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, Ottoboni L, Raj T, Tang A, Rosenkrantz LL, Imboywa S, Lee M, Von Korff A; Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative, Morris MC, Evans DA, Johnson K, Sperling RA, Schneider JA, Bennett DA, De Jager PL. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci* 2013; 16: 848-850
- Brinkmann-Van der Linden BC, Varki A. New Aspects of Siglec Binding Specificities, Including the Significance of Fucosylation and of the Sialyl-Tn Epitope. *J Biol Chem* 2000; 275: 8625-8632
- Brinkman-Van der Linden EC, Sjöberg ER, Juneja LR, Crocker PR, Varki N, Varki A. Loss of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Evolution. *J Biol Chem* 2000; 275: 8633-8640
- Brinkmann-Van der Linden EC, Angata T, Reynolds SA, Powell LD, Hedrick SM, Varki A. CD33/Siglec-3 Binding Specificity, Expression Pattern, and Consequences of Gen Deletion in Mice. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4199-4206
- Chou HH, Takematsu H, Diaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST, Varki A. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11751-11756
- Crocker PR, Varki A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* 2001; 22: 337-342
- Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 255-266
- Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering

Committee, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R; Semagacestat Study Group. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013; 369: 341-350

FDA news release, June 21, 2010

Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadié M, Gressin R, Chaperot L, Arnoulet C, Brignole-Baudouin F, Drénou B, Duchayne E, Falkenrodt A, Garand R, Homolle E, Husson B, Kuhlein E, Le Calvez G, Sainty D, Sotto MF, Trimoreau F, Béné MC. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood* 2002; 99: 1556-1563

Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 1998; 152: 307-317

Freeman SD, Kelm S, Barber EK, Crocker PR. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood* 1995; 85: 2005-2012

Gaikwad S, Larionov S, Wang Y, Dannenberg H, Matozaki T, Monsonego A, Thal DR, Neumann H. Signal regulatory protein-beta1: a microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2009; 175: 2528-2539

Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, Hooli B, Choi SH, Hyman BT, Tanzi RE. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 2013; 78: 631-643

Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 388-397

Hamerman JA, Ni M, Killebrew JR, Chu CL, Lowell CA. The expanding roles of ITAM adapters FcRgamma and DAP12 in myeloid cells. *Immunol* 2009; 232: 42-58

Handgretinger R, Schäfer HJ, Baur F, Frank D, Ottenlinger C, Bühring HJ, Niethammer D. Expression of an early myelopoietic antigen (CD33) on a subset of human umbilical cord blood-derived natural killer cells. *Immunol Lett* 1993; 37: 223-238

Hernández-Caselles T, Martínez-Esparza M, Pérez-Oliva AB, Quintanilla-Cecconi AM, García-Alonso A, Alvarez-López DM, García-Peñarrubia P. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 46-58

Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Jones N, Stretton

A, Thomas C, Richards A, Ivanov D, Widdowson C, Chapman J, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Beaumont H, Warden D, Wilcock G, Love S, Kehoe PG, Hooper NM, Vardy ER, Hardy J, Mead S, Fox NC, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, R  ther E, Schürmann B, Heun R, K  lsch H, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Gallacher J, H  ll M, Rujescu D, Giegling I, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, J  ckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, van Duijn CM, Breteler MM, Ikram MA, DeStefano AL, Fitzpatrick AL, Lopez O, Launer LJ, Seshadri S; CHARGE consortium, Berr C, Champion D, Epelbaum J, Dartigues JF, Tzourio C, Alperovitch A, Lathrop M; EADI1 consortium, Feulner TM, Friedrich P, Riehle C, Krawczak M, Schreiber S, Mayhaus M, Nicolhaus S, Wagenpfeil S, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Snaedal J, Bj  rnsson S, Jonsson PV, Chouraki V, Genier-Boley B, Hiltunen M, Soininen H, Combarros O, Zelenika D, Delepine M, Bullido MJ, Pasquier F, Mateo I, Frank-Garcia A, Porcellini E, Hanon O, Coto E, Alvarez V, Bosco P, Siciliano G, Mancuso M, Panza F, Solfrizzi V, Nacmias B, Sorbi S, Boss   P, Piccardi P, Arosio B, Annoni G, Seripa D, Pilotto A, Scarpini E, Galimberti D, Brice A, Hannequin D, Licastro F, Jones L, Holmans PA, Jonsson T, Riemenschneider M, Morgan K, Younkin SG, Owen MJ, O'Donovan M, Amouyel P, Williams J. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2011; 43: 429-435

Howard R, McShane R, Lindesay J, Ritchie C, Baldwin A, Barber R, Burns A, Dening T, Findlay D, Holmes C, Hughes A, Jacoby R, Jones R, Jones R, McKeith I, Macharouthu A, O'Brien J, Passmore P, Sheehan B, Juszczak E, Katona C, Hills R, Knapp M, Ballard C, Brown R, Banerjee S, Onions C, Griffin M, Adams J, Gray R, Johnson T, Bentham P, Phillips P. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2012; 366: 893-903

Hy LX, Keller DM. Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity. *Neurology* 2000; 55: 198-204

Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Suzuki A. The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* 1998; 273: 15866-15871

- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 2010; 142: 387-397
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2005: 348-349
- Jeffrey L, Cummings, MD. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 56-67
- Lajaunias F, Dayer JM, Chizzolini C. Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signalling. *Eur J Immunol* 2005; 35: 243-251
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6448-6453
- Linnartz B, Neumann H. Microglial activatory (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)- and inhibitory (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)-signaling receptors for recognition of the neuronal glycocalyx. *Glia* 2013; 61: 37-46
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich C. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Verlag, 2006; 568-571
- Malik M, Simpson JF, Parikh I, Wilfred BR, Fardo DW, Nelson PT, Estus S. CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci* 2013; 33: 13320-13325
- Masuhr KF, Neumann M. *Neurologie*. Stuttgart: Thieme Duale Reihe, 2007: 191-198
- Matutes E, Rodriguez B, Polli N, Tavares de Castro J, Parreira A, Andrews C, Griffin JD, Tindle RW, Catovsky D. Characterization of myeloid leukemias with monoclonal antibodies 3C5 and MY9. *Hematol Oncol* 1985; 3: 179-186
- McMillan SJ, Crocker PR. CD33-related sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in health and disease. *Carbohydr Res* 2008; 343: 2050-2056
- Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993; 43: 2412-2414
- Muchmore EA, Diaz S, Varki A. A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *Am J Phys Anthropol* 1998; 107: 187-198

- Naito, K, Takeshita, A, Shigeno, K, Nakamura, S, Fujisawa, S, Shinjo, K, Yoshida, H, Ohnishi K, Mori M, Terakawa S, and Ohno R. Calicheamicin-conjugated humanized anti-CD33 monoclonal antibody (gemtuzumab zogamicin, CMA-676) shows cytotoxic effect on CD33-positive leukemia cell lines, but is inactive on P-glycoprotein expressing sublines. *Leukemia* 2000; 14: 1436–1443
- Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N, Younkin SG, Cruchaga C, Kauwe JS, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huentelman MJ, Myers AJ, Barmada MM, Demirci FY, Baldwin CT, Green RC, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Arnold SE, Barber R, Beach T, Bigio EH, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Cairns NJ, Carlson CS, Carney RM, Carroll SL, Chui HC, Clark DG, Corneveaux J, Cotman CW, Cummings JL, DeCarli C, DeKosky ST, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson DW, Ellis WG, Faber KM, Fallon KB, Farlow MR, Ferris S, Frosch MP, Galasko DR, Ganguli M, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Gilman S, Giordani B, Glass JD, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Head E, Honig LS, Hulette CM, Hyman BT, Jicha GA, Jin LW, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Koo EH, Kowall NW, Lah JJ, Levey AI, Lieberman AP, Lopez OL, Mack WJ, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Parisi JE, Perl DP, Peskind E, Petersen RC, Poon WW, Quinn JF, Rajbhandary RA, Raskind M, Reisberg B, Ringman JM, Roberson ED, Rosenberg RN, Sano M, Schneider LS, Seeley W, Shelanski ML, Slifer MA, Smith CD, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Williamson J, Woltjer RL, Cantwell LB, Dombroski BA, Beekly D, Lunetta KL, Martin ER, Kamboh MI, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Hakonarson H, Kukull WA, Foroud TM, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Schellenberg GD. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2011; 43: 436-441
- Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 2009; 158: 1030-1038
- Napoli I, Kierdorf K, Neumann H. Microglial precursors derived from mouse embryonic stem cells. *Glia* 2009; 57: 1660-1671
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-1318

- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 34–47
- Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 1995; 310: 970-973
- Padler-Karavani V, Hurtado-Ziola N, Pu M, Yu H, Huang S, Muthana S, Chokhawala HA, Cao H, Secrest P, Friedmann-Morvinski D, Singer O, Ghaderi D, Verma IM, Liu YT, Messer K, Chen X, Varki A, Schwab R. Human xeno-autoantibodies against a non-human sialic acid serve as novel serum biomarkers and immunotherapeutics in cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 3352-3363
- Paul SP, Taylor LS, Stansbury EK, McVicar DW. Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* 2000; 96: 483-490
- Paulson JC, Macauley MS, Kawasaki N. Siglecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1253: 37-48
- Pérez-Oliva AB, Martínez-Esparza M, Vicente-Fernández JJ, Corral-San Miguel R, García-Peñarrubia P, Hernández-Caselles T. Epitope mapping, expression and post-translational modifications of two isoforms of CD33 (CD33M and CD33m) on lymphoid and myeloid human cells. *Glycobiology* 2011; 21: 757-770
- Qiu WQ, Ye Z, Kholodenko D, Seubert P, Selkoe DJ. Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 6641-6646
- Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 119-145
- Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 2010; 468: 253-262
- Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 429-439
- Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR. Morphology and toxicity of Aβ(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1996; 271: 20631-20635

- Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH, Mulnard R, Barakos J, Gregg KM, Liu E, Lieberburg I, Schenk D, Black R, Grundman M; Bapineuzumab 201 Clinical Trial Investigators. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 2009; 73: 2061-2070
- Savva GM, Wharton SB, Ince PG, Forster G, Matthews FE, Brayne C; Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. Age, neuropathology, and dementia. *N Engl J Med* 2009; 360: 2302-2309
- Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Lowenberg B, Dombret H, Karanes C, Theobald M, Bennett JM, Sherman ML, Berger MS, Eten CB, Loken MR, van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR; Mylotarg Study Group. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3244-3254
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872
- Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12045-12050
- Taylor VC, Buckley CD, Douglas M, Cody AJ, Simmons DL, Freeman SD. The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. *J Biol Chem* 1999; 274: 11505-11512
- Tchilian EZ, Beverley PC, Young BD, Watt SM. Molecular cloning of two isoforms of the murine homolog of the myeloid CD33 antigen. *Blood* 1994; 83: 3188-3198
- Thal DR, Rüb U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E, Del Tredici K, Braak E, Braak H. Sequence of A β -protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 733-748
- Ulyanova T, Blasioli J, Woodford-Thomas TA, Thomas ML. The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3440-3449
- Van der Velden VHJ, Te Mervelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS, Van Dongen JJM. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* 2001; 97: 3197-3204

- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009
- Von Gunten S, Bochner BS. Basic and clinical immunology of Siglecs. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 61-82
- Wang Y, Neumann H. Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11. *J Neurosci* 2010; 30: 3482-3488
- Zhou Y, Wang Y, Kovacs M, Jin J, Zhang J. Microglial activation induced by neurodegeneration: a proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1471-1479
- Ziegenfuss JS, Biswas R, Avery MA, Hong K, Sheehan AE, Yeung YG, Stanley ER, Freeman MR. Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. *Nature* 2008; 453: 935-939

7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. Harald Neumann für die Möglichkeit bedanken bei ihm zu promovieren. Es war eine sehr interessante und inspirierende Zeit, die ich in seinem Labor verbringen durfte. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dietmar R. Thal von der Universität Ulm für das zur Verfügung gestellte Hirngewebe. Mein Dank gilt auch der BONFOR-Kommission für die finanzielle Förderung des Projekts.

Bei Mona Mathews möchte ich mich für die Einführung in die Laborprozesse und Arbeitsweisen bedanken. Im Labor war sie jemand, auf den ich mich immer verlassen konnte.

Dr. Clara Beutner gilt mein besonderer Dank für die großartige Hilfestellung sowohl fachbezogen, als auch in der Freizeit.

Der gesamten AG Neumann möchte ich für ein immer hilfsbereites und freundschaftliches Arbeitsumfeld danken. Ich habe einige gute Freunde dort gefunden.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Dr. Dr. Ronald Grobe-Einsler und Ursula Maria Grobe-Einsler, für die bedingungslose und liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums, der Zeit davor und darüber hinaus. Für grenzenlose Geduld und Verständnis möchte ich mich auch bei meiner Freundin Amra Sulejmanovic bedanken. Ich kann nicht in Worte fassen wie sehr ihr mir weiter geholfen habt. Durch euch habe ich mich nie allein gefühlt.

Ohne Euch wäre dies alles nicht möglich gewesen!