

Siglec-16

Ein Rezeptor des angeborenen Immunsystems auf Mikroglia

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Johannes Peter Ackermann

aus Illertissen

2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Harald Neumann
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. W. S. Kunz

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.03.2016

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

Für meine Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
1.1 Das Immunsystem im zentralen Nervensystem	11
1.1.1 Das zentrale Nervensystem - Ein Organ mit einem besonderen Immunsystem. 11	
1.1.2 Die Zellen des zentralen Nervensystems..... 12	
1.1.3 Mikroglia - Die Immunzellen des zentralen Nervensystems..... 14	
1.1.4 Mikroglia - Funktion und Wirkung..... 15	
1.1.5 Mikroglia in vitro..... 17	
1.2 Siglecs	19
1.2.1 Sialinsäuren als Liganden der Siglec-Rezeptorfamilie	19
1.2.2 Siglecs - Einteilung und Funktion	20
1.2.3 Siglec-16.....	23
1.3 Transgene Mausmodelle.....	26
1.3.1 Genetisch veränderte Tiermodelle	26
1.3.2 Die Erzeugung eines transgenen Mausmodells mittels pronukleärer Injektion... 27	
1.3.3 Methoden zur selektiven Genexpression im genetisch veränderten Tiermodell. 29	
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Reagenzien	31
2.1.2 Enzyme.....	32
2.1.3 Puffer und Lösungen	33
2.1.4 Kits.....	34
2.1.5 Zellkulturmedien	35
2.1.6 Primer	35
2.1.7 Antikörper	36
2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.9 Technische Ausrüstung.....	37
2.1.10 Software	37
2.2 Methoden.....	38

2.2.1	Isolation von RNA und DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	38
2.2.2	Umschreibung von RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase	38
2.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.4	Quantitative real-time PCR.....	39
2.2.5	Transformation und Vervielfältigung von Plasmiden	39
2.2.6	Zellkultur.....	40
2.2.7	Genotypisierung von humanem Gewebe	41
2.2.8	Nachweis von Siglec-16-Gentranskript in humanem Hirngewebe	48
2.2.9	Nachweis von Siglec-16 auf humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM)	48
2.2.10	Bestimmung des Einflusses von Immunstimulation auf die Genexpression von Siglec-16 in humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM).....	48
2.2.11	Die Klonierung des pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP-Plasmids	49
2.2.12	Überexpression von Siglec-16 auf HEK 293 T Zellen	50
2.2.13	Erzeugung von lentiviralen Partikeln	50
2.2.14	Lentivirale Transduktion der murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM).....	51
2.2.15	FACS-sorting.....	52
2.2.16	Einfluss von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1 in murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM)	52
2.2.17	Beads Phagozytose Assay.....	53
2.2.18	Klonierung des Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmids	53
2.2.19	Isolierung des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens.....	55
2.2.20	Pronukleäre Injektion des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens	56
2.2.21	Bestimmung des Genotyps der Siglec-16 transgenen Mäuse	56
2.2.22	Bestimmung der Anzahl der integrierten Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgene	57
2.2.23	Southern Blot.....	57
2.2.24	Expression von Siglec-16 in verschiedenen Geweben der transgenen Maus	58
2.2.25	Isolation von Mikroglia aus murinem Hirngewebe.....	59
2.2.26	Einfluss von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α und IL-1 β im transgenen Mausmodell	60

2.2.27	Statistische Analyse	61
2.2.28	Versuchsgenehmigungen.....	61
2.2.29	Fremdabbildungen	61
3.	Ergebnisse	62
3.1	Untersuchung von Siglec-16 in humanem Hirngewebe und in humanen Mikroglia-Zelllinien	62
3.1.1	Bestimmung des Genotyps und Analyse der Allelfrequenz von Siglec-16 in humanem Hirngewebe	62
3.1.2	Nachweis von Siglec-16-Gentranskript in humanem Hirngewebe	63
3.1.3	Nachweis von Siglec-16 auf humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM)	65
3.1.4	Einfluss von Immunstimulation auf die Genexpression von Siglec-16 in humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM).....	67
3.2	Untersuchung von Siglec-16 auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM).....	68
3.2.1	Das pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-GFP-Plasmid	68
3.2.2	Überexpression von Siglec-16 auf HEK 293 T Zellen	70
3.2.3	Überexpression von Siglec-16 auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM).....	71
3.2.4	Isolierung der EGFP-positiven Mikroglia (ESdM) mittels FACS-Sorting	72
3.2.5	Einfluss von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1	74
3.2.6	Einfluss von Siglec-16 auf die Phagozytoserate von Mikroglia	76
3.3	Generierung eines Siglec-16 transgenen Mausmodells	78
3.3.1	Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid	78
3.3.2	Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen.....	78
3.3.3	Generierung der Iba1-Siglec-16-WPRE transgenen Maus und Genotypisierung der ersten Generation.....	79
3.3.4	Bestimmung der Anzahl der in das Genom der Maus integrierten Siglec-16- Transgene	81
3.3.5	Nachweis einer Integration des Siglec-16-Transgens in das Genom der Maus mit Hilfe des Southern Blots	82

3.3.6	Untersuchung der Expression von Siglec-16 in den verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie 75	84
3.3.7	Nachweis einer Expression von Siglec-16 auf isolierten Mikroglia der transgenen Mauslinie 75	85
3.3.8	Untersuchung des Einflusses von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α und IL-1 β im Siglec-16 transgenen Mausmodell	87
4.	Diskussion	89
4.1	Bestimmung von Genotyp und Allelfrequenz des Siglec-16-Gens	89
4.2	Nachweis von Siglec-16 in humanem Gewebe.....	90
4.2.1	Nachweis von Siglec-16 in humanem Hirngewebe	90
4.2.2	Nachweis von Siglec-16 auf humaner Mikroglia	92
4.3	Expression von Siglec-16 im murinen Modellorganismus.....	93
4.3.1	Expression von Siglec-16 auf murinen Mikroglia in Zellkultur	93
4.3.2	Expression von Siglec-16 auf murinen Mikroglia im transgenen Mausmodell	94
4.3.3	Die Expression von Siglec-16 zeigt in vitro und in vivo vergleichbare Ergebnisse	95
4.4	Regulation, Funktion und Wirkung von Siglec-16.....	96
4.4.1	Siglec-16 steigert die Phagozytoserate von Mikroglia.....	96
4.4.2	Siglec-16 senkt die Expression von TNF- α und IL-1 β in vitro und in vivo	97
4.4.3	LPS erhöht die Expression von Siglec-16 auf humaner Mikroglia	98
4.4.4	Siglec-16 bewirkt eine Abschwächung der durch LPS induzierten Entzündungsreaktion.....	99
4.5	Ausblick.....	100
5.	Zusammenfassung.....	102
6.	Literaturverzeichnis	103
7.	Danksagung	112

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BP	Basenpaar
CD14	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CMAH	Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-like protein
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CT-Wert	Cycle treshhold
DAP12	DNAX-associated protein of 12 kDa
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytosine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EF1a	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ESdM	Embryonic Stem Cell derived Microglia
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEK	Human Embryonic Kidney Zellen
HRP	Horseradish peroxidase
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
iPSdM	Induced Pluripotent Stem Cell derived Microglia
IRES	Internal ribosomal entry site
IRF3	Interferon regulatory factor 3

ITAM	Immunoreceptor tyrosin based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosin based inhibition motif
LPS	Lipopolysaccharid
MD2	Myeloid differentiation factor 2
MAP3	Mitogen-activated protein 3
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonucleic acid
SHP-1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SHP-2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2
SNP	Single nucleotide polymorphism
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Post-Transcriptional Regulatory Element
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem im zentralen Nervensystem

1.1.1 Das zentrale Nervensystem - Ein Organ mit einem besonderen Immunsystem

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist das zentrale Integrationsorgan des Menschen. Es organisiert und steuert eine Vielzahl von Körperfunktionen und ist an nahezu allen physiologischen Prozessen beteiligt. Aufgrund dieser übergeordneten Stellung wird seine Funktion durch zahlreiche Schutzmechanismen sichergestellt. So ist das Gehirn durch den knöchernen Schädel, die Hirnhäute und die beinahe schwerelose Lage im Liquor gegen äußere Einflüsse geschützt. Darüber hinaus wird durch die mechanische Barriere der Blut-Hirn-Schranke das Gehirn zusätzlich vom restlichen Organismus abgeschirmt (siehe Abb. 1) (Tortora und Derrickson, 2006).

Insbesondere die spezielle Funktionsweise des Immunsystems im ZNS stellt einen wichtigen Faktor in der Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase und Funktionsfähigkeit dar. Dabei nimmt es im Vergleich zu der Immunantwort des restlichen Organismus eine Sonderstellung ein (Ransohoff und Engelhardt, 2012). Diese wird als das sogenannte ‚immunologische Privileg‘ (immunological privilege) bezeichnet (Barker und Billingham, 1977). Darunter versteht man eine strenge Kontrolle des Immunsystems, durch die eine übermäßige Immunreaktion auf Pathogene verhindert wird und damit das empfindliche und nur mäßig regenerationsfähige neuronale Gewebe geschützt wird. Dies erfolgt durch die fehlende oder verzögerte Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten und durch die Herstellung und Aufrechterhaltung eines entzündungshemmenden Milieus, welches die Immunzellen des ZNS in einem nicht inflammatorischen Zustand hält (Galea et al., 2007). Das perfekte Zusammenspiel dieser einzelnen Faktoren gewährleistet die Integrität des gesamten menschlichen Körpers. Hierbei kommt Mikroglia als spezialisierten Immunzellen des zentralen Nervensystems eine bedeutende Rolle zu (Neumann und Wekerl, 2013).

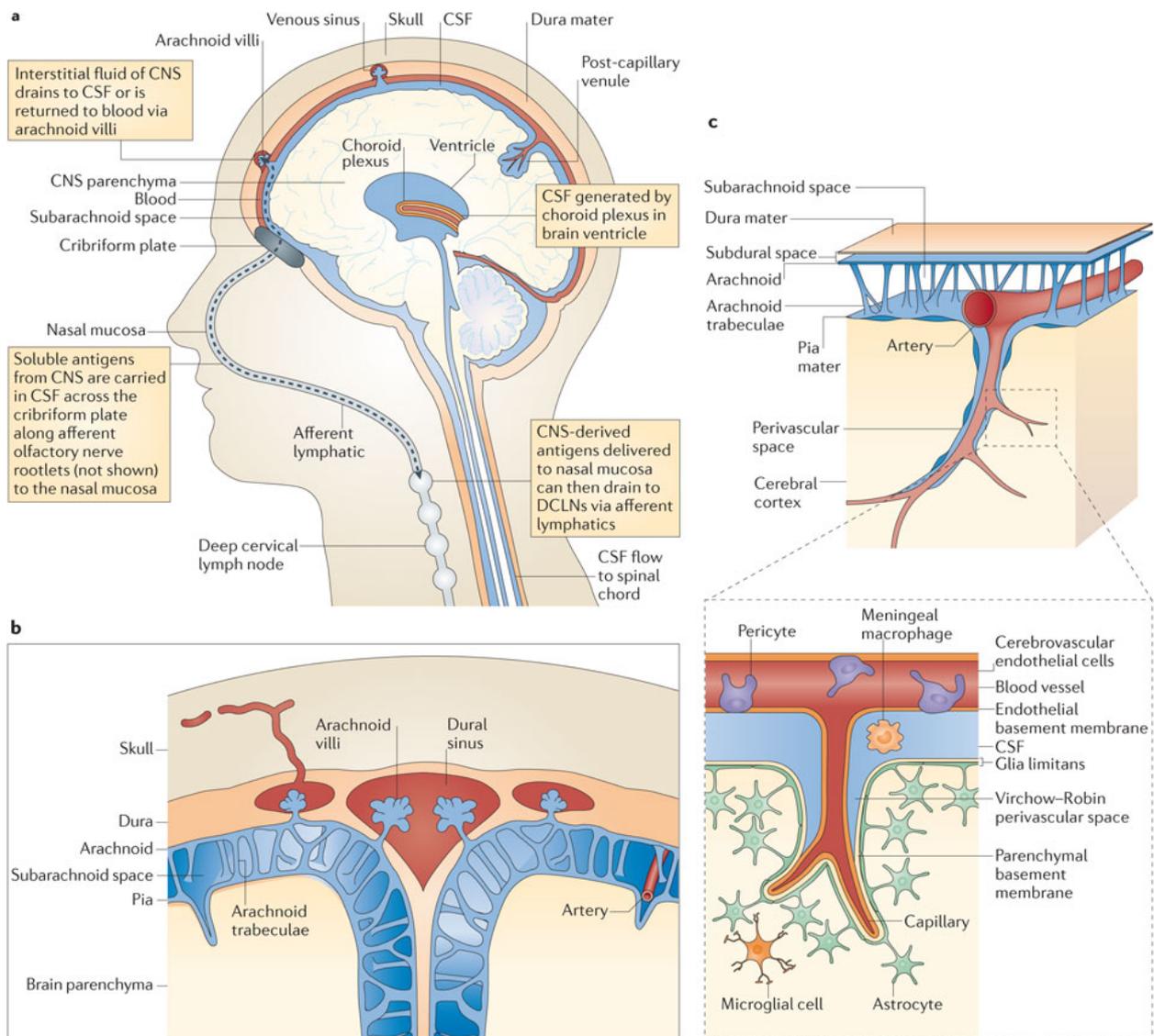


Abb. 1: Darstellung der anatomischen Strukturen im ZNS, die am Zustandekommen der besonderen Immunsituation beteiligt sind (aus Ransohoff und Engelhardt, 2012).

1.1.2 Die Zellen des zentralen Nervensystems

Das neuronale Gewebe von Gehirn und Rückenmark setzt sich aus zahlreichen hochspezialisierten Zellen zusammen. Diese werden in Neurone, Makroglia und Mikroglia unterteilt (Drenckhahn et al., 2004) (siehe Abb. 2).

Neurone sind elektrisch erregbare Zellen und bilden mittels Synapsen und Nervenfasern (Axone) ein komplexes Netz, das der Reizaufnahme, -weiterleitung und -verarbeitung dient (Drenckhahn et al., 2004).

Unter dem Begriff Makroglia werden Astrozyten und Oligodendrozyten zusammengefasst. Astrozyten übernehmen im ZNS regulatorische Funktionen wie die Steuerung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes. Darüber hinaus sind sie an der Informationsverarbeitung der Nervenzellen und durch Bildung der Membrana limitans glialis perivascularis an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden der Nervenfasern im ZNS und haben so eine wichtige Funktion bei der Weiterleitung der Aktionspotentiale (Drenckhahn et al., 2004).

Eine weitere Zellpopulation des Gehirns stellt die Gruppe der Mikroglia dar. Mikroglia sind als Immunzellen des ZNS wesentlich am Aufrechterhalten der Homöostase durch die Aufnahme von Zelltrümmern und Neurotransmittern sowie an der Herstellung eines entzündungshemmenden Milieus beteiligt. Während Krankheitsprozessen kommt ihnen die Mediation der Immunantwort zu (Prinz und Priller, 2014).

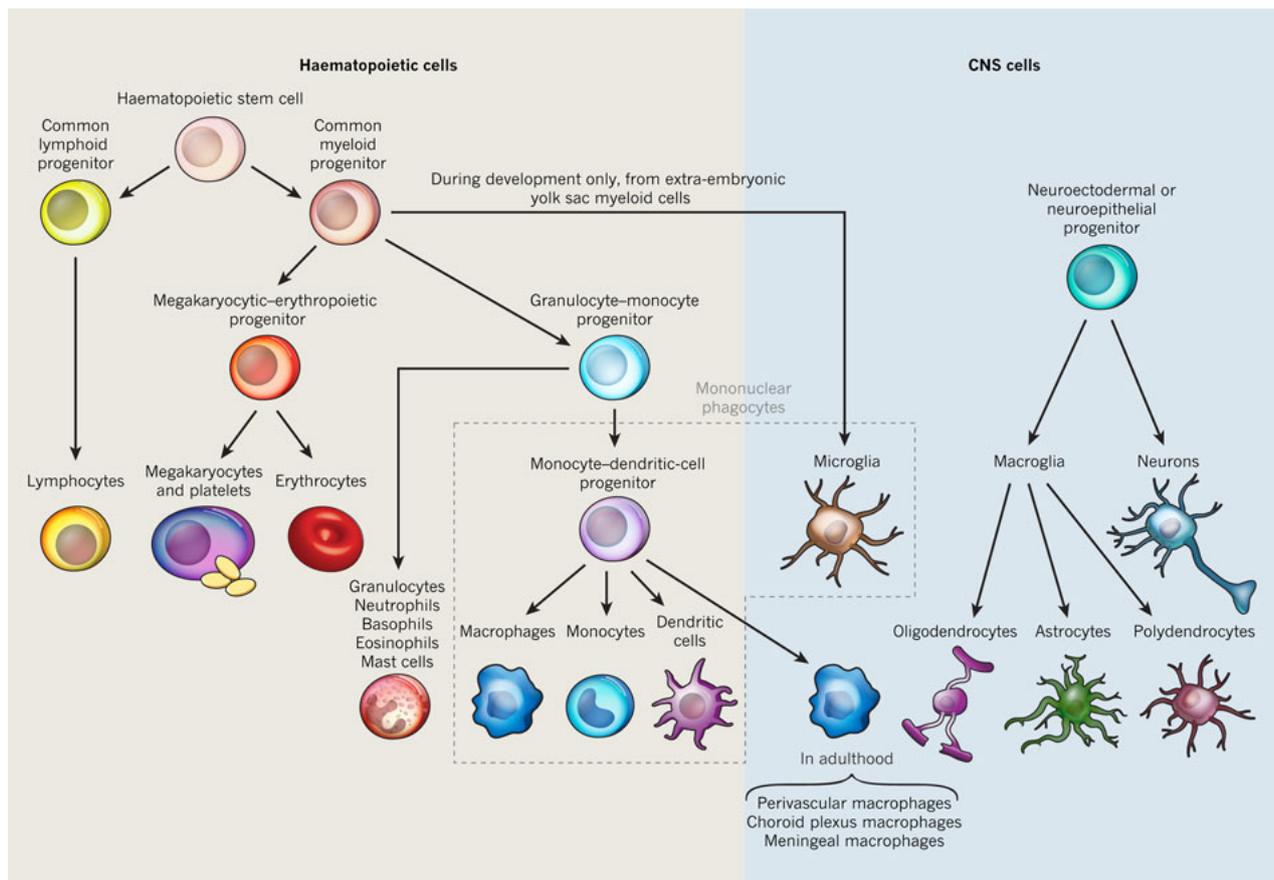


Abb. 2: Schematische Darstellung der einzelnen Zelltypen des ZNS und deren Vorläuferzellen (aus Ransohoff und Cardona, 2010).

1.1.3 Mikroglia - Die Immunzellen des zentralen Nervensystems

Mikroglia sind die ortsständigen Makrophagen des zentralen Nervensystems und stellen im Gesunden die einzigen Zellen des Immunsystems im neuronalen Gewebe dar (Biber et al., 2007). Sie finden sich in großer Zahl in allen Teilen von Gehirn und Rückenmark, wobei lokal große Variationen der Zellzahl von 5 % im Cortex bis zu 12 % im Corpus Callosum auftreten (Lawson et al., 1990).

Mikrogliale Vorläuferzellen entstehen im Dottersack noch vor dem Auftreten einer Hämatogenese in Leber und Knochenmark (Ginhoux et al., 2010). Von dort wandern sie, nach Etablierung der Blutzirkulation, in das neurale Ektoderm ein (Ginhoux et al., 2010; Kierdorf et al., 2012). Hier proliferieren die Zellen stark und verteilen sich in den verschiedenen Regionen des ZNS. Dort verbleiben sie für den Rest des Lebens und erneuern sich lediglich durch Proliferation aus der eigenen Zellreihe (Ajami et al., 2007; Mildner et al., 2007) (siehe Abb. 4). Dies erscheint einzigartig im menschlichen Organismus, in dem embryonale Gewebemakrophagen im Laufe der Entwicklung größtenteils durch fetale myeloische Zellen ersetzt werden (Ginhoux et al., 2013; Schelper und Adrian, 1986). Somit stellen Mikroglia eine sehr spezielle Zellpopulation mit spezifischen Aufgaben in einem hoch empfindlichen neuronalen Milieu dar und sind nur begrenzt mit anderen organspezifischen Makrophagen vergleichbar (Neumann und Wekerl, 2013; Sierra et al., 2013).

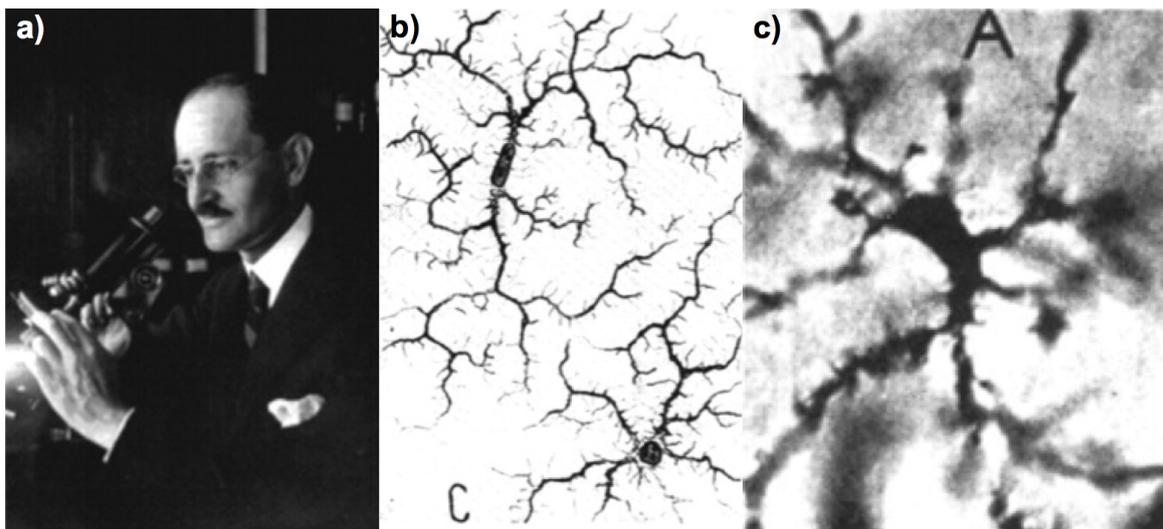


Abb. 3: Die Entdeckung der Mikroglia durch Pio del Rio Hortega. (Bilder modifiziert aus Kettenmann et al., 2011) a) Pio del Rio Hortega (1882-1945) b) Zeichnung von ramifizierten Mikroglia (aus del Rio Hortega 1919) c) Mikroskopische Fotografie einer mittels Silber-Carbonat-Methode angefärbter typischer ramifizierter Mikroglia (aus del Rio Hortega, 1932).

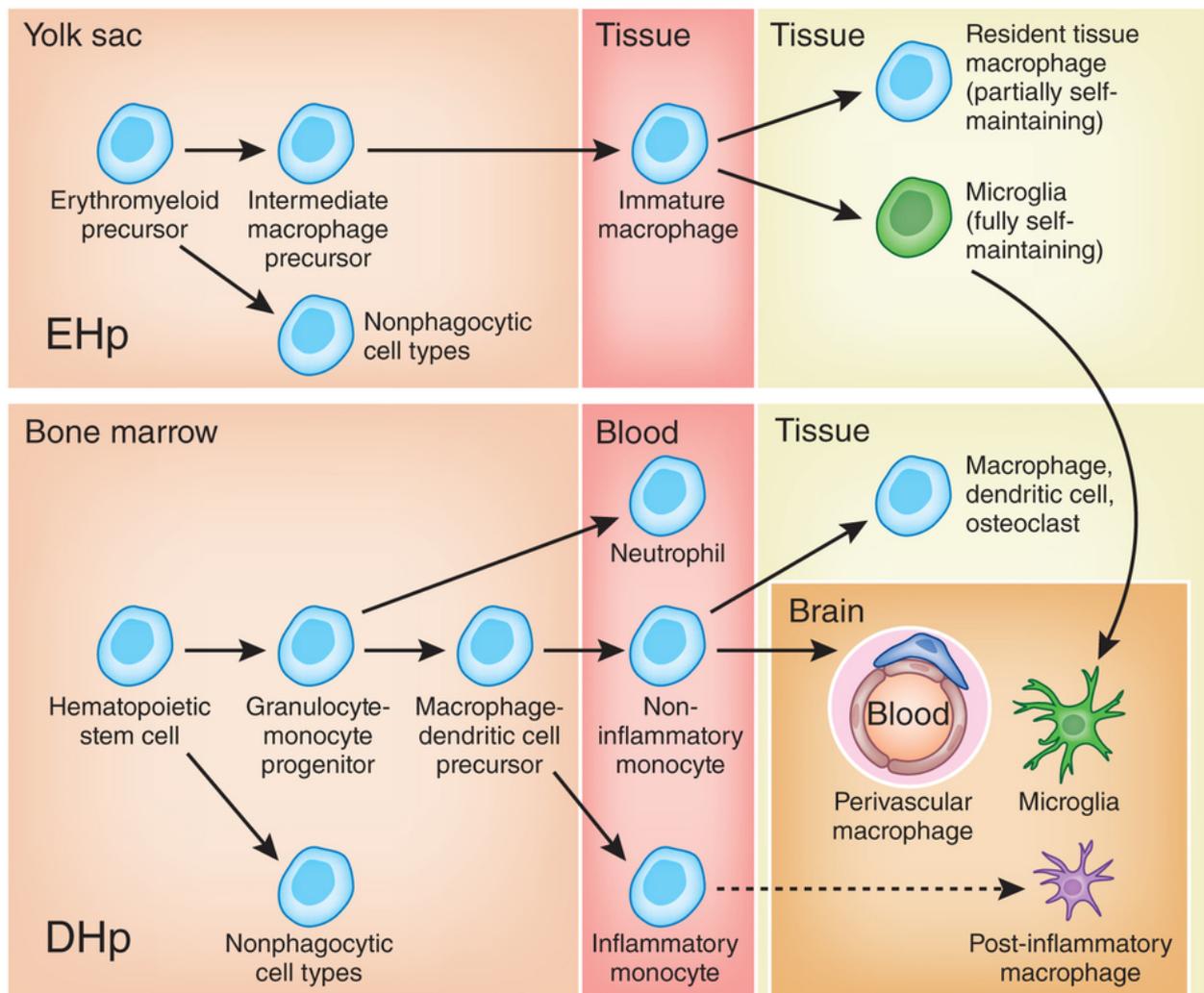


Abb. 4: Schematische Darstellung der Entstehung und Einwanderung von Mikroglia in das ZNS aus embryonalen Vorläuferzellen aus dem Dottersack. Im Gegensatz zu anderen gewebsspezifischen Makrophagen findet die Zellerneuerung von Mikroglia komplett aus der eigenen Population statt. Lediglich nach Zuständen mit unterbrochener Blut-Hirn-Schranke kommt es zu einer Einwanderung von im Knochenmark entstandenen monozytären Zellen (aus Neumann und Wekerl, 2013).

1.1.4 Mikroglia - Funktion und Wirkung

Während der Entwicklung des menschlichen Organismus übernehmen Mikroglia sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zuständen wichtige Aufgaben. Ihre Hauptaufgaben bestehen hierbei in der Phagozytose von apoptotischen Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen, sowie in der Mediation von Entzündungsprozessen (Kettenmann et al., 2011).

Im Gesunden bilden Mikroglia mit ihren Fortsätzen untereinander ein durch das gesamte zentrale Nervensystem gespanntes Netz. Damit tasten sie permanent ihre Umgebung nach potentiellen Pathogenen und apoptotischen Zellen ab (Boche et al., 2013; Nimmerjahn et al., 2005).

Mit Hilfe spezifischer Rezeptoren sind sie in der Lage apoptotisches Material oder Bestandteile von Synapsen zu erkennen und diese ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen zu phagozytieren (Dalmau et al., 2003; Schafer et al., 2012). Die Aufnahme von apoptotischem Material ohne das Auslösen einer Entzündungsreaktion ist dabei essenziell für die Gesundheit des umgebenden Gewebes (Sierra et al., 2010).

Durch das Abräumen von inaktiven Synapsen, die Überwachung der Neurogenese, sowie die Kontrolle von Zelltod sind Mikroglia aktiv am Zustandekommen von neuronalen Verschaltungen und der neuronalen Plastizität, also an Lern- und Denkprozessen, beteiligt (Spalding et al., 2013; Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2013). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine pränatale Inflammation beim Auftreten von neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie der Schizophrenie und autistischen Verhaltensstörungen, eine Rolle spielen kann (Patterson, 2009; Patterson, 2011).

Als ortsständige Immunzellen sind Mikroglia an pathologischen Zuständen im neuronalen Gewebe involviert. Auf Grund dessen kommt ihnen eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf verschiedener neuronaler Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose, Morbus Parkinson und amyotrophe Lateralsklerose zu. Ob sie hierbei krankheitsfördernd oder neuroprotektiv wirken, ist Gegenstand aktueller Diskussionen (Frakes et al., 2014; Long-Smith et al., 2009; Solito und Sastre, 2012). Während bei der Multiplen Sklerose die Beseitigung von Myelintrümmerteilen mittels Phagozytose wichtig für eine axonale Remyelinisierung und neuronale Regeneration ist (Napoli und Neumann, 2010), spielt bei der Motoneuronenerkrankung Amyotrophe Lateralsklerose die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Sauerstoffradikalen eine Rolle beim Untergang der neuronalen Zellen und dem Fortschreiten der Erkrankung (Brites und Vaz, 2014). Der Einfluss von Mikroglia in den verschiedenen Krankheitszusammenhängen bleibt jedoch oft widersprüchlich und bedarf weiterer Untersuchungen, um ihre Wirkungsweise besser verstehen zu können.

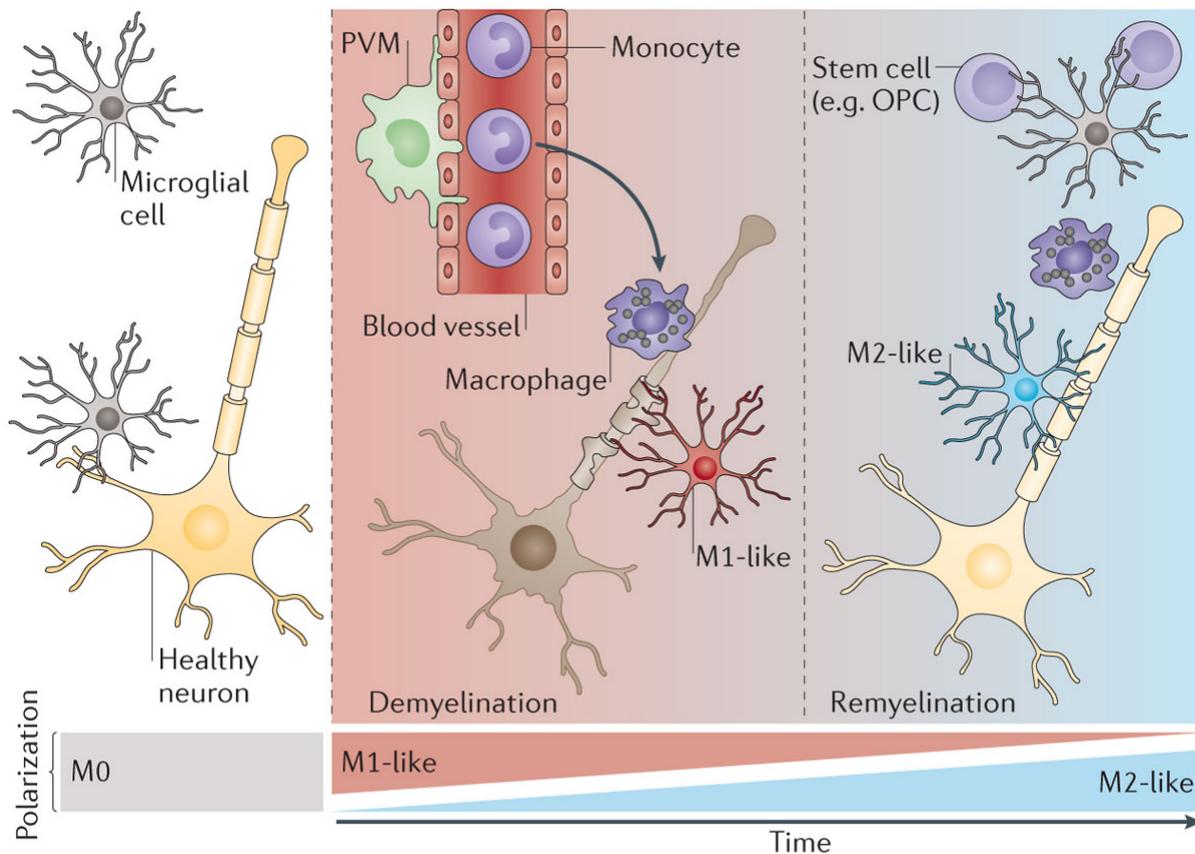


Abb. 5: Schematische Darstellung von Funktion und Polarisationszuständen von Mikroglia in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes. Unter physiologischen Bedingungen tasten Mikroglia permanent ihre Umgebung ab und überwachen die Aufrechterhaltung der Homöostase. In Anlehnung an das Aktivierungsmodell von peripheren Makrophagen wird dieser Zustand M0 genannt. Bei Kontakt mit Pathogenen kommt es, je nach Auslöser, zu einer der M1- oder M2- Polarisation ähnlichen Aktivierung der Mikroglia. Bei der M1-Aktivierung werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt, welche eine Entzündungsreaktion in Gang setzen. Eine M2-Polarisierung hingegen erzeugt ein antiinflammatorisches Milieu, welches eine Aktivierung von Stammzellen und eine Remyelinisierung fördert (aus Prinz und Priller, 2014).

1.1.5 Mikroglia in vitro

Um grundsätzliche Funktionen von Zellen und Rezeptoren sowie deren gegenseitigen Interaktionen besser verstehen zu können, sind Versuche in Zellkulturmodellen von großem Interesse. Der Vorteil der Zellkultur besteht vor allem in der einfachen Handhabung unter standardisierten Bedingungen, der guten Reproduzierbarkeit, den niedrigen Kosten und nicht zuletzt in der Möglichkeit die Anzahl von Tierversuchen zu reduzieren oder diese durch eine präzisere Fragestellung durch Vorversuche in vitro zu optimieren.

Für die Untersuchung von Mikroglia waren bis vor wenigen Jahren die Anzahl und die Qualität der Zellkultursysteme stark begrenzt. Durch neue Erkenntnisse in der Differenzierung von spezifischen Zelllinien aus embryonalen Stammzellen war es möglich neue Mikrogliazelllinien zu generieren (Beutner et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass diese neuen Mikrogliazelllinien in Morphologie, Oberflächenmarkern und Genexpression mit aus Maushirnen isolierten Mikroglia in weiten Teilen vergleichbar sind. Durch eine hohe Proliferationsrate und Zellstabilität eignen sie sich gut für Untersuchungen von Mikroglia in vitro (Beutner et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden diese aus murinen embryonalen Stammzellen erzeugten Mikroglia (ESdM) verwendet (Beutner et al., 2010) (siehe Abb. 6).

Die Erzeugung von Mikrogliazelllinien aus humanen embryonalen Stammzellen ist hingegen aufgrund ethischer und rechtlicher Aspekte problematisch. Die Entdeckung einer induzierten Reprogrammierung von ausgereiften humanen Fibroblasten in pluripotente Stammzellen (iPS) ermöglicht hierbei einen Lösungsansatz (Takahashi und Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). In dieser Arbeit wurden aus induzierten Stammzellen generierte Mikrogliazelllinien (iPSdM) verwendet (generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. Kristin Roy und Mona Mathews; bisher nicht publiziert). Da es sich hierbei um ein sehr neues Verfahren handelt, ist die Vergleichbarkeit der so generierten Zellen mit humanen Zellen in vivo noch nicht abschließend geklärt.

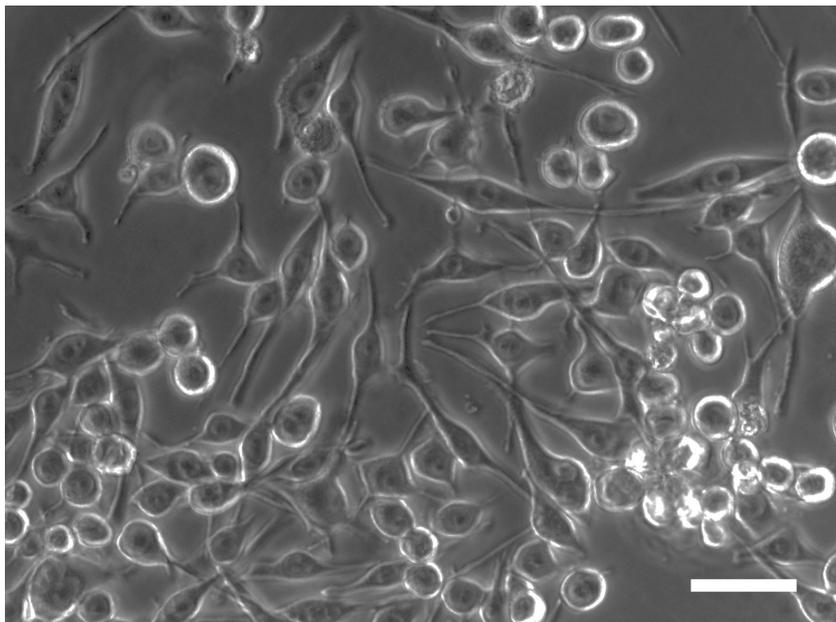


Abb. 6: ESdM in Zellkultur. Die Zellen besitzen das typische Aussehen mit rundlichem Zellkörper und mehreren Fortsätzen (Maßstab 12,5 µm).

1.2 Siglecs

1.2.1 Sialinsäuren als Liganden der Siglec-Rezeptorfamilie

Das Erkennen von körpereigenen oder körperfremden Strukturen durch eine Vielzahl von Rezeptoren ist ein zentraler Mechanismus der Funktionsweise des Immunsystems. Die Rezeptor-Liganden-Interaktion erfolgt dabei nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und hat neben dem Erkennen von Pathogenen noch weitere Aufgaben, wie Zelladhäsion, -interaktion, -aktivierung und -inhibierung. Kohlenhydraten kommt hierbei als Erkennungsmolekülen eine bedeutende Rolle zu (Pillai et al., 2012).

Ein im menschlichen Körper häufig vorkommendes Kohlenhydrat ist die Sialinsäure. Unter dem Oberbegriff Sialinsäuren wird eine Familie von Zuckern mit 9 Kohlenstoffatomen zusammengefasst, welche evolutionsbiologisch erstmalig in Vertebraten gebildet wurden (siehe Abb. 7). Die negativ geladenen Kohlenhydrate bekleiden die Enden von einer Vielzahl an Glykokonjugaten, wie N-verknüpfte Zuckerketten auf Proteinen, O-verknüpfte Muzinketten, Glykosphingolipiden und sind somit Bestandteil der Oberflächenglykokalyx von Zellen (Varki und Schauer, 2009). Interessanterweise haben aber auch einige mikrobiologische Pathogene die Fähigkeit zur Expression von Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche entwickelt, um so vor dem wirtseigenen Immunsystem unentdeckt zu bleiben.

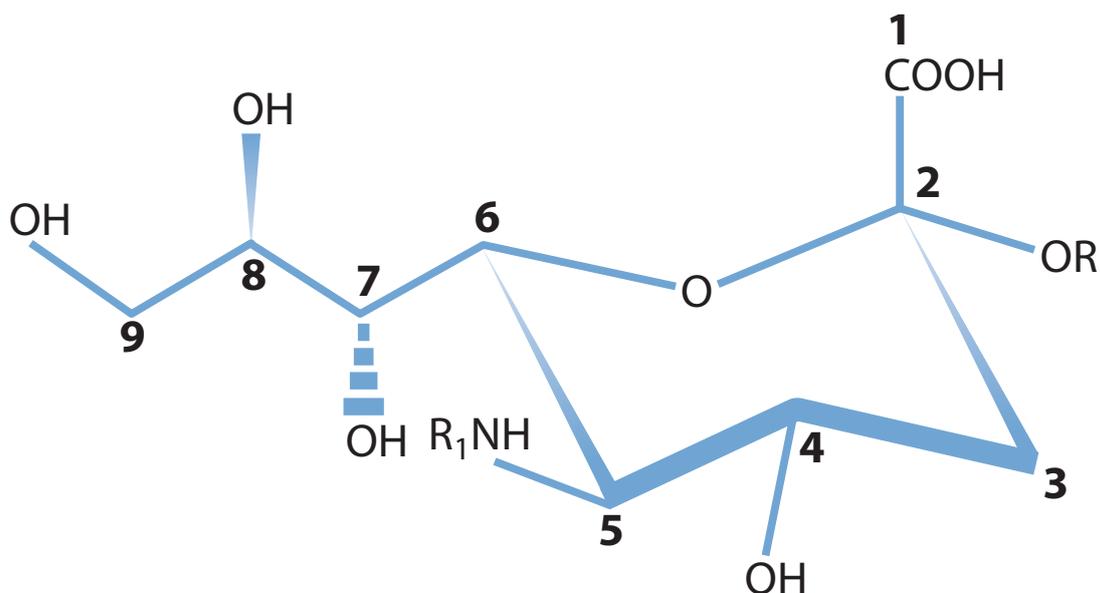


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Sialinsäure. Das erste Kohlenstoffatom ist das carboxylierte C-Atom. Die restlichen Kohlenstoffatome bilden zwischen C-2 und C-6 einen Ring aus. An C-6 hängen C-7 bis C-9 als Seitenkette an (aus Pillai et al., 2012).

Für die Rezeptorklasse der Siglecs spielen die Neuramidinsäuren die größte Rolle. Diese Sialinsäuren zeichnen sich durch eine N-Acetylierung des C-5 Kohlenstoffatoms mit einer Aminosäure aus. In den meisten Vertebraten kann durch das Enzym CMAH (Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-like protein) die Acetylgruppe durch eine N-Glykosylgruppe ersetzt werden und so die N-Glykolyneuraminsäure gebildet werden. Im menschlichen Organismus ist CMAH nicht funktionsfähig. Welche Folge diese fehlende Bildung hat ist ebenso Gegenstand von Untersuchungen, wie die Frage nach dem Einfluss von über die Nahrung aufgenommenen, dem menschlichen Organismus aber unbekanntem, N-Glykolyneuraminsäuren (Pillai et al., 2012; Varki und Schauer, 2009).

1.2.2 Siglecs - Einteilung und Funktion

Siglec ist die Abkürzung für ‚Sialic acid-binding Ig-like lectin‘ und bezeichnet eine Familie von Transmembranrezeptoren, welche spezifisch an Sialinsäuren binden. Sie gehören zur Familie der I-type Lektine, welche ihre Ligandenbindung über eine den Immunglobulinen ähnliche Proteinstruktur erreichen (Crocker et al., 1998). Siglecs werden hauptsächlich auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise der Mikroglia, gebildet (Crocker et al., 2007).

Siglecs sind Transmembranproteine vom Typ I. Alle Siglecs besitzen an ihrem N-terminalen extrazellulären Ende eine Ig-like Domäne, welche große Ähnlichkeit mit der Ig V Region (variable Region des Immunglobulins) aufweist. Der Ig V Region folgen je nach Siglec eine bis sechzehn Ig C-2 Regionen (konstante Region des Immunglobulins). Die Ig V Domäne ist hierbei zusammen mit der ersten Ig C-2 Domäne für die Sialinsäurebindung verantwortlich. Ihr intrazellulärer Teil vermittelt die Funktions- und Wirkungsweise des Rezeptors nach Ligandenbindung (Pillai et al., 2012; Zaccai et al., 2003).

Klassischerweise werden Siglecs nach ihrer evolutionären Konservierung eingeteilt. Die erste Gruppe umfasst die stabil in den verschiedenen Spezies konservierten Siglecs. Diese sind Siglec-1, -2, -4 und -15. Sie sind untereinander in Funktion und Struktur sehr heterogen, kommen aber sowohl im Menschen als auch in weiteren Vertebraten vor (Crocker et al., 2007). Die zweite Gruppe besteht aus Siglec-3 (CD33) und den mit Siglec-3 verwandten Siglecs. Im menschlichen Organismus sind dies Siglec-3, -5, -6, -7,

-8, -9-, -10, -11, -12, -14 und -16 und bei der Maus Siglec-E, -F, -G, -H. Innerhalb einer Spezies sind sie sehr homolog und stimmen zu 50-85 % in ihrer DNA-Sequenz überein. Dahingegen unterscheiden sie sich zwischen den verschiedenen Arten, so dass eine jede ihren eigenen speziesspezifischen Rezeptorsatz besitzt (daher die unterschiedliche Nomenklatur bei Mensch und Maus). Der Grund für diese Unterschiedlichkeit liegt in einem stetigen und relativ schnellen evolutionären Wandel, welcher durch eine besondere Anordnung und Genstruktur der mit Siglec-3 verwandten Siglecs auf einem einzigen Chromosom verursacht wird (Cao und Crocker, 2010). Die evolutionäre Vielfalt ist hierbei ein sehr interessanter Aspekt der Siglec-Rezeptorfamilie, da in der genetischen Unterschiedlichkeit zwischen Mensch und anderen Spezies, bei ansonsten großer Homologie, eine der Ursachen für die verschiedenen Ausprägungen zu finden ist (Pillai et al., 2012; Crocker et al., 2007).

Eine alternative Einteilung der Siglecs berücksichtigt ihre verschiedenartige Funktions- und Wirkungsweise. Hierbei können drei Gruppen unterschieden werden (Pillai et al., 2012). Die erste Gruppe umfasst Siglec-1 und -4 (siehe Abb. 8). Diese sind am Zustandekommen von Zelladhäsion beteiligt und besitzen an ihrem intrazellulären Teil keine für eine Signaltransduktion notwendige Struktur (Pillai et al., 2012).

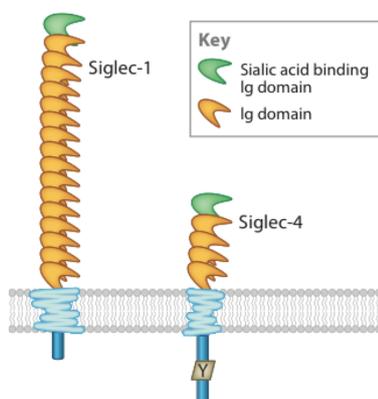


Abb. 8: Gruppe 1 der Siglecs. Sie enthält Siglec-1 und -4. Sie sind am Zustandekommen von Zelladhäsion beteiligt (aus Pillai et al., 2012).

In der zweiten Gruppe werden Siglecs mit einem oder mehreren intrazellulären ITIM (immunoreceptor tyrosin based inhibition motif) und ITIM-like Motiven zusammengefasst. Sie ist die größte Gruppe und umfasst Siglec-2, -3, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11 und 12 (siehe Abb. 9). Bei Ligandenbindung kommt es zu einer Phosphorylierung der Tyro-

sinreste innerhalb des ITIM, welche eine SHP-1- oder SHP-2- (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1/2) vermittelte Signaltransduktion auslöst. Hierdurch wird eine Inhibierung von Immunzellen sowie eine Reduktion der Phagozytoserate und des Zellumsatzes erzeugt (Linnartz und Neumann, 2013; Pillai et al., 2012; Varki und Gagneux, 2012).

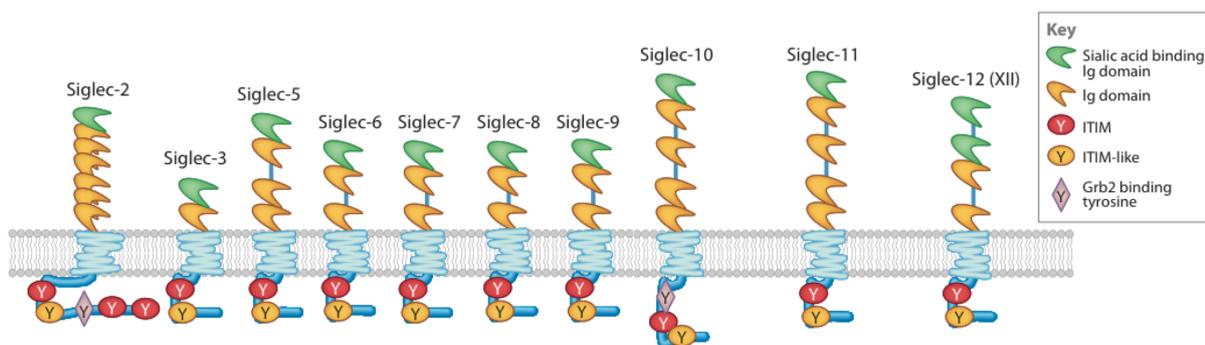


Abb. 9: Gruppe 2 der Siglecs. Sie enthält Siglec-2, -3, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11 und -12. Diese Siglecs besitzen eine intrazelluläre ITIM Domäne. Über diese setzen sie ein SHP1- und SHP2-vermittelte inhibierende Signalkaskade in Gang (aus Pillai et al., 2012).

In der dritten Gruppe werden Siglecs zusammengefasst, welche ihre Signaltransduktion über das Transmembranadaptermolekül DAP12 (DNAX-associated protein of 12 kDa) vermitteln. Sie umfasst Siglec-14, -15, und -16 (siehe Abb. 10). DAP12 enthält an seinem intrazellulären Teil ein ITAM (immunoreceptor tyrosin based activation motif) (Pillai et al., 2012). Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch eine erhöhte Zugänglichkeit des ITAMs für Tyrosinkinase und somit eine Phosphorylierung der Tyrosinreste erfolgt. Damit wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche zu einer Aktivierung und Differenzierung der Immunzelle mit Verstärkung der Phagozytose und Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt. Interessanterweise konnte für mit DAP12 assoziierte Rezeptoren aber auch eine inhibierende Wirkung, wie die Abschwächung der Toll-like Rezeptor (TLR) induzierten Entzündungsreaktion und eine verminderte Freisetzung von Entzündungsmediatoren, gezeigt werden (Hamerman et al., 2005; Pillai et al., 2012; Turnbull und Colonna, 2007). Wie das Transmembranadaptermolekül DAP12 sowohl eine aktivierende als auch hemmende Signalkaskade auslösen kann, ist noch nicht vollständig geklärt. Aktuelle Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass eine schwache und monovalente Rezeptor-Liganden-Bindung eine Hemmung der Wirkung anderer aktivierender Rezeptoren ver-

mitteln kann. Im Gegensatz dazu führt eine starke und polyvalente Bindung zu einer Aktivierung und Verstärkung der Immunreaktion (Ivashkiv et al., 2011; Pfirsch-Maisonnas et al., 2011).

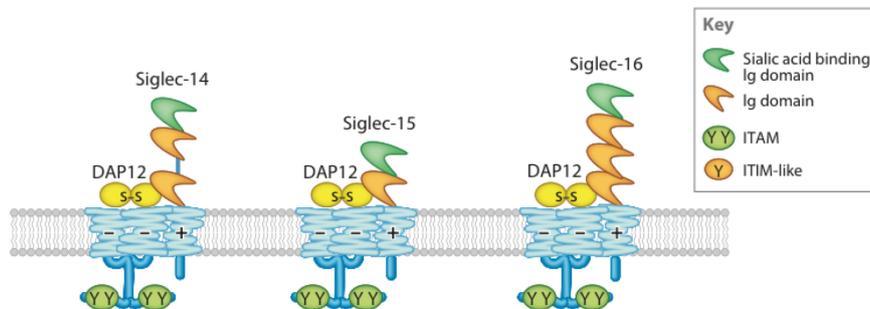


Abb. 10: Gruppe 3 der Siglecs. Sie enthält Siglec-14, -15 und -16. Diese Siglecs sind mit dem Transmembranadapterprotein DAP12 verbunden. DAP12 bildet Homodimere aus und enthält eine ITAM Domäne, über welche eine aktivierende Signalkaskade ausgelöst wird (aus Pillai et al., 2012).

1.2.3 Siglec-16

Die modernen Techniken der Sequenzierung von DNA erbrachten in den letzten 20 Jahren einen enormen Fortschritt in der Erforschung des menschlichen Genoms. So wurde erstmals im Jahre 2004 die Existenz des Pseudogens Siglec-P16 beschrieben (Grimwood et al., 2004). Pseudogene sind nichtfunktionelle Sequenzen genomischer DNA, welche aus ursprünglich funktionellen Genen entstanden sind (Balakirev und Ayala, 2003). Bei Siglec-P16 ist eine 4 Basenpaare große Deletion für einen Frameshift im Leseraster verantwortlich und bewirkt einen Funktionsverlust des Gens. Cao et al. konnten jedoch zeigen, dass neben diesem nichtfunktionellen Siglec-P16 in einer Subpopulation der menschlichen Bevölkerung ein potentiell funktionelles Siglec-16-Gen existiert und eine entsprechende mRNA in diversen Zelllinien und Geweben, unter anderem in fetalem Hirngewebe, nachgewiesen werden kann (Cao et al., 2008). Das funktionelle Siglec-16-Gen zeigte in bisherigen Untersuchungen eine Allelfrequenz von 0,08-0,3 (Mittelwert 0,18). Somit besitzen ca. 30-50 % der menschlichen Population die Möglichkeit den Rezeptor Siglec-16 zu bilden (Wang et al., 2012).

Siglec-16 ist ein Transmembranprotein vom Typ I. Der Rezeptor besitzt eine Ig V Region und drei Ig C-2 Regionen, welche für die Sialinsäurebindung verantwortlich sind. Siglec-16 hat nur einen kurzen intrazellulären Teil, welchem ein ITIM oder anderes Motiv zur

Signaltransduktion fehlt. Über einen positiv geladenen Lysinrest in seiner Transmembrandomäne ist es jedoch mit dem negativ geladenen Transmembranadaptermolekül DAP12 verbunden. Dieses enthält an seinem intrazellulären Teil ein ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), welches nach Ligandenbindung an den Rezeptor eine Signalkaskade auslöst (Cao et al., 2008) (siehe Abb. 10).

Das Gen für Siglec-16 liegt auf Chromosom 19q13.3 nur etwa 9000 Basenpaare entfernt von Siglec-11. Die beiden Gene sind in Kopf zu Kopf Orientierung zueinander angeordnet und zeigen eine enge genetische Verwandtschaft (Hayakawa et al., 2005). So besteht in den ersten 5 Exonen (Diese enthalten die Ig V Region und zwei der Ig C-2 Regionen.) eine Übereinstimmung der Sequenz von über 99 % (zur Evolutionsgeschichte siehe Abb. 11).

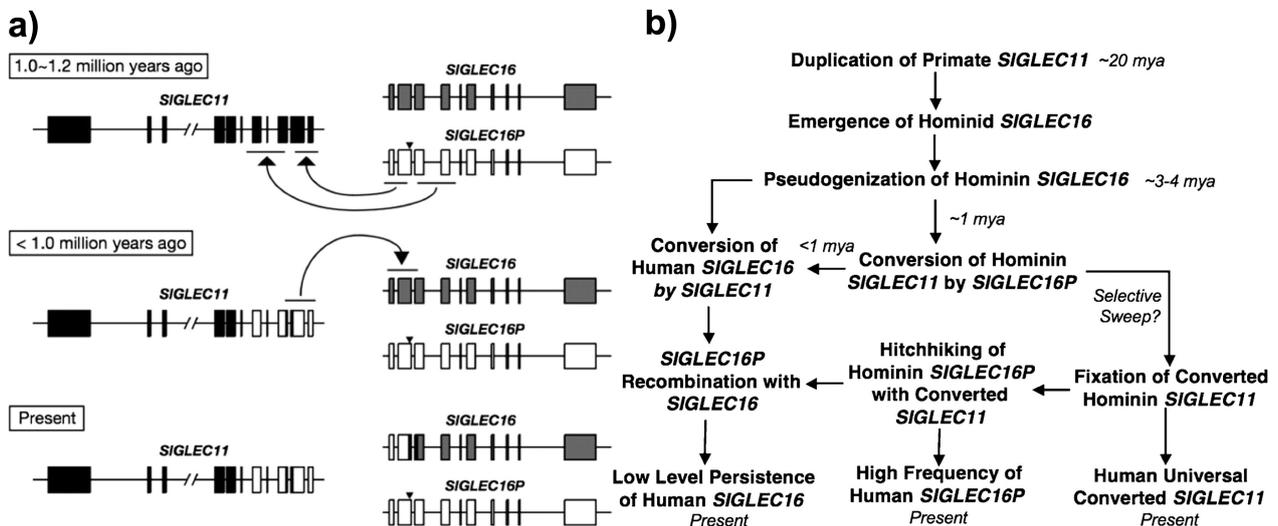


Abb. 11: Darstellung der Evolutionsgeschichte von Siglec-16 und Siglec-11. a) Mögliches Szenario der Genkonversion zwischen dem Siglec-11 und dem Siglec-16 Genlocus. Das humane Siglec-P16 konvertierte das humane Siglec-11 in zwei Regionen, welche für die Sialinsäurebindung verantwortlich sind, vor 1,0-1,2 Millionen Jahren. Nach diesem Ereignis konvertierte Siglec-11 Siglec-P16 zu Siglec-16 im Bereich der Ig V Region und dem darauf folgenden Teil, in welcher die 4 Basenpaare große Deletion liegt, welche für den Funktionsverlust von Siglec-P16 verantwortlich ist (aus Wang et al., 2012). b) Graphische Darstellung eines mögliches Szenarios der Entstehung der beiden Gene von Siglec-11 und Siglec-16 (aus Wang et al., 2012).

Siglec-11 und Siglec-16 sind humanspezifisch. Das Auftreten der beiden Rezeptoren ist evolutionsbiologisch zeitlich eng mit der Entstehung der Gattung Homo verbunden. (Hayakawa et al., 2005; Cao et al., 2008; Wang et al., 2012). Die starke Expression von

Siglec-11 auf Mikroglia im Vergleich zu anderen Primaten (Hayakawa et al., 2005) lässt gemeinsam mit dem Einfluss von Mikroglia auf Lern- und Denkprozesse einen Zusammenhang mit der großen neuronalen Plastizität im menschlichen Gehirn vermuten.

Die große Homologie von Siglec-11 und Siglec-16 in der Sialinsäurebindungsregion legt eine Bindung an den gleichen Liganden nahe (Cao et al., 2008). Siglec-11 wird auf Mikroglia gebildet und bindet an α 2-8 verbundene Oligosialinsäuren, welche vor allem in humanem Hirngewebe angereichert vorkommen. Der Rezeptor besitzt eine intrazelluläre ITIM-Domäne (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), die eine hemmende Wirkung auf Mikroglia zeigt, deren Neurotoxizität senkt und ihre Phagozytoserate verringert (Hayakawa et al., 2005; Wang und Neumann, 2010). Im Gegensatz dazu ist Siglec-16 mit dem Transmembranadaptermolekül DAP12 verbunden, welches eine Aktivierung und Differenzierung der Immunzelle mit Verstärkung der Phagozytose und Freisetzung von Entzündungsmediatoren auslöst. Die gemeinsame Ligandenbindungsstruktur legt zusammen mit der jeweiligen Wirkungsweise die Vermutung nahe, dass es sich bei Siglec-11 und Siglec-16 um ein potentiell aktivierendes/inhibierendes Rezeptorpaar auf Mikroglia handelt, das sich wechselseitig beeinflusst, um so ein Gleichgewicht in der Immunantwort zu ermöglichen (Wang et al., 2012). Allerdings können mit ITAMs assoziierte Rezeptoren auch eine hemmende Wirkung vermitteln (siehe hierzu Kapitel 1.2.2). Folglich könnte die aktivierende Funktion von Siglec-16 erst unter bestimmten Bedingungen wirksam werden.

1.3 Transgene Mausmodelle

1.3.1 Genetisch veränderte Tiermodelle

Ein wichtiges Ziel zum besseren Verständnis des menschlichen Organismus stellt die Erforschung von Genen und deren Expressionsprodukten dar. Neben einer Vielzahl an Methoden *in vitro* ist bis zum heutigen Tag die Untersuchung am Tiermodell für ein Verständnis *in vivo* kaum zu ersetzen (Löscher, 2011).

Als Modellorganismus hat sich vor allem die Maus auf Grund ihrer nahen Verwandtschaft zum Menschen, ihrer hohen Reproduktionszahl, ihrer kurzen Lebensdauer und ihrer guten Haltungsmöglichkeiten als Versuchstier etabliert. Darüber hinaus eignet sie sich besonders für Methoden, wie der genetischen Manipulation, der embryonalen Stammzelltechnologie, der *in vitro* Fertilisation und des Embryonentransfers (Fox et al., 2007).

Seit der Erzeugung des ersten transgenen Mausmodells durch Rudolf Jaenisch im Jahre 1977 wurden viele Methoden zur Generierung eines genetisch veränderten Tiermodells entwickelt und beschrieben (Jaenisch, 1988). Diese können in zwei verschiedene Ansätze unterteilt werden: Das Knock-out-Modell und das transgene Tiermodell. Existiert im Modellorganismus ein humanäquivalentes Gen kann dieses durch einen sogenannten knock-out ausgeschaltet werden, um durch seinen Ausfall Rückschlüsse auf seine Funktions- und Wirkungsweise zu ziehen. Ist jedoch das zu untersuchende Gen für den Menschen spezifisch und liegt nicht im Modellgenom vor kann dieses in das murine Genom integriert und so ein humanisiertes transgenes Tiermodell erzeugt werden (Gondo et al., 2008).

Für die Generierung einer transgenen Maus stehen zwei verschiedene Ansätze zur Verfügung. Zum einen kann das gewünschte Gen durch Injektion in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle eingebracht werden. Zum anderen können genetisch veränderte embryonale Stammzellen verwendet werden, welche entweder mit Embryonen im 8-Zell-Stadium zur Fusion gebracht oder mittels Injektion in Blastozysten eingeführt werden (Rulicke und Hübscher, 2000; Robertson, 1991; Poueymirou et al., 2007). Die pronukleäre Injektion ist aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit sowie der größeren Erfolgsrate die am weitesten verbreitete und am besten etablierte Methode.

1.3.2 Die Erzeugung eines transgenen Mausmodells mittels pronukleärer Injektion

Bei der pronukleären Injektion wird das aufgereinigte doppelsträngige transgene Genkonstrukt mit Hilfe einer Glaskanüle in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle injiziert. Im Anschluss erfolgt der Embryonentransfer in ein pseudoträchtiges Muttertier. (Die Pseudoschwangerschaft entsteht durch eine Verpaarung mit einem sterilisierten Männchen.) Wird das Transgen in eines der embryonalen Chromosomen integriert, so enthält jede einzelne Zelle des daraus entstehenden Tieres die Information des Genkonstrukts. Ist die Integration stabil und wird von einer in die nächste Generation weitergegeben stellt dieses Tier das Gründungstier (F0) einer neuen transgenen Mauslinie dar (Rulicke und Hübscher, 2000).

Wegen ihrer Robustheit, guter Verpaarbarkeit und dem Vorhandensein von kongenen Mausstämmen wird für durch Inzucht erzeugte Mauslinien häufig die C57Bl/6 Maus verwendet (Mekada et al., 2009). Diese eignet sich jedoch aus technischen Gründen, wie einer geringen Embryonenanzahl, wenigen Vorkernstadien und einer schlechten Injizierbarkeit, nur bedingt für das Verfahren der pronukleären Injektion. Deshalb werden hierzu Mausembryonen, welche aus der Verpaarung von der Mauslinie B6D2F1 mit der Mauslinie C57Bl/6 entstanden sind verwendet. Die B6D2F1 Mauslinie entsteht aus der Verpaarung von der Mauslinie C57Bl/6 mit der Mauslinie DBA. Der Anteil der Mauslinie C57Bl/6 beträgt folglich in der Gründungsgeneration (F0) bereits 75 %. Allerdings kann erst bei einer Rückkreuzung mit Mauslinie C57Bl/6 in die 10. Generation (F10) von einem nahezu reinen C57Bl/6 Chromosomensatz ausgegangen werden. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Krankheitsmodelle, wie z.B. die EAE (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis), einem Mausmodell der Multiplen Sklerose, zu gewährleisten, muss deswegen bis zur 10. Generation zurück gekreuzt werden.

Ein Problem der Methode der pronukleären Injektion ist die freie Integration des Transgens in das Genom des Zielorganismus. Es besteht keinerlei Kontrolle darüber an welchem Ort und in welcher Zahl das Transgen in das Chromosom inseriert. Dies erschwert die Interpretation des Mausmodells und erfordert eine genaue Analyse einer jeden Linie. Durch die unterschiedlich hohe Zahl an Genkopien kann es entweder zu einer geringen oder einer erhöhten Expression kommen. Integriert sich das Transgen in einen funktionellen Genlocus, wird die Expression dieses Gens gestört oder unterbrochen. Im Ge-

gensatz dazu kann die Integration in einen transkriptiv nicht aktiven Bereich zu einem Funktionsverlust oder einer mangelhaften Expression des Genkonstrukts führen (Rulicke und Hübscher, 2000).

Moderne Ansätze, wie die TALEN- (Transcription Activator-like Effector Nuclease), CRISPR/Cas- oder CRISPR/Zinkfinger- (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Technologien, versuchen diese Probleme zu lösen. Mit ihrer Hilfe soll eine ortsspezifische Integration in das Genom ermöglicht werden. Jedoch ergeben sich zur Zeit noch technische Schwierigkeiten, welche eine Umsetzung in der Realität erschweren (Boch, 2011; Sander und Young, 2014).

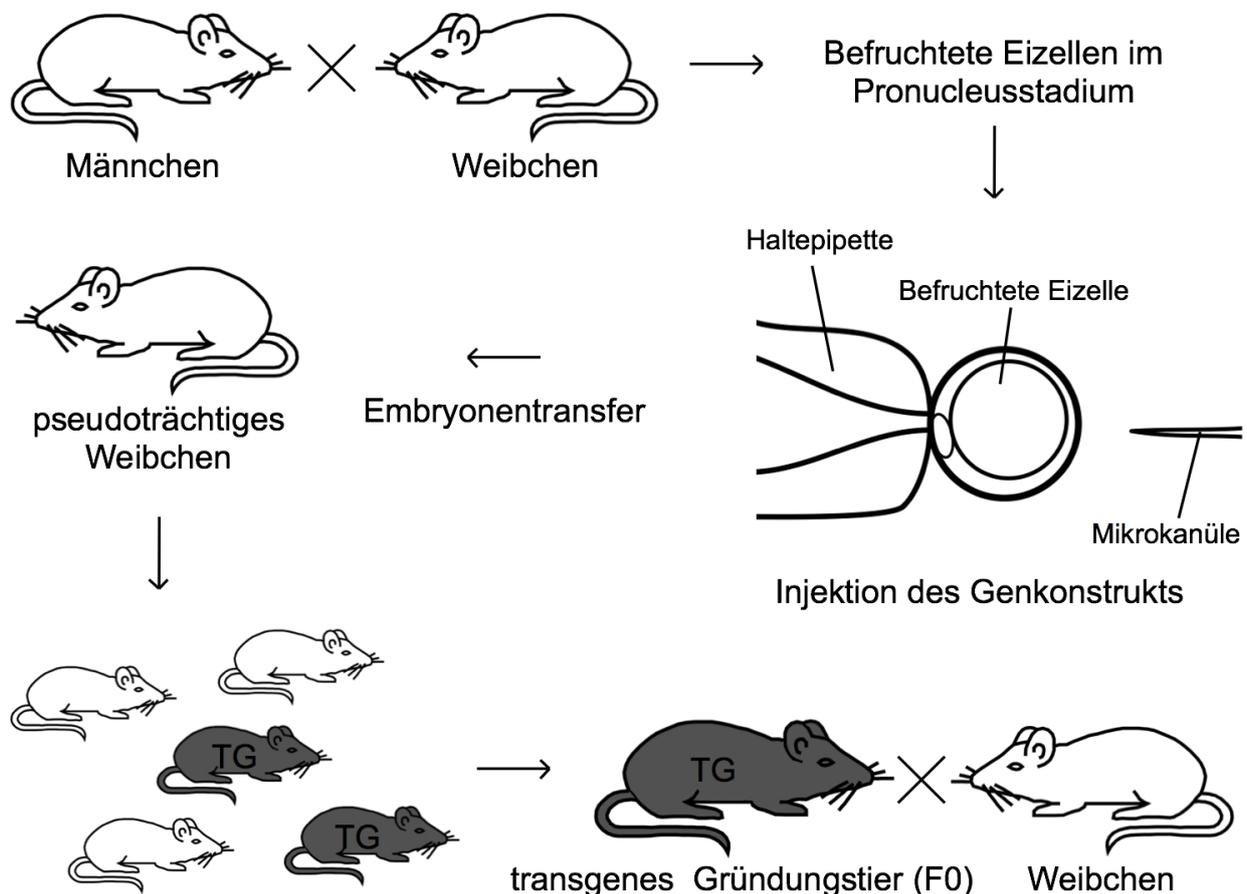


Abb. 12: Darstellung der Erzeugung eines transgenen Mausmodells mittels pronukleärer Injektion.

1.3.3 Methoden zur selektiven Genexpression im genetisch veränderten Tiermodell

Gene werden im menschlichen Körper in unterschiedlicher Art und Weise abhängig von Gewebe, Zelltyp und Entwicklungsstufe exprimiert. Insbesondere die Genexpression von Oberflächenrezeptoren ist häufig zellspezifisch. Zusätzlich hängt ihre Expression in der Regel von weiteren Faktoren, wie beispielsweise dem Aktivierungszustand der Zelle, ab. Eine Steuerbarkeit der Expression des Transgens bei der Erzeugung eines transgenen Tiermodells ist darum von besonderem Interesse, um seine Funktionsweise in einem möglichst wirklichkeitsnahen Modellsystem abbilden zu können. In diesem Zusammenhang sind gewebe- und zellspezifische Promotoren zur Generierung einer selektiven Genexpression von großer Bedeutung (Hume, 2011).

Ein im Gehirn ausschließlich von Mikroglia gebildetes Protein ist Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1) (Imai et al., 1996). Hirasawa et al. erzeugten mit Hilfe des Iba1-Promotors ein transgenes Mausmodell, welches eine selektive Expression von EGFP (enhanced green fluorescent protein) in Mikroglia zeigte. Hierbei wurde ein Genkonstrukt aus muriner Iba1-Promotorregion und EGFP-Gensequenz mittels pronukleärer Mikroinjektion in das murine Genom eingebacht. Der Vorteil des Iba1-Promotors ist hierbei die robuste Expression des Transgens in Mikroglia während allen Entwicklungsstufen der Maus (Hirasawa et al., 2005). Dies erlaubt eine Untersuchung der grundsätzlichen Funktion des Proteins.



Abbildung 13: Darstellung des Iba1-Transgen-Konstrukts. Der 1,9 KB große Iba1-Promotor steuert die Expression des Transgens. Dem Transgen ist in diesem Fall eine Poly-A Sequenz angehängt (modifiziert nach Hirasawa et al., 2005).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Entdeckung des funktionellen Siglec-16-Gens bei einer Subgruppe der menschlichen Population durch Cao et al. im Jahr 2008 warf die Frage auf, ob eine Expression dieses potentiell proinflammatorischen Rezeptors auf Mikroglia vorhanden ist und welche Auswirkung und Funktion diese Expression hat.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Expression und Funktion des Siglec-16-Rezeptors.

Dazu sollte zunächst der Nachweis der Expression des Rezeptors in humanem Hirngewebe und auf humanen Mikroglia erbracht werden. Darüber hinaus sollte eine Methode entwickelt werden, um den Genotyp von Siglec-16 genauer bestimmen zu können und somit eine exakte Analyse der Allelfrequenz zu ermöglichen.

Um den humanspezifischen Rezeptor im lebenden Organismus untersuchen zu können, war es Ziel ein Siglec-16 transgenes Mausmodell zu generieren, in dem mit Hilfe des spezifischen Iba1-Promotors eine selektive Expression des Rezeptors auf Mikroglia ermöglicht werden sollte. Mit diesem Modell sollte der Einfluss des Rezeptors auf Immunreaktionen auch in vivo gezeigt werden.

In Zellkulturexperimenten sollte der Einfluss des Rezeptors auf Zytokinexpression und Phagozytoserate untersucht werden. Darüber hinaus sollten Rückschlüsse auf mögliche Regulationen durch verschiedene Botenstoffe auf die Genexpression von Siglec-16 gezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

BSA Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Deoxyribonucleic acid, single stranded from salmon testes	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
dNTP Set	Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
0,1 M DTT	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
EmbryoMax Injection Buffer	Merck Millipore, Billerica (MA), USA
Ethanol $\geq 99\%$, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid $\geq 99,5\%$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
GelStar (10.000 x)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
HCl Salzsäure 1 mol/l	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hexanucleotide Mix (10 x)	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
LB Broth (Lennox)	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Lenti-X Concentrator	Clontech Laboratories, Mountain View (CA), USA
L-Glutamine (200 mM)	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
LPS from Salmonella abortusequi S-form	Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale (NY), USA
MEM Non-Essential Amino Acids (100 x)	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
NaCl Natriumchlorid $\geq 99\%$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH Natriumhydroxid $\geq 99\%$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-2 Supplement (100 x)	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham

	(MA), USA
Nuclease-Free Water	Qiagen, Venlo, Niederlande
50 mM MgSO ₄	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
Percoll	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
PeqGold Universal Agarose	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
Plasmocin prophylactic	Invivogen, San Diego (CA), USA
PLL Poly-L-Lysine	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
PVP Polyvinylpyrrolidone	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Recombinant human Interferon- γ	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Recombinant human Interleukin-4	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
RNase-Free Water	Qiagen, Venlo, Niederlande
SDS Sodium dodecyl sulfat \geq 99 %	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Sodium Pyruvate (100 mM)	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
2 x SYBR Green PCR Master Mix	Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
Trichloromethane/Chloroform Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
tri-Natriumcitrat Dihydrat \geq 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS \geq 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol Reagent Ambion	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
UltraPure Agarose	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA

2.1.2 Enzyme

Agel	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
BsiEI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.,

DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	Deutschland New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Eco47III	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
EcoRI	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
EcoRI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
NdeI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Nsil	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
NotI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
SuperScript™ III RT	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
XbaI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Trypsin-EDTA (0,25 %), phenol red	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA

2.1.3 Puffer und Lösungen

DMEM/F-12	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
DMEM, high glucose	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
DPBS no calcium, no magnesium	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA

FCS Fetal calf serum	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
First-Strand Buffer (5 x)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
HBSS no Calcium no Magnesium	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
HBSS 10 x no Calcium no Magnesium	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
10 x High Fidelity PCR Buffer	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
Opti-MEM I	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
PCR reaction buffer (10 x)	Roche, Rotkreuz, Schweiz

2.1.4 Kits

Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA), USA
RNeasy Lipid Tissue Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
NucleoBond Xtra Maxi EF Kit	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Phototope-Star Detection Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA

2.1.5 Zellkulturmedien

LB-Medium	20 g LB Broth (Sigma Aldrich), 1 l H ₂ O Bei 121 °C für 15 Minuten autoklavieren.
MEF-Medium	DMEM (Gibco), 10 % fetal bovine serum (Gibco), 2 mM L-Glutamine (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco), 1 x MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco)
N2-Medium	DMEM/F-12 (Gibco), 1 x N-2 Supplement (Gibco), 1 x Penicillin-Streptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamine (Gibco)

2.1.6 Primer

Genotyping-Siglec-16-Forward	5'-CTGAGCCTCTGCATCTCC-3'
Genotyping-Siglec-16-Reverse	5'-GGGTGGGGAATTCTTGTGC-3'
Human-GAPDH-Forward	5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'
Human-GAPDH-Reverse	5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'
Iba1-Sequencing-Forward-1	5'-ATCGATTACTATAGGATGCATCGTG-3'
Iba1-Sequencing-Forward-2	5'-GGGAGTTAGCAAGGGAATGAGT-3'
Iba1-Sequencing-Forward-3	5'-CAAGGCTATCCCTGGTATGAG-3'
Iba1-Sequencing-Forward-4	5'-CTCCGGGAGCTGATCTAAGTCTTTC-3'
Iba1-Sequencing-Reverse-1	5'-CTCATACCAGGGATAGCCTT-3'
Iba1-Sequencing-Reverse-2	5'-GTGTGGAAAGGCACCAGGAT-3'
Iba1-Sequencing-Reverse-3	5'-CTGAACTTGTGGCCGTTTAC-3'
Maus-GAPDH-Forward	5'-ACAACCTTGGCATTGTGGAA-3'
Maus-GAPDH-Reverse	5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG-3'
Maus-Iba1-Forward	5'-GAAGCGAATGCTGGAGAAAC-3'
Maus-Iba1-Reverse	5'-AAGATGGCAGATCTCTTGCC-3'
Maus-IL-1 β -Forward	5'-ACAACAAAAAAGCCTCGTGCTG-3'
Maus-IL-1 β -Reverse	5'-CCATTGAGGTGGAGAGCTTTCA-3'
Maus-TNF α -Forward	5'-CCGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'
Maus-TNF α -Reverse	5'-ACGGCAGAGAGGAGGTTGACTT-3'
Neo-Reverse	5'-TTTCTCGGCAGGAGCAAGGT-3'
PGK-Forward	5'-TAGCACGTCTCACTAGTCTCG-3'
Siglec-16-rtPCR-Forward-1	5'-GAAGATCCTGCTTCTCTGC-3'

Siglec-16-rtPCR-Reverse-1	5'-TTAGTCCGTGACAGCGTC-3'
Siglec-16-rtPCR-Forward-2	5'-CCGGTGACGGTCATCTGTG-3'
Siglec-16-rtPCR-Reverse-2	5'-AGTTGGAGGGAGGCCACAC-3'
Siglec-16-AgeI	5'-AAAGACCCGGTGCTCCTGTGGCCACTA-3'
Siglec-16-EcoRI	5'-GATCCGAATTCTTAGTCCGTGACAGCGTC-3'
Siglec-16-Sequencing-Reverse-1	5'-GCTTCCTCTCTCCACCCGAA-3'
Siglec-16-Sequencing-Forward-1	5'-ATGGCTGGGACGAGTCTACTGC-3'
Siglec-16-Sequencing-Forward-2	5'-AACCAGACCAAGCACCTCCCAC-3'
Siglec-16-Sequencing-Forward-3	5'-TGCCTCGGGTTCAAATGG-3'
Siglec-16-EcoRIII-Forward	5'-AAAGCGCTCTCGAGGCCACC-3'
Siglec-16-EcoRI-Reverse	5'-CGACGAATTCTTAGTCCGTGAC-3'

2.1.7 Antikörper

Anti-human Siglec-16-APC (FAB 6819A)	R&D Systems, Minneapolis (MN), USA
Anti-human Siglec-11-PE (FAB3258P)	R&D Systems, Minneapolis (MN), USA
Anti-mouse CD45 V450 30-F11 (560501)	BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA
Anti-mouse CD11b APC-Cy7 M1/70 (561039)	BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA
Goat IgG PE-Conjugated Antibody (IC108P)	R&D Systems, Minneapolis (MN), USA
Mouse IgG2B Isotype Control-APC (IC0041A)	R&D Systems, Minneapolis (MN), USA

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hybond-N+ Nylon Membrane	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
BD Plastipack Spritze	BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA
Corning Costar cell culture plates 6 well	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Corning cell scraper	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Corning non-treated culture dishes	Sigma Aldrich, St. Louis (MO), USA
Discardit II Spritzen 10 ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA
Eppendorfgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50ml Falcon Conical Tube	BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA
Falcon Disposable Polystyrene Serological Pipetts	BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA
Micro-Sieb, 70 µm, steril	BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA

Röntgenfilm 18 x 24 T-Mat 100 BI.

Sterican 0,90 x 70 mm

Steritop-GP, 0,22 µm

96-Well Platte

Kodak, Stuttgart, Deutschland

B. Braun, Melsungen, Deutschland

Merck Millipore, Billerica (MA), USA

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.9 Technische Ausrüstung

AGFA Curix 60 Röntgenfilmentwickler

Axiovert 200 M

BIOFUGE fresco

Dark Reader DR89X Transilluminator

FACSAria

FACSCanto II

Mastercycler egradient S

Magafuge 16R

T3 Thermocycler

2400 UV-Stratalinker

Agfa, Mortsel, Belgien

Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Heraeus, Hanau, Deutschland

Clare Chemical Research, Dolores (CO),
USA

BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA

BD Bioscience, Franklin Lakes (NJ), USA

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Heraeus, Hanau, Deutschland

Biometra, Göttingen, Deutschland

Stratagene, La Jolla (CA), USA

2.1.10 Software

ApE- A plasmid Editor v2.0.46

FlowJo v9.8.1

Gentle 1.9.4

iDraw

SPSS v21

Biologylabs, Salt Lake City (UT), USA

FlowJo, LLC, Ashland (OR), USA

Gentle, Köln, Deutschland

Indeo Inc. USA

IBM, Sindelfingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von RNA und DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode ist ein Verfahren zur Isolation von RNA, DNA und Proteinen aus einer einzelnen Gewebeprobe (Chomczynski, 1993; Chomczynski et al., 1987). Hierzu wurden 30-100 mg des Gewebes in 1 ml TRIzol Reagent (Ambion) homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl Trichlormethan/Chloroform (Carl Roth) hinzugegeben, die Probe durch Schütteln gut gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12.000 U/min in einer Tischzentrifuge über 10 Minuten bei 4 °C wurde eine Phasenauftrennung in eine obere wässrige Phase (RNA), eine mittlere weiße Phase (Proteine/DNA) und eine untere rote organische Phase (DNA) erreicht.

Um die RNA zu fällen, wurde die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Eine Zentrifugation bei 12.000 U/min in einer Tischzentrifuge über 10 Minuten und bei 4 °C erbrachte eine gelartige Sedimentierung der RNA. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA 3 x in 70 % Ethanol (Carl Roth) gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Probe bei 6.000 U/min in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Im Anschluss wurde die RNA bei Raumtemperatur getrocknet und in RNase-freiem Wasser (Qiagen) gelöst.

Die DNA wurde, nach vollständiger Entfernung der wässrigen Phase, durch die Zugabe von 300 µl 100 % Ethanol (Carl Roth) gefällt. Durch Zentrifugation bei 6.000 U/min in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten und bei 4 °C wurde die Sedimentierung der DNA erreicht. Der Phenol-Ethanol-Überstand wurde abgenommen. Die DNA wurde 3 x in 1 ml 0,1 M tri-Natriumcitrat Dihydrat (Carl Roth) mit 10 % Ethanol (Carl Roth) und im Anschluss 3 x in 1 ml 70 % Ethanol (Carl Roth) gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Probe bei 6.000 U/min in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Im Anschluss wurde die DNA 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in Nuklease-freiem Wasser (Qiagen) gelöst.

2.2.2 Umschreibung von RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase

Die RNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode isoliert (siehe Kapitel

2.2.1). Anschließend wurden 3-5 µg der RNA zusammen mit 10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP (Thermo Fischer)) und 1 x Hexanucleotide Mix (Roche) bei 65 °C über 5 Minuten erhitzt und im Anschluss für 1 Minute auf Eis gekühlt. Im Folgenden wurden die Proben mit 1 x First-Strand Buffer (Invitrogen), 0,005 M DTT (Invitrogen) und 200 Einheiten SuperScript™ III RT (Invitrogen) versetzt und bei 55 °C für 60 Minuten inkubiert. Die Reaktionen wurden in einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Es wurden 100-200 ng DNA, 0,2 µM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP (Thermo Fischer)), 0,2 µM Vorwärts-Primer, 0,2 µM Rückwärts-Primer, 1 x PCR reaction buffer (Roche) und Nuklease-freies Wasser (Qiagen) bis zu einem Endvolumen von 50 µl vermischt. Im Anschluss wurden 1,25 U Taq DNA Polymerase (Roche) hinzugefügt. Die Reaktion wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

2.2.4 Quantitative real-time PCR

Es wurden 1 x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µM Vorwärts-Primer, 0,2 µM Rückwärts-Primer und Nuklease-freies Wasser (Qiagen) bis zu einem Endvolumen von 25 µl vermischt und auf eine 96-Well Platte pipettiert. Die quantitative real-time PCR wurde mit einem Mastercycler epgradient S (Eppendorf) durchgeführt. Die Spezifität der Amplifizierung wurde mit Hilfe der Schmelzkurve überprüft.

2.2.5 Transformation und Vervielfältigung von Plasmiden

Es wurden 100 µl chemisch kompetent gemachte TOP10 über 15 Minuten auf Eis aufgetaut. Jeweils 50-200 ng Plasmid wurden zu den Zellen gegeben und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß (Sarstedt) für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der Plasmide in die permeablen Zellen zu erreichen, wurden diese für 45 Sekunden bei 42° C in einem Wasserbad hitzegeschockt und im Anschluss für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Zu den Zellen wurden 900 µl LB-Medium gegeben und die Zellsuspension in einem Thermoblock (Heraeus) bei 37 °C und 350 U/min für 1 Stunde inkubiert. Die Zel-

len wurden bei 6.000 U/min für 3 Minuten in einer Tischzentrifuge (Heraeus) abzentrifugiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Mit dieser Suspension wurden mit LB-Ampicillin-Agar (100 µg/ml) beschichtete Petrischalen beimpft und für 16 Stunden bei 37 °C bebrütet. Mit einer 100 µl Pipettenspitze wurden auf den beimpften Platten gewachsene Kolonien abgenommen, 5 ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg/ml) für eine Minipräparation beimpft und für 12-16 Stunden bei 37 °C bei 100-200 U/min in einem Schüttler inkubiert. Die Minipräparation wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.6 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden humane aus induzierten pluripotenten Stammzellen erzeugte Mikroglia (iPSdM), murine aus embryonalen Stammzellen erzeugte Mikroglia (ESdM; Beutner et al., 2010), Human Embryonic Kidney 293 t Zellen (HEK 293 t) und Human Embryonic Kidney 293 ft Zellen (HEK 293 ft) verwendet. Die aus induzierten pluripotenten Stammzellen erzeugte Mikroglia (iPSdM) wurde von Frau Dr. Kristin Roy und Frau Mona Mathews (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Bonn) generiert und zur Verfügung gestellt. Die Mikrogliazelllinien wurden in Zellkulturschalen von Sigma Aldrich bei 37 °C und 5 % CO₂ in N2-Medium kultiviert. Die HEK 293 Zelllinien wurden in Zellkulturschalen von Sigma Aldrich bei 37 °C und 5 % CO₂ in MEF-Medium kultiviert. Die Zellkultur war frei von Mycoplasmen.

2.2.7 Genotypisierung von humanem Gewebe

2.2.7.1 Genetische Analyse

Zunächst wurde eine genaue Analyse des Genomabschnitts von Siglec-16, Siglec-P16 und wegen seiner Homologie und evolutionären Verwandtschaft auch von Siglec-11 durchgeführt. Als Referenzen wurden die Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) herangezogen (National Center for Biotechnology Information, 2012 a). Hierbei wurden zwei Bereiche des Genoms herausgearbeitet, welche sich aufgrund der hier auftretenden Polymorphismen besonders zur Analyse des Genotyps eignen (Siglec-11: 455 und 610-617 (National Center for Biotechnology Information, 2012 b); Siglec-P16: 368 und 519-526 (National Center for Biotechnology Information, 2012 c); Siglec-16: 280 und 435-442 (National Center for Biotechnology Information, 2012 d)).

Im ersten Bereich liegt ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) vor (Siglec-11: 455/Adenosin/A; Siglec-16: 280/Cytidin/C; Siglec-P16: 368/Adenosin/A). Das Siglec-16-Gen besitzt an dieser Stelle ein Cytidin anstelle eines Adenosins bei Siglec-P16 und Siglec-11.

Im zweiten Bereich liegt die 4 Basenpaare (BP) große Region, deren Deletion bei Siglec-P16 zum Funktionsverlust führt (Siglec-11: 610-617/TTCTTTCT; Siglec-16: 435-442/TTCTTTCT; Siglec-P16: 519-526/TTCT). Hierbei ist anzumerken, dass sich die Polymorphismen in diesem Bereich nicht nur auf die 4 BP Deletion beschränken. Da sich diese Unterschiede jedoch auf dem Intron befinden, haben sie keine weitere Auswirkung auf die Genexpression.

2.2.7.2 Durchführung

Die genomische DNA wurde aus den Gewebeproben mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode isoliert (siehe Kapitel 2.2.1). Im Folgenden wurde mit 10-100 ng genomischer DNA und den Primern Genotyping-Siglec-16-Forward (5'-CTGAGCCTCTGCATCTCC-3') und Genotyping-Siglec-16-Reverse (5'-GGGTGGGGAATTCTTGTGC-3') eine PCR unter folgenden Bedingungen [1 x (94 °C → 3 Minuten); 35 x (94 °C → 45 Sekunden; 58 °C → 45 Sekunden; 72 °C → 45 Sekunden); 1 x (72 °C → 10 Minuten); 4 °C → Pause] durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit dem MinElute

PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und im Anschluss mit dem Primer Genotyping-Siglec-16-Reverse sequenziert. Die Sequenzierung wurde von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

2.2.7.3 Auswertung

Da die Sequenzierung mit dem Primer Genotyping-Siglec-16-Reverse durchgeführt wurde, zeigt das Sequenzierungsergebnis den Minusstrang in 5'-3'-Richtung. Zur Genotypenanalyse wurde deshalb der Plusstrang („reverse complement“) herangezogen. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit dem Programm Gentle 1.9.4.

Der Genomabschnitt, in welchem die 4 BP-Deletion im Siglec-P16-Gen liegt, befand sich zwischen Basenpaar 90 und 110 der Sequenzierung. Der Genomabschnitt mit dem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) zwischen Siglec-16 (Cytidin), Siglec-P16 (Adenosin) und Siglec-11 (Adenosin) lag zwischen Basenpaar 250 und 270. Im Folgenden werden die einzelnen Genotypen (homozygoter Siglec-16/Siglec-16-Genotyp; homozygoter Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp; heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp) mit den entsprechenden Sequenzierungen dargestellt.

I. Homozygoter Siglec-16/Siglec-16-Genotyp.

a) Basenpaar 90 bis 110: Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTCTTTCTAAAA. Im Hintergrund ist keine Sequenzierung des Siglec-P16-Gens zu erkennen (siehe Abb. 14).

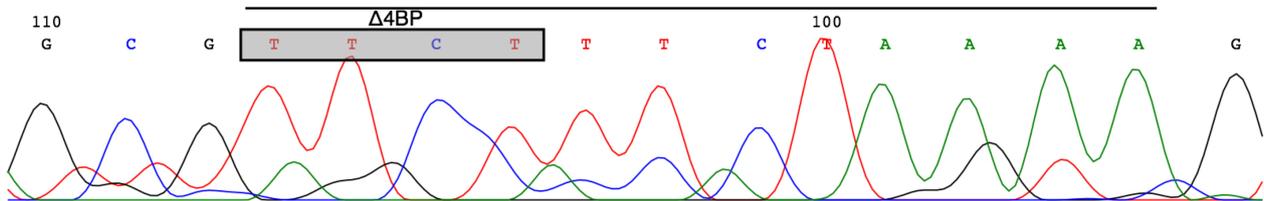


Abb. 14: Siglec-16/Siglec-16-Genotyp. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in dem die 4 BP-Deletion liegt. Die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTCTTTCTAAAA ist mit einer Linie markiert. Die Sequenz TTCT, deren Deletion bei Siglec-P16 zum Funktionsverlust führt, ist grau hinterlegt.

b) Basenpaar 250 bis 270: Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz CAATGAGCA. Es ist kein um 4 Basenpaare nach rechts verschobenes Signal für ein Adenosin (grün) des Siglec-P16-Gens zu erkennen (siehe Abb. 15).

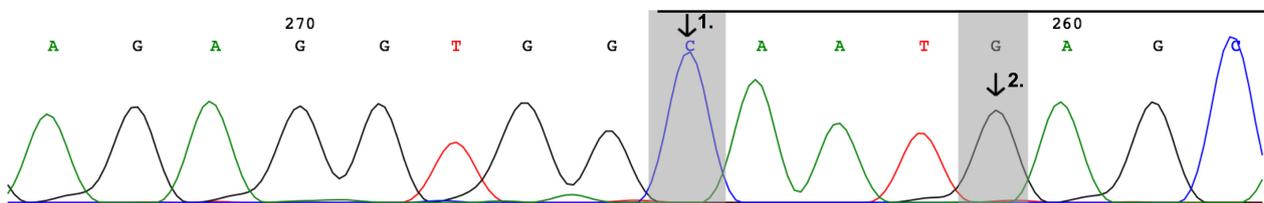


Abb. 15: Siglec-16/Siglec-16-Genotyp. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in dem der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) zwischen Siglec-16 (Cytidin (C, blau)), Siglec-P16 (Adenosin (A, grün)) und Siglec-11 (Adenosin (A, grün)) vorliegt. Die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz CAATGAGC ist mit einer Linie markiert. Pfeil 1 markiert das Cytidin von Siglec-16. Bei Pfeil 2 ist kein um vier Basenpaare verschobenes Adenosin von Siglec-P16 vorhanden.

II. Homozygoter Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp

a) **Basenpaar 90 bis 110:** Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTTGTTCTAAAA. Im Hintergrund ist eine Sequenzierung des Siglec-11-Gens zu erkennen (ein Cytidin (blau) und Thymidin (rot)) (siehe Abb. 16).

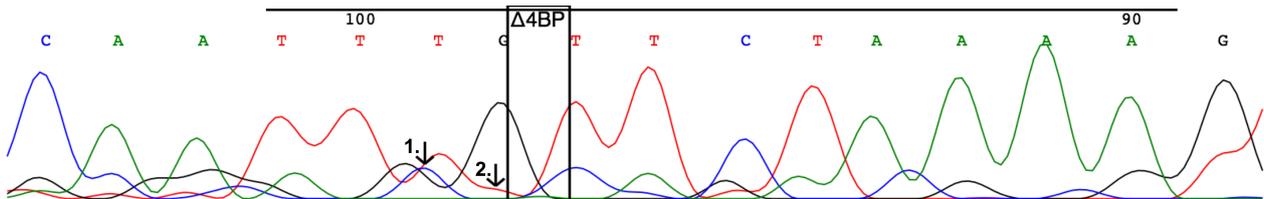


Abb. 16: Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in dem die 4 BP-Deletion liegt (siehe Kasten). Die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTTGTTCTAAAA ist mit einer Linie markiert. Pfeil 1 und Pfeil 2 markieren das Cytidin (blau) und Thymidin (rot) des Siglec-11-Gens.

b) **Basenpaar 250 bis 270:** Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz AAATGAAGC. Es ist das um 4 Basenpaare nach links verschobene Adenosin (grün) des Siglec-11-Gens zu erkennen (siehe Abb.17).

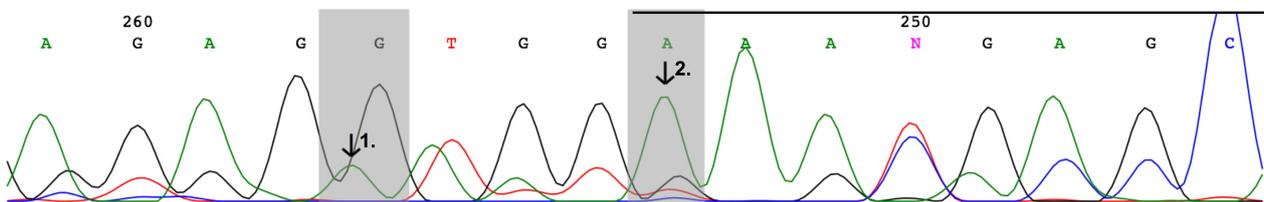


Abb. 17: Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in dem der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) zwischen Siglec-16 (Cytidin (C, blau)), Siglec-P16 (Adenosin (A, grün)) und Siglec-11 (Adenosin (A, grün)) vorliegt. Die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz AAATGAAGC ist mit einer Linie markiert. Das Adenosin von Siglec-P16 ist mit Pfeil 2 markiert. Pfeil 1 markiert das um vier Basenpaare nach links verschobene Adenosin von Siglec-11.

III.1 Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp: Sequenzierung von Siglec-16 im Vordergrund

a) **Basenpaar 90 bis 110:** Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTCTTTCTAAAA. Im Hintergrund ist die Sequenzierung des Siglec-P16-Gens zu erkennen. Nach dem Ort der 4 Basenpaare großen Deletion kommt es zu einer sichtbaren Überlagerung der beiden Sequenzen von Siglec-16 und Siglec-P16 (siehe Abb. 18).

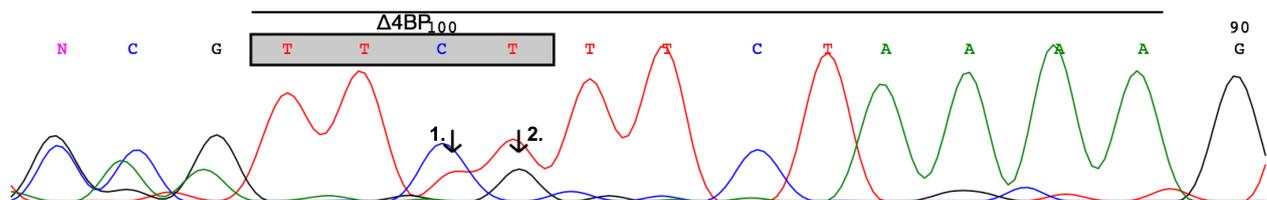


Abb. 18: Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp - Siglec-16-Sequenz im Vordergrund. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in dem die 4 BP-Deletion liegt. Die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTCTTTCTAAAA ist mit einer Linie markiert. Es liegt eine Hintergrundsequenzierung von Siglec-P16 vor (siehe Pfeil 1 (Thymin (T, rot)) und Pfeil 2 (Guanosin (G, schwarz))).

b) **Basenpaar 250 bis 270:** Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz CAATGAAGC. Um 4 Basenpaare nach rechts verschoben ist im Hintergrund das Adenosin (grün) des Siglec-P16-Gens zu erkennen. Neben dem Cytidin des Siglec-16 ist das Adenosin des Siglec-11 als Hintergrundsignal sichtbar (siehe Abb. 19).

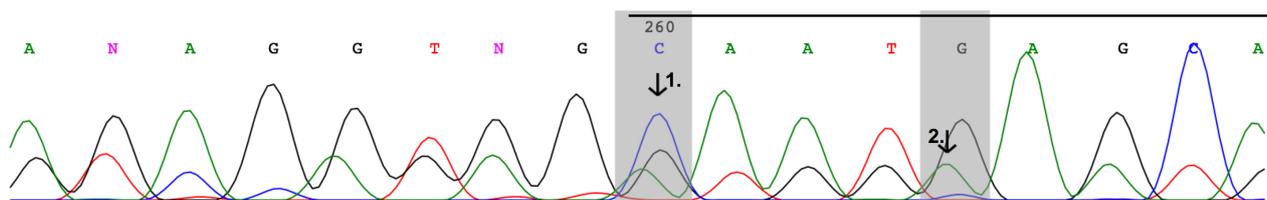


Abb. 19: Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp - Siglec-16-Sequenz im Vordergrund Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in welchem der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) zwischen Siglec-16 (Cytidin (C, blau)), Siglec-P16 (Adenosin (A, grün)); siehe 2. Pfeil) und Siglec-11 (Adenosin (A, grün)) vorliegt. Die für Siglec-16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz CAATGAAGC ist mit einer Linie markiert. Pfeil 1 markiert das Cytidin von Siglec-16 (ebenfalls ein Adenosin von Siglec-11 zu sehen). Pfeil 2 markiert das um 4 BP verschobene Adenosin von Siglec-P16.

III.2 Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp: Sequenzierung von Siglec-P16 im Vordergrund

a) **Basenpaar 90 bis 110:** Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTTGTTCTAAAA. Im Hintergrund ist eine Sequenzierung des Siglec-16- und Siglec-11-Gens zu erkennen. Nach dem Ort der 4 Basenpaare großen Deletion kommt es zu einer sichtbaren Überlagerung der beiden Sequenzen (siehe Abb. 20).

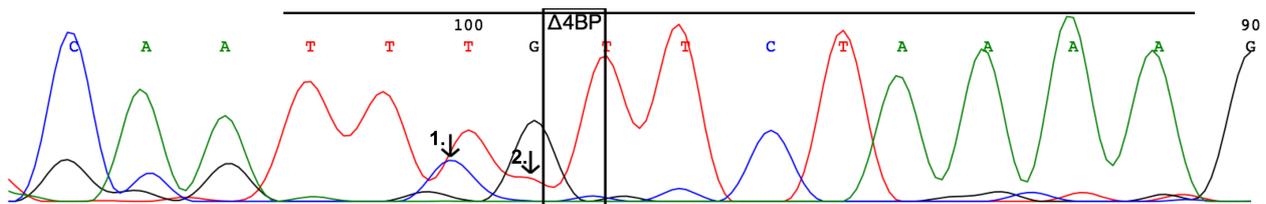


Abb. 20: Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp - Siglec-P16-Sequenz im Vordergrund. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in dem die 4 BP-Deletion liegt. Die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz TTTGTTCTAAAA ist mit einer Linie markiert. Der Kasten markiert den Ort der 4 BP-Deletion. Die Pfeile markieren das Cytidin (blau, Pfeil 1) und Thymidin (rot, Pfeil 2) von Siglec-16 und Siglec-11.

b) **Basenpaar 250 bis 270:** Die Sequenzierung zeigt die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz AAATGAAGC. Im Hintergrund sind die um 4 Basenpaare nach links verschobenen Sequenzen von Siglec-16 und Siglec-11 zu sehen (siehe Abb. 21).

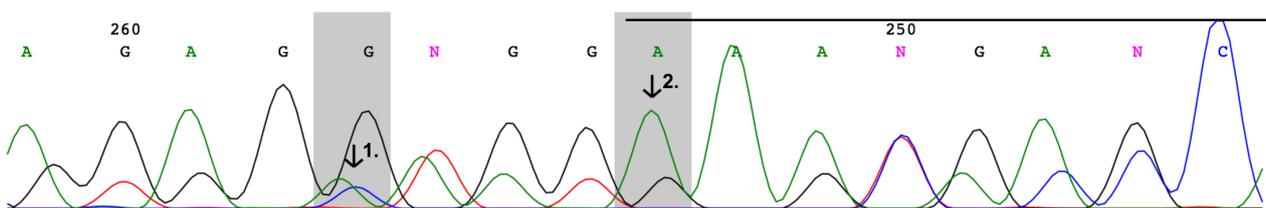


Abb. 21: Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp - Siglec-P16-Sequenz im Vordergrund. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in welchem ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) zwischen Siglec-16 (Cytidin (C, blau)), Siglec-P16 (Adenosin (A, grün)) und Siglec-11 (Adenosin (A, grün)) liegt. Die für Siglec-P16 in diesem Genomabschnitt spezifische Sequenz AAATGAAGC ist mit einer Linie markiert. Pfeil 2 markiert das Adenosin von Siglec-P16. Pfeil 1 markiert das um 4 BP verschobene Cytidin von Siglec-16 und Adenosin von Siglec-11.

III.3 Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp: Überlagerung der Sequenzierung von Siglec-16 und Siglec-P16

a) **Basenpaar 90 bis 110:** Die Sequenzierung zeigt die Sequenzen von Siglec-16 und Siglec-P16 in gleich starker Intensität. Nach dem Ort der 4 Basenpaare großen Deletion kommt es zu einer sichtbaren Überlagerung der beiden Sequenzen. Durch die Überlagerung ist keine der beiden deutlich zu differenzieren (siehe Abb. 22).

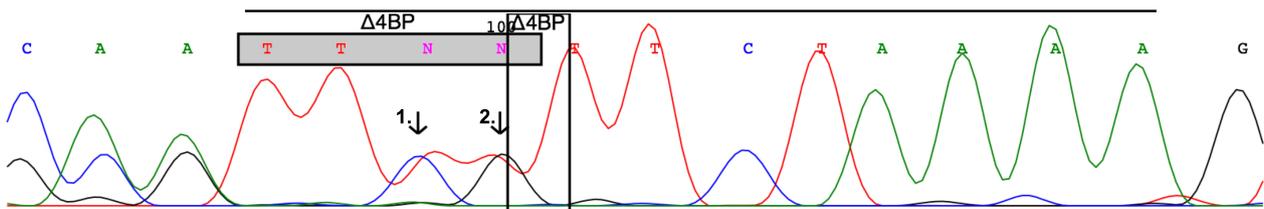


Abb. 22: Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp - Überlagerung der Sequenzen von Siglec-16 und Siglec-P16. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in welchem die 4 BP-Deletion liegt. Nach der Deletion (siehe Kasten) kommt zu einer Überlagerung der Sequenzen von Siglec-16, Siglec-P16 und Siglec-11 (siehe Pfeil 1 und 2). Vor dem Polymorphismus (siehe Kasten) ist keine Überlagerung zu sehen.

b) **Basenpaar 250 bis 270:** Wegen der Überlagerung der Sequenzen kann die Sequenzierung nur Anhand der Fluoreszenzsignale ausgewertet werden. Es sind um 4 Basenpaare versetzt die Sequenzen von Siglec-16, Siglec-11 und Siglec-P16 zu sehen (Abb. 23).

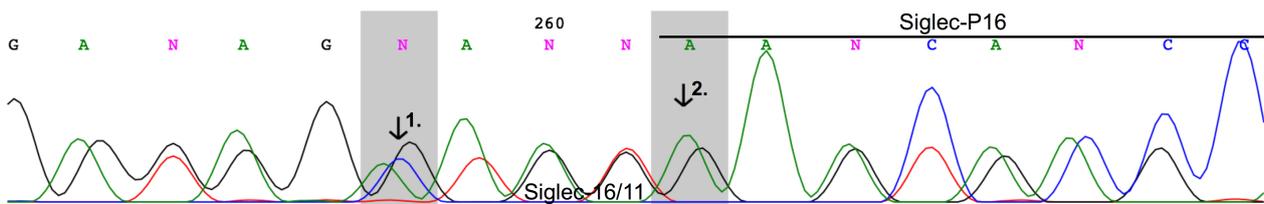


Abb. 23: Heterozygoter Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp - Überlagerung der Sequenzen von Siglec-16 und Siglec-P16. Sequenzierung über dem Genomabschnitt, in welchem der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) zwischen Siglec-16 (Cytidin (C, blau)), Siglec-P16 (Adenosin (A, grün)) und Siglec-11 (Adenosin (A, grün)) vorliegt. Bei Pfeil 1 ist das Cytidin von Siglec-16 und das Adenosin von Siglec-11 zu sehen. Bei Pfeil 2 ist das um 4 BP nach rechts verschobene Adenosin von Siglec-P16 zu sehen.

2.2.8 Nachweis von Siglec-16-Gentranskript in humanem Hirngewebe

Die RNA wurde aus humanem Hirngewebe mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (siehe Kapitel 2.2.1) isoliert und mittels reverser Transkriptase in komplementäre cDNA (siehe Kapitel 2.2.2) umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine PCR (siehe Kapitel 2.2.3) mit 200 ng cDNA und den Primern Siglec-16-RT-PCR-Forward-1 (5'-GAAGATCCTGCTTCTCTGC-3') und Siglec-16-RT-PCR-Reverse-1 (5'-TTAGTCCGTGACAGCGTC-3') oder Human-GAPDH-Forward (5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3') und Human-GAPDH-Reverse (5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3') unter folgenden Reaktionsbedingungen [1 x (94 °C → 3 Minuten); 36 x (94 °C → 45 Sekunden; 60 °C → 45 Sekunden; 72 °C → 45 Sekunden); 1 x (72 °C → 10 Minuten)] durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 1 % Agarosegel (PeqGold Universal Agarose Peqlab) mit Ethidiumbromid (Carl Roth) 1:10.000 aufgetragen und mittels Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

2.2.9 Nachweis von Siglec-16 auf humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM)

An Tag 1 wurden 100.000 Zellen/Well der iPSdM Linien 1, 2 und ALS auf einer 6 Well Platte (Sigma Aldrich) in N2-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellscrapers (Sigma Aldrich) von der Zellkulturschale gekratzt, 3 x in 1 ml DPBS (Gibco) gewaschen und mit dem direkt gekoppelten Antikörper Anti-human Siglec-16-APC (R&D Systems) oder Mouse IgG2B Isotype Control-APC (R&D Systems) markiert. Die Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie mit einem FACS Canto II (BD Bioscience) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo v9.8.1 (FlowJo, LLC).

2.2.10 Bestimmung des Einflusses von Immunstimulation auf die Genexpression von Siglec-16 in humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM)

An Tag 1 wurden 100.000 Zellen/Well der iPSdM Linie 1 auf einer 6 Well Platte (Sigma Aldrich) in N2-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 2 erfolgte die Stimulation mit LPS (Enzo), TNF- α (R&D), Interferon- γ (R&D) und Interleukin-4 (Sigma Aldrich) über 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Kontrolle wurden nicht

stimulierte Zellen verwendet. An Tag 3 wurde das Medium abgenommen und die Zellen in 1 ml TRIzol Reagent (Ambion) lysiert. Die RNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (siehe Kapitel 2.2.1) isoliert und mittels Reverser Transkriptase (siehe Kapitel 2.2.2) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Die Expressionlevel von Siglec-16 und GAPDH wurden mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (siehe Kapitel 2.2.4) untersucht. Die relativen Expressionslevel von Siglec-16 wurden mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode bestimmt. Als Referenzgen diente die Expression des Housekeepergens GAPDH. Es wurden folgende Primerpaare verwendet: Siglec-16-RT-PCR-Forward-2 (5'-CCGGTGACGGTCATCTGTG-3'), Siglec-16-RT-PCR-Reverse-2 (5'-AGTTGGAGGGA-GGCCACAC-3'), Human-GAPDH-Forward (5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3') und Human-GAPDH-Reverse (5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'). Die Spezifität der Amplifizierung wurde mit Hilfe der Schmelzkurve bestätigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test.

2.2.11 Die Klonierung des pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP-Plasmids

Das Siglec-16 Gen wurde mit den Primern Siglec-16-EcoRIII-Forward (5'-AAAGCGCTC-TCGAGGCCACC-3') und Siglec-16-EcoRI-Reverse (5'-CGACGAATTCTTAGTCCGTG-AC-3') vom Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid (siehe Abb. 34) mittels PCR amplifiziert. Die Primer enthielten endständig die Sequenz für die Endonucleasen Eco47III und EcoRI, welche eine spezifische Integration in das pLenti-EF1a-IRES-GFP Plasmid ermöglichen. Das PCR-Produkt wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Siglec-16-Gen und 5 µg pLenti-EF1a-IRES-GFP Plasmid wurden mit den Restriktionsenzymen Eco47III (Roche) und EcoRI (Roche) in 1 x SuRE/Cut Buffer H (Roche) bei 37 °C über 2 Stunden verdaut. Das Produkt wurde auf ein 1 % Agarosegel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) mit GelStar (Lonza) 1:10.000 als Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen und mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss wurden das Siglec-16-Gen und das pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmid unter Blaulicht auf dem Dark Reader Transilluminator (Clare Chemical Research) ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Das Siglec-16 Gen und das pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmid wurden mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) verbunden

und mittels Transformation (siehe Kapitel 2.2.5) und Minipräparation (QIAquick Spin Miniprep Kit, Qiagen) vervielfältigt. Um eine erfolgreiche Klonierung zu überprüfen wurde das pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP-Plasmid mit den Primern Siglec-16-Sequencing-Reverse-1 (5'-GCTTCCTCTCTCCACCCGAA-3'), Siglec-16-Sequencing-Forward-1 (5'-ATGGCTGGGACGAGTCTACTGC-3'), Siglec-16-Sequencing-Forward-2 (5'-AACCAGACCAAGCACCTCCCAC-3') und Siglec-16-Sequencing-Forward-3 (5'-TGCCTCGGGTCAAATGG-3') sequenziert. Die Sequenzierung wurde von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit dem Programm ApE- A plasmid Editor v2.0.46.

2.2.12 Überexpression von Siglec-16 auf HEK 293 T Zellen

An Tag 1 wurden HEK 293 T Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen/Well auf einer 6 Well Platte (Sigma Aldrich) in MEF-Medium ausgesät und über 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurden 10 µl Lipocetamine 2000 (Invitrogen) mit 150 µl Opti-MEM I (Gibco) und 5 µg des pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP-Plasmids oder pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmids mit 150 µl Opti-MEM I (Gibco) pro Well vermischt. Dies wurde im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA-Lipid-Komplexe wurden zu den am Tag zuvor ausgesäten HEK 293 T Zellen gegeben und diese über 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die EGFP-Expression wurde mit Hilfe eines Axiovert 200 M Inversmikroskop (Carl Zeiss) überprüft. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellscrapers (Sigma Aldrich) vom Boden der Zellkulturschale gelöst, 3 x in 1 ml DPBS (Gibco) gewaschen und mit den direkt gekoppelten Antikörpern Anti-human Siglec-16-APC (R&D Systems) oder Mouse IgG2B Isotype Control-APC (R&D Systems) markiert. Die Antikörperbindung auf den EGFP positiven Zellen wurde mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie mit einem FACS Canto II (BD Bioscience) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo v9.8.1 (FlowJo, LLC).

2.2.13 Erzeugung von lentiviralen Partikeln

An Tag 1 wurden 6,5 Millionen HEK 293 FT Zellen auf einer 150 mm mit Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich) beschichteten Zellkulturschale (Sigma Aldrich) in MEF-Medium ausge-

sät und über 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurden 3,75 ml Opti-MEM I (Gibco) mit 90 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) und 3,75 ml Opti-MEM I (Gibco) mit 10 µg von pMD2.G (Addgene, 2014 a), 5 µg von psPAX2 (Addgene, 2014 b) und 5 µg von pLenti-EF1a-IRES-GFP oder pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP vermischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Im Folgenden wurde beides miteinander vermischt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das MEF-Medium von den Zellen entfernt und durch Opti-MEM I (Gibco) mit 10 % FCS (Gibco) ersetzt. Die Lipofectamine 2000/Plasmid-Mischung wurde zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5 % CO₂ für 16 Stunden inkubiert. An Tag 3 wurde das Medium durch 20 ml MEF-Medium ersetzt. An Tag 4 und 5 wurden das virushaltige Medium abgenommen und mittels eines 45 µm Spritzenfilters (Sartorius) Zellrückstände entfernt. Drei Teile des aufgereinigten Mediums wurden mit einem Teil von Lenti-X-Concentrator (Clontech) in einem 50 ml Falcon Conical Tube (BDBiosciences) vermischt und bei 4 °C für 24 Stunden inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe bei 1.500 x g und 4 °C für 45 Minuten in einer Megafuge 16R (Heraeus) wurde der Überstand abgenommen und das weiße Pellet in 5 ml DMEM (Gibco) gelöst bei - 80 °C gelagert.

2.2.14 Lentivirale Transduktion der murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM)

An Tag 1 wurden 100.000 Zellen/Well der ESdM auf einer 6 Well Platte (Sigma Aldrich) in N2-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurde das Medium abgenommen und 1 ml N-2 Medium zusammen mit 0,5 ml von in DMEM (Gibco) gelösten lentiviralen Partikeln auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden mit 800 x g bei 32 °C für 45 Minuten in einer Megafuge 16R (Heraeus) zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ über 16 Stunden inkubiert. Die lentivirale Transduktion wurde am nächsten Tag wiederholt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 2 Tage inkubiert. Die EGFP-Expression wurde mit Hilfe eines Axiovert 200 M Inversmikroskop (Carl Zeiss) überprüft.

2.2.15 FACS-sorting

Die mit pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP-Plasmid oder pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmid lentiviral transfizierten ESdM wurden auf 150 mm Zellkulturschalen (Sigma Aldrich) in N2-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Kontrolle wurden ESdM ohne EGFP-Expression verwendet. Bei einer Zelldichte von 80-90 % wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellscrapers (Sigma Aldrich) vom Boden der Schale gelöst und in 10 ml N2-Medium auf Eis gelagert. Die Zellen wurden dann in der Flow Cytometry Core Facility Bonn mit Hilfe eines FACSAria sortiert. Das FACS-sorting wurde von Herrn Peter Wurst durchgeführt. Im Anschluss wurden die EGFP-positiven Zellen in 150 mm Zellkulturschalen (Sigma Aldrich) in N2-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Prophylaxe vor einer Kontamination mit Mycoplasmen wurden die Zellen mit Plasmocin (2,5 mg/ml) behandelt.

2.2.16 Einfluss von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1 in murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM)

An Tag 1 wurden 100.000 Zellen/Well der zuvor selektionierten mit pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP-Plasmid oder pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmid lentiviral transfizierten ESdM auf einer 6 Well Platte (Sigma Aldrich) in N2-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit PSA-20 (1,5 μ M) über 24 Stunden behandelt. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte ESdM verwendet. An Tag 3 wurde die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (siehe 2.2.1) isoliert und mittels reverser Transkriptase (siehe 2.2.2) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Die Expressionslevel von TNF- α , IL-1 β , Iba1 und GAPDH wurden mittels quantitativer real-time PCR untersucht (siehe Kapitel 2.2.4). Die relativen Expressionslevel wurden mit der 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Methode bestimmt. Als Referenzgen diente die Expression des Housekeepergens GAPDH. Es wurden folgende Primerpaare verwendet: Mouse-TNF α -Forward (5'-CCGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'), Mouse-TNF α -Reverse (5'-ACGGCAGAGAGGAGGTTGACTT-3'), Mouse-IL-1 β -Forward (5'-ACAACAAAAAGCCTCGTGCTG-3'), Mouse-IL-1 β -Reverse (5'-CCATTGAGGTGG-AGAGCTTTCA-3'), Mouse-Iba1-Forward (5'-GAAGCGAATGCTGGAGAAAC-3'), Mouse-Iba1-Reverse (5'-AAGATGGCAGATCTCTTGCC-3'), Mouse-GAPDH-Forward (5'-ACAACCTTTGGCATTGTGGAA-3') und Mouse-GAPDH-Reverse (5'-GATGCAGGG-

ATGATGTTCTG-3'). Die Spezifität der Amplifizierung wurde mit Hilfe der Schmelzkurve bestätigt. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's T-Test durchgeführt.

2.2.17 Beads Phagozytose Assay

An Tag 1 wurden 100.000 Zellen/Well der zuvor selektionierten mit pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-GFP-Plasmid oder pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmid lentiviral transfizierten ESdM auf einer 6 Well Platte (Sigma Aldrich) in N2-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit PSA-20 (1,5 µM) über 24 Stunden behandelt. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte ESdM verwendet. An Tag 3 wurden die Zellen mit Latex Beads (Alfa) in einer Konzentration von 1 µl Latex Beads/1 ml N-2 Medium über 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Die Zellen wurden mit 1,5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco) vom Boden der Zellkulturschale gelöst und bei 6.000 U/min in einer Tischzentrifuge für 3 Minuten zentrifugiert. Die ESdM wurden 3 x mit 1 ml DPBS (Gibco) gewaschen und anschließend in 0,5 ml DPBS (Gibco) suspensiert. Die Phagozytoserate wurde mittels Durchflusszytometrie auf einem FACSCanto II (BD Bioscience) gemessen. Die Auswertung wurde mit dem Programm FlowJo v9.8.1 (FlowJo, LLC) durchgeführt.

2.2.18 Klonierung des Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmids

Für die Erzeugung des Siglec-16-Transgens wurde der vollständige Exonbereich des Siglec-16-Gens im Austausch mit dem Exonbereich des Siglec-11-Gens in das PLL-PGK-Neo-Iba1-Siglec-11-WPRE-Plasmid (Wang, 2009) kloniert. Hierzu wurde zunächst die PGK-NEO-Kassette mit den Restriktionsenzymen XbaI (New England Biolabs) und NotI (New England Biolabs) herausgeschnitten um eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle des Restriktionsenzym Agel zu entfernen. Das Produkt wurde auf ein 1 % Agarosegel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) mit GelStar (Lonza) 1:10.000 als Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen und mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss wurde der PLL-Iba1-Siglec-11-WPRE-Hintergrund unter Blaulicht auf dem Dark Reader Transilluminator (Clare Chemical Research) ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Die entstandenen nicht komplementären klebrigen Enden wurden mit dem Klenow Enzyme (New

England Biolabs) in glatte Enden umgewandelt und mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) wieder verbunden. Durch die Transformation von chemisch kompetent gemachten Bakterienzellen (siehe Kapitel 2.2.5) und folgender Minipreparation (QIAquick Spin Miniprep Kit, Qiagen) wurde das so entstandene Plasmid (PLL-Iba1-Siglec-11-WPRE Plasmid) vervielfältigt. Um die korrekte Deletion der PGK-NEO-Kassette zu bestätigen, wurde eine Sequenzierung mit den Primern PGK-Forward (5'-TAGCACGTCTCACTAGTCTCG-3') und Neo-Reverse (5'-TTTCTCGGCAGGAGCAAGGT-3') durchgeführt. Die Sequenzierung wurde von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH ausgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm Gentle 1.9.4 (<http://gentle.magnusmanske.de>) ausgewertet.

Der Exonbereich des Siglec-16-Gens wurde mittels Amplifizierung des Exonbereichs des Siglec-16-Gens auf dem p3xFLAG-CMV9-Siglec16-Plasmid (Ajit Varki Laboratories) erzeugt. Hierzu wurde eine PCR (siehe Kapitel 2.2.3) mit 100-200 ng p3xFLAG-CMV9-Siglec16-Plasmid mit den Primern Siglec-16-Agel (5'-AAAGACCGGTGCTCCTGTGGCCACTAAC-3'), Siglec-16-EcoRI (5'-GATCCGAATTCTTAGTCCGTGACAGCGTCTG-3') und der Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) unter folgenden Reaktionsbedingungen [1 x (94 °C → 3 Minuten); 36 x (94 °C → 35 Sekunden; 61 °C → 40 Sekunden; 68 °C → 120 Sekunden); 1 x (68 °C → 10 Minuten)] durchgeführt.

Das PCR-Produkt und das PLL-Iba1-Siglec-11-WPRE-Plasmid wurden mit den Restriktionsenzymen Agel (New England Biolabs) und EcoRI (New England Biolabs) verdaut. Das Produkt wurde auf ein 1 % Agarosegel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) mit GelStar (Lonza) 1:10.000 als Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen und mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss wurden das Siglec-16-Gen und der PLL-Iba1-WPRE-Plasmid-Hintergrund unter Blaulicht auf dem Dark Reader Transilluminator (Clare Chemical Research) ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Die beiden Fragmente wurden mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) verbunden und mittels Transformation (siehe Kapitel 2.2.5) und Minipreparation (QIAquick Spin Miniprep Kit, Qiagen) vervielfältigt. Um eine erfolgreiche Klonierung des Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmids zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung mit folgenden Primern durchgeführt: Siglec-16-Sequencing-

Reverse-1 (5'-GCTTCCTCTCTCCACCCGAA-3'), Siglec-16-Sequencing-Forward-1 (5'-ATGGCTGGGACGAGTCTACTGC-3'), Siglec-16-Sequencing-Forward-2 (5'-AACCAG-ACCAAGCACCTCCCAC-3'), Siglec-16-Sequencing-Forward-3 (5'-TGCCTCGGGTTC-AAATGG-3'), Iba1-Sequencing-Forward-1 (5'-ATCGATTACTATAGGATGCATCGTG-3'), Iba1-Sequencing-Forward-2 (5'-GGGAGTTAGCAAGGGAATGAGT-3'), Iba1-Sequencing-Forward-3 (5'-CAAGGCTATCCCTGGTATGAG-3'), Iba1-Sequencing-Forward-4 (5'-CTCCGGGAGCTGATCTAAGTCTTTC-3'), Iba1-Sequencing-Reverse-1 (5'-CTCAT-ACCAGGGATAGCCTT-3'), Iba1-Sequencing-Reverse-2 (5'-GTGTGGAAAGGCACCA-GGAT-3') und Iba1-Sequencing-Reverse-3 (5'-CTGAACTTGTGGCCGTTTAC-3'). Die Sequenzierung wurde von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm Gentle 1.9.4 (<http://gentle.magnusmanske.de>) ausgewertet. Mit dem NucleoBond Xtra Maxi EF Kit (Macherey Nagel) wurde eine Maxipräparation zur Vervielfältigung von Endotoxin-freiem Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid durchgeführt.

2.2.19 Isolierung des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens

Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen wurde aus dem Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid mit den Restriktionsenzymen Nsil, NdeI und BsiEI isoliert. Hierzu wurden 10 µg des Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmids mit den Restriktionsenzymen Nsil (New England Biolabs) und NdeI (New England Biolabs) bei 37 °C über 4 Stunden verdaut. Die erfolgreiche Restriktion wurde mittels Elektrophorese auf einem 1 % Agarosegel mit 1:10.000 Ethidiumbromid (Carl Roth) überprüft. Das Produkt wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey Nagel) nach dem Plasmid DNA clean-up Protokoll aufgereinigt. Im Anschluss folgte ein Verdau mit dem Restriktionsenzym BsiEI (New England Biolabs) bei 60 °C über 4 Stunden. Das Produkt wurde auf ein 1 % Agarosegel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) mit 1:10.000 Gelstar (Lonza) als Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen und mittels Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss wurde das 4.045 Basenpaare große Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen unter Blaulicht auf dem Dark Reader Transilluminator (Clare Chemical Research) ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey Nagel) wurde das extrahierte Fragment nach Herstel-

lerangaben aufgereinigt. Das Iba1-Siglec-16-WPRE Transgen wurde mit einer Konzentration von 3-5 ng/μl in EmbryoMax Injection Buffer (Millipore) gelöst.

2.2.20 Pronukleäre Injektion des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens

Das isolierte und aufgereinigte Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen wurde mit einer Konzentration von 3-5 ng/μl in EmbryoMax Injection Buffer (Millipore) mittels Mikroinjektion in den Pronukleus von Mausembryonen eingebracht. Daraufhin erfolgte eine Weiterentwicklung der Embryonen in vitro und ein anschließender transzervikaler Transfer in pseudoträchtige, zyklussynchronisierte Empfängertiere.

Die Mausembryonen entstammten aus einer Verpaarung von B6D2F1 Weibchen mit C57Bl/6 Männchen. Da die Mauslinie B6D2F1 aus einer Kreuzung der Linien C57Bl/6 mit DBA entstanden ist, beträgt der Anteil des C57Bl/6 Genoms bereits 75 % des Genoms der ersten Generation F1.

Die Mikroinjektion und der Embryonentransfer wurden von Frau Charlotte Schick im Haus für Experimentelle Therapie Bonn durchgeführt.

2.2.21 Bestimmung des Genotyps der Siglec-16 transgenen Mäuse

Die Bestimmung des Genotyps der Iba1-Siglec-16-WPRE transgenen Mäuse erfolgte mittels PCR von genomischer DNA, die aus Schwanzspitzen oder Ohrmuscheln gewonnen wurde. Die Isolation der genomischen DNA und die PCR wurden mit dem REXtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma Aldrich) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR wurde mit den Primern, Siglec-16-rtPCR-Forward-1 (5'-GAAGATCCTGCTTC-TCTGC-3'), Siglec-16-rtPCR-Reverse-1 (5'-TTAGTCCGTGACAGCGTC-3') Siglec-16-rtPCR-Forward-2 (5'-CCGGTGACGGTCATCTGTG-3') und Siglec-16-rtPCR-Reverse-2 (5'-AGTTGGAGGGAGGCCACAC-3') unter folgenden Reaktionsbedingungen [1 x (94 °C → 3 Minuten); 35 x (94 °C → 45 Sekunden; 58 °C → 45 Sekunden; 72 °C → 45 Sekunden); 1 x (72 °C → 10 Minuten)] durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 1 % Agarosegel (PeqGold Universal Agarose Peqlab) mit Ethidiumbromid (Carl Roth) 1:10.000 aufgetragen und mittels Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

2.2.22 Bestimmung der Anzahl der integrierten Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgene

Für die Bestimmung der in das Genom integrierten Transgene wurde zunächst die genomische DNA mit Hilfe des GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) aus Schwanzspitzen nach Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss wurde eine quantitative real-time PCR (siehe Kapitel 2.2.4) mit 1 µg genomischer DNA und den Primern Siglec-16-rtPCR-Forward-2 (5'-CCGGTGACGGTCATCTGTG-3') und Siglec-16-rtPCR-Reverse-2 (5'-AGTTGGAGGGAGGCCACAC-3') durchgeführt. Als Standard für die jeweilige Menge an integrierten Transgenen wurden äquivalente Mengen des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens verwendet (0,5 Genkopien: 0,335 pg; 5 Genkopien: 3,35 pg; 10 Genkopien: 6,7 pg). Für die Berechnung der äquivalenten Mengen siehe Abb. 36 c). Die Werte des Standards wurden graphisch aufgetragen und mit Hilfe der Ausgleichsgerade die Formel zur Berechnung der Anzahl der in das Genom integrierten Genkopien ermittelt (siehe Abb. 36 b)).

2.2.23 Southern Blot

Die genomische DNA wurde aus Schwanzspitzen und Lebergewebe mit dem GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben isoliert. Im folgenden wurden 10 µg genomische DNA je Probe mit dem Restriktionsenzym EcoRI (New England Biolabs) verdaut und in einem 0,8 % Agarosegel (PeqGold Universal Agarose, Peqlab) mit Ethidiumbromid (Carl Roth) 1:10.000 mittels Elektrophorese bei 50 V über 3,5 Stunden der Größe nach aufgetrennt. Als Standard wurde Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen in entsprechenden Konzentrationen (1 Genkopie: 6,7 pg; 3 Genkopien: 20,1 pg; 5 Genkopien: 33,5 pg; 10 Genkopien: 67 pg; für die Berechnung der äquivalenten Mengen siehe Abb. 37 c)) zusammen mit 10 µg genomischer DNA von Iba1-Siglec-16-WPRE-negativen Tieren geladen. Die Auftrennung wurde unter UV-Licht kontrolliert und fotografiert. Um eine Bindung der spezifischen einzelsträngigen DNA-Sonden an das Transgenfragment zu ermöglichen, mussten die DNA-Doppelstränge in alkalischem Milieu zu Einzelsträngen denaturiert werden. Hierzu wurde das Agarose Gel zwei mal über 15 Minuten in zwei Gelvolumen Denaturierungspuffer (NaCl: 1,5 mol/l; NaOH: 0,5 mol/l) und im Anschluss zwei mal über 15 Minuten in zwei Gelvolumen Neutralisierungspuffer (NaCl: 1,5 mol/l; Tris-HCl (pH 7,2): 0,5 mol/l; EDTA: 0,1 mmol/l) getränkt. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe der Kapillarkraft von

dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond-N+ Nylon Membrane, GE Healthcare) für 16-24 Stunden übertragen (geblottet). Als Transferpuffer wurde 20 x SSC-Puffer (tri-Natriumcitrat Dihydrat: 0,3 mol/l; NaCl: 3 mol/l) verwendet. Anschließend wurde die genomische DNA mittels UV Licht (Wellenlänge 254 nm) in einem UV-Crosslinker (2400 UV-Stratalinker, Stratagene) auf der Nylonmembran fixiert. Im Folgenden wurde die Membran zunächst in Prähybridisierungslösung (6 x SSC, 5 x Denhardt's Solution (100 x: 2 % BSA (Sigma-Aldrich), 2 % Ficoll (Sigma-Aldrich), 2 % PVP (Sigma-Aldrich)), 50 % Formamid (Carl Roth), 0,5 % SDS) mit 100 µg/ml einzelsträngiger DNA aus Lachshoden (Deoxyribonucleic acid, single stranded from salmon testes, Sigma-Aldrich) für 2 Stunden bei 42 °C und im Anschluss in Prähybridisierungslösung mit 10 ng/ml mit Biotin markierten einzelsträngigen DNA-Sonden 16-24 Stunden bei 42 °C bei 60 U/min inkubiert. Die mit Biotin markierten einzelsträngigen DNA-Sonden wurden aus 500 ng Iba1-Siglec16-WER-Transgen mit dem Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben und anschließender Erhitzung auf 99 °C für 5 Minuten hergestellt. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Nylonmembran in Waschlösung A (2 x SSC, 0,1 % SDS) und Waschlösung B (0,2 x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen und mit dem Phototope-Star Detection Kit (New England Biolabs) nach Herstellerangaben behandelt. Im Folgenden wurde mit der Nylonmembran ein Röntgenfilm (Kodak) über 10-20 Minuten in einer Dunkelkammer belichtet und dieser in einem AGFA Curix 60 Röntgenfilmentwickler (AGFA) entwickelt.

2.2.24 Expression von Siglec-16 in verschiedenen Geweben der transgenen Maus

Die Mäuse wurden mit Tribromoethanol (Avertin; 250 mg/kgKG) intraperitoneal betäubt, transkardial Blut entnommen und danach mit 4 °C kaltem DPBS (Gibco) perfundiert. Die Organe Gehirn, Leber und Milz wurden entnommen und die RNA mit Hilfe des RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die in den Proben enthaltene DNA wurde mittels DNase fragmentiert. Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase (siehe Kapitel 2.2.2) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Zum Nachweis einer Expression von Siglec-16 wurde eine PCR (siehe Kapitel 2.2.3) mit den Primern Siglec-16-rtPCR-Forward-2 (5'-CCGGTGACGGTCATCTGTG-3') und Siglec-16-rtPCR-Reverse-2

(5'-AG-TTGGAGGGAGGCCACAC-3') unter folgenden Reaktionsbedingungen [1 x (94 °C → 3 Minuten); 35 x (94 °C → 45 Sekunden; 58 °C → 45 Sekunden; 72 °C → 45 Sekunden); 1 x (72 °C → 10 Minuten)] durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine PCR mit den Primern Mouse-GAPDH-Forward (5'-ACAACCTTTGGCATTGTGGAA-3') und Mouse-GAPDH-Reverse (5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG-3') unter folgenden Reaktionsbedingungen [1 x (94 °C → 3 Minuten); 35 x (94 °C → 45 Sekunden; 60 °C → 45 Sekunden; 72 °C → 45 Sekunden); 1 x (72 °C → 10 Minuten)] durchgeführt. Das PCR Produkt wurde auf ein 1 % Agarosegel (PeqGold Universal Agarose Peqlab) mit Ethidiumbromid (Carl Roth) 1:10.000 aufgetragen und mittels Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

2.2.25 Isolation von Mikroglia aus murinem Hirngewebe

Zunächst wurden die Mäuse mit Tribromoethanol (Avertin; 250 mg/kgKG) intraperitoneal betäubt, transkardial mit 4 °C kaltem HBSS (Gibco) perfundiert und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde im Anschluss mit dem Stempelende einer 10 ml Kunststoffspritze (BD) durch ein 70 µm Micro-Sieb (Falcon) gedrückt und so die einzelnen Zellen separiert. Die Zellen wurden in 10 ml HBSS (Gibco) gewaschen und bei 300 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 ml 37 % Percoll-HBSS (Percoll-HBSS: 9 Teile Percoll (GE Healthcare), 1 Teil 10 x HBSS (Gibco)) suspendiert. Im Anschluss wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit 3 ml 70 % Percoll-HBSS, 5 ml 37 % Percoll-HBSS-Zellsuspension, 4 ml 30 % Percoll-HBSS und 2 ml HBSS hergestellt. Dies wurde durch eine in umgekehrter Reihenfolge durchgeführte Schichtung mit Hilfe einer 10 ml Spritze (BD Plastipak Spritze) und einer 0,90 x 70 mm Kanüle (Sterican) erreicht. Der Gradient wurde bei 18 °C und 200 x g für 40 Minuten bei ausgeschalteter Bremsfunktion zentrifugiert. Bei erfolgreicher Gradientenisolation war in der Interphase zwischen 70 % und 37 % Percoll ein weißer Ring mit den darin enthaltenen Mikrogliazellen zu sehen. Der Überstand mit Zelltrümmern wurde mit einer 5 ml Einmalpipette (Falcon) abgenommen und die Interphase zwischen den Schichten mit einer 1.000 µl Mikroliterpipette aufgenommen. Diese wurde mit mindestens der dreifachen Menge an HBSS verdünnt und für 7 Minuten bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 7 ml HBSS (Gibco) gewaschen und erneut bei

4 °C und 500 x g zentrifugiert. Mit den Antikörpern Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (BD Bioscience) wurde ein Fc Block durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mit den direktgekoppelten Antikörpern Anti-human Siglec-16-APC (R&D Systems) (Isotypenkontrolle: Mouse IgG2B Isotype Control-APC, R&D Systems), Anti-human Siglec-11-Phycoerythrin (R&D Systems) (Isotypenkontrolle: Goat IgG PE-conjugated Antibody, R&D Systems), Anti-mouse CD45 V450 (BD Bioscience), Anti-mouse CD11b APC-Cy7 (BD Bioscience) markiert und die Bindung mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie mit einem FACS Canto II (BD Bioscience) gemessen. Die Auswertung wurde mit dem Programm FlowJo v9.8.1 (FlowJo, LLC) durchgeführt.

2.2.26 Einfluss von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α und IL-1 β im transgenen Mausmodell

Es wurden 6-8 Wochen alte, männliche Iba1-Siglec-16-WPRE transgene Mäuse der 6. Generation verwendet. Als negative Kontrollen wurden negative Tiere der gleichen Generation verwendet. Den Mäusen wurde an vier aufeinander folgenden Tagen LPS (1 μ g/kgKG, Sigma Aldrich) oder DPBS (100 μ l/kgKG, Gibco) intraperitoneal injiziert. Am fünften Tag wurden die Mäuse mit Tribromoethanol (Avertin; 250 mg/kgKG) intraperitoneal betäubt und transkardial mit 4 °C kaltem DPBS (Gibco) perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (siehe Kapitel 2.2.1) isoliert. Die RNA wurde der reversen Transkriptase (siehe Kapitel 2.2.2) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Die Expressionslevel von TNF- α , IL-1 β und GAPDH wurden mittels quantitativer real-time PCR untersucht (siehe Kapitel 2.2.4). Die relativen Expressionslevel wurden mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode bestimmt. Als Referenzgen diente die Expression des Housekeepergens GAPDH. Es wurden folgende Primerpaare verwendet: Mouse-TNF- α -Forward (5'-CCGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'), Mouse-TNF- α -Reverse: (5'-ACGGCAGAGAGGAGGTTGACTT-3'), Mouse-IL-1 β -Forward (5'-ACAACAAAAAAGCCTCGTGCTG-3'), Mouse-IL-1 β -Reverse (5'-CCATTGAGGTGGAGAGCTTTCA-3'), Mouse-GAPDH-Forward (5'-ACAACCTTTGGCATTGTGGAA-3'), Mouse-GAPDH-Reverse (5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG-3'). Die Spezifität der Amplifizierung wurde mit Hilfe der Schmelzkurve bestätigt. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's T-Test durchgeführt.

2.2.27 Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit vorliegenden statistischen Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Student's T-Test für zwei Gruppen mit der SPSS v21 Software. Die Signifikanzintervalle betragen:

*** $p < 0,001$

** $p < 0,01$

* $p < 0,05$

2.2.28 Versuchsgenehmigungen

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen an humanem Gewebe erfüllen die Bedingungen des Ethikvotums mit der Nummer 182/08.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen gentechnischen Arbeiten erfüllen die Bedingungen der Gentechnik-Anträge Az. 64-K-1.17/05, Az. 53.02.01-K-1.43/10 und Az. 53.02.01-K-1.23/15.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Tierversuche erfüllen die Bedingungen der Tierversuchsanträge „Generierung von transgenen und knock out Mauslinien zur biomedizinischen Grundlagenforschung“ (Az. 84-02.04.2012.A146) und „Die Bedeutung der systemischen Inflammation für die Neurodegeneration in Siglec-transgenen Mäusen“ (Az. 8.87-51.04.20.09.321).

2.2.29 Fremdabbildungen

Für die in dieser Arbeit verwendeten Fremdabbildungen liegen die jeweiligen Genehmigungen zum Abdruck vor.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Siglec-16 in humanem Hirngewebe und in humanen Mikroglia-Zelllinien

3.1.1 Bestimmung des Genotyps und Analyse der Allelfrequenz von Siglec-16 in humanem Hirngewebe

Das potentiell funktionelle Siglec-16-Gen besitzt in der Allgemeinbevölkerung eine Allelfrequenz von etwa 0,08-0,3 (Wang et al., 2012). Um die Bedeutung des Rezeptors untersuchen und Aussagen über den Einfluss von Homo- und Heterozygotie treffen zu können, ist deshalb eine genaue Bestimmung des Genotyps notwendig.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode beschrieben, mit der durch eine Kombination von PCR und anschließender Sequenzierung eine Genotypisierung von Gewebeproben möglich ist (siehe Kapitel 2.2.7). Hiermit wurde die genomische DNA von 27 humanen Hirngewebeproben untersucht. Diese wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Björn Scheffler (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Bonn, Stem Cell Pathologies Group) zur Verfügung gestellt. 22 der Proben entstammten hierbei aus Operationen von Gliom-Patienten und 5 aus Operationen von Nicht-Gliom-Patienten.

Die Analyse zeigte bei 2 der 27 (7,4 %) Proben einen homozygoten Siglec-16/Siglec-16-Genotyp, bei 12 der 27 (44,4 %) Proben einen heterozygoten Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp und bei 11 der 27 (40,1 %) Proben einen homozygoten Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp. 2 der 27 (7,4 %) Proben zeigten kein eindeutiges Ergebnis (siehe Tabelle 1). In der Stichprobe lag somit eine Allelfrequenz von 0,32 für das Siglec-16-Gen vor. Insgesamt besaßen 51,9 % der Proben das funktionelle Siglec-16 Gen und damit das Potential den Siglec-16-Rezeptor zu exprimieren.

Genotyp	Nicht-Gliom-Gewebe	Gliom-Gewebe	nicht-Gliom-Gewebe/Gliom-Gewebe
Siglec-16/ Siglec-16	0 (0 %)	2 (9,1 %)	2 (7,4 %)
Siglec-16/ Siglec-P16	2 (40 %)	10 (45,5 %)	12 (44,4 %)
Siglec-P16/ Siglec-P16	3 (60 %)	8 (36,3 %)	11 (40,1 %)
Nicht Eindeutig	0 (0 %)	2 (9,1 %)	2 (7,4%)
Gesamt	5	22	27

Tabelle 1: Anzahl und Häufigkeiten der verschiedenen Siglec-16-Genotypen in Gliom- und Nicht-Gliom-Gewebe.

3.1.2 Nachweis von Siglec-16-Gentranskript in humanem Hirngewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von Siglec-16 in humanem Hirngewebe mittels reverser Transkriptase untersucht. Hierzu wurden drei der zuvor genotypisierten Proben aus Operationen von Gliom-Patienten verwendet (siehe Kapitel 3.1.1). Es wurde jeweils eine Probe mit einem homozygoten Siglec-16/Siglec-16-Genotyp, einem homozygoten Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp und einem heterozygoten Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp ausgewählt.

Die RNA wurde aus dem Gewebe mittels Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode isoliert und mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Expression von Siglec-16 wurde mit Hilfe der PCR untersucht. Das verwendete Primerpaar (Siglec-16-RT-PCR-Forward-1 und Siglec-16-RT-PCR-Reverse-1) amplifiziert über einem 111 Basenpaare großen Bereich der Siglec-16 cDNA (1335-1446 Basenpaare) und ist dabei Exon-Exon-spannend.

Es zeigte sich ein positives Signal in der homozygoten Siglec-16/Siglec-16-Probe und der heterozygoten Siglec-16/Siglec-P16-Probe. Die Bande war in der homozygoten Probe stärker als in der heterozygoten Probe. Es wurde keine Quantifizierung vorge-

nommen, um dies weiter zu untersuchen. In der homozygoten Siglec-P16/Siglec-P16-Probe zeigte sich ebenfalls ein leicht positives Signal. Dies ist am ehesten mit einer leichten Restexpression des Pseudogens Siglec-P16 zu erklären. Das Signal der murinen Probe ist wegen seiner Dicke und Morphologie am ehesten als unspezifisch zu bewerten (siehe Abb. 24).

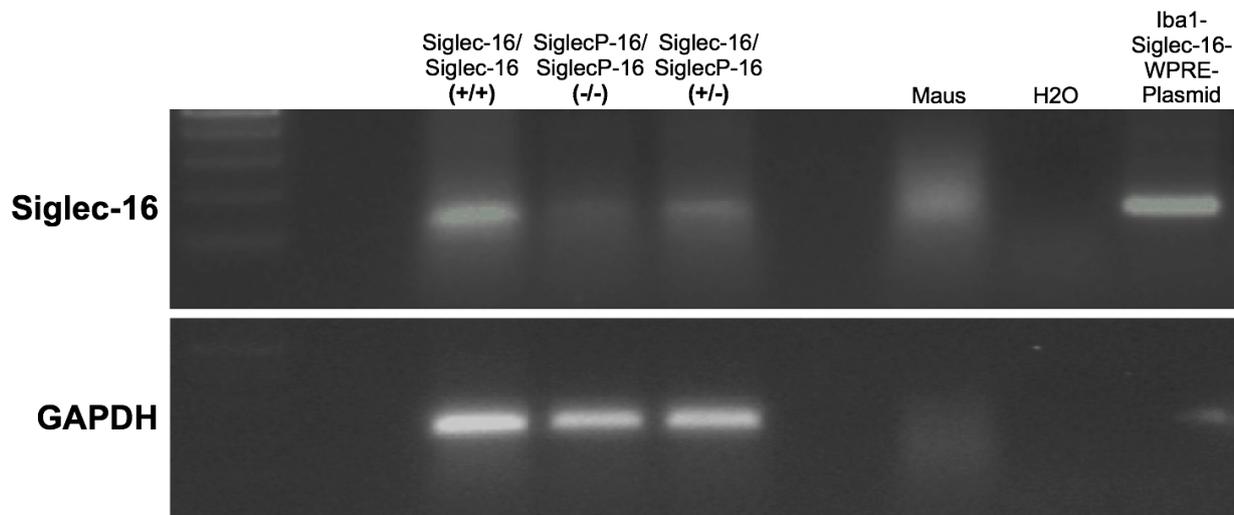


Abb. 24: Reverse Transkriptase PCR von humanen Hirnproben zum Nachweis einer Expression von Siglec-16. Untersucht wurden Proben mit einem homozygoten Siglec-16/Siglec-16-Genotyp, einem homozygotem Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp und einem heterozygoten Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp. Als Kontrollen dienten murine cDNA, Wasser, das Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid und humanes GAPDH. Zu sehen ist eine Positive Bande von Siglec-16 in der homozygoten Siglec-16/Siglec-16-Probe und der heterozygoten Siglec-16/Siglec-P16-Probe.

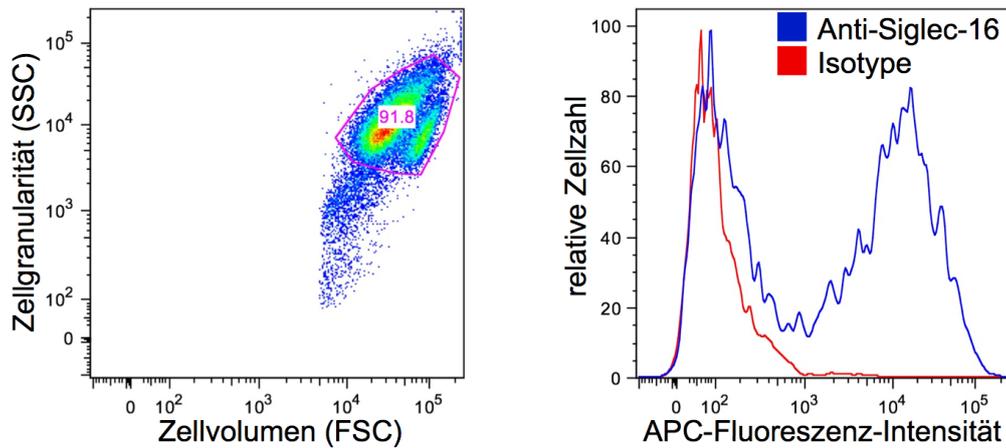
3.1.3 Nachweis von Siglec-16 auf humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM)

Um die Proteinexpression von Siglec-16 auf der Oberfläche von humanen Mikroglia nachzuweisen, wurden drei Zelllinien von humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die aus induzierten pluripotenten Stammzellen erzeugten Mikroglia (iPSdM) wurden von Frau Dr. Kristin Roy und Frau Mona Mathews generiert und zur Verfügung gestellt.

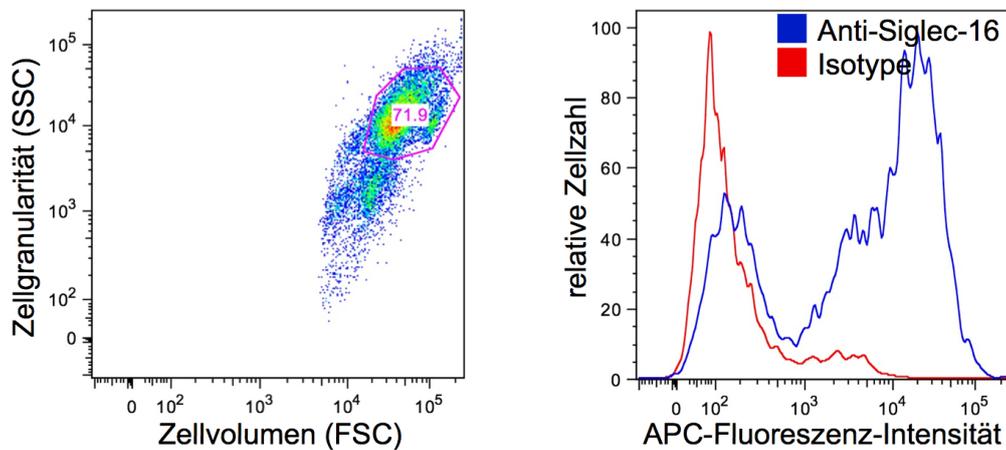
Die vorherige Genotypisierung der Zelllinien zeigte einen heterozygoten Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp für Zelllinie 1 (iPSdM-1) und einen homozygoten Siglec-16/Siglec-16-Genotyp für Zelllinie 2 (iPSdM-2) und Zelllinie 3 (iPSdM-ALS). Eine Zelllinie mit homozygotem Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp stand zur Untersuchung leider nicht zur Verfügung. Die Zellen wurden mit dem Siglec-16-spezifischen Antikörper gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Es zeigte sich eine Expression von Siglec-16 auf allen drei Zelllinien, wobei sich das Expressionsprofil der einzelnen Mikroglialinien voneinander unterschied. Bei Zelllinie 1 (Siglec-16/Siglec-P16) zeigten 57,5 %, bei Zelllinie 2 (Siglec-16/Siglec-16) 70,9 % und bei Zelllinie 3 (Siglec-16/Siglec-16) 78,5 % der Zellen eine Expression von Siglec-16 (siehe Abb. 25).

a) Zelllinie 1: iPSdM-1 (Siglec-16/Siglec-P16)



b) Zelllinie 2: iPSdM-2 (Siglec-16/Siglec-16)



c) Zelllinie 3: iPSdM-ALS (Siglec-16/Siglec-16)

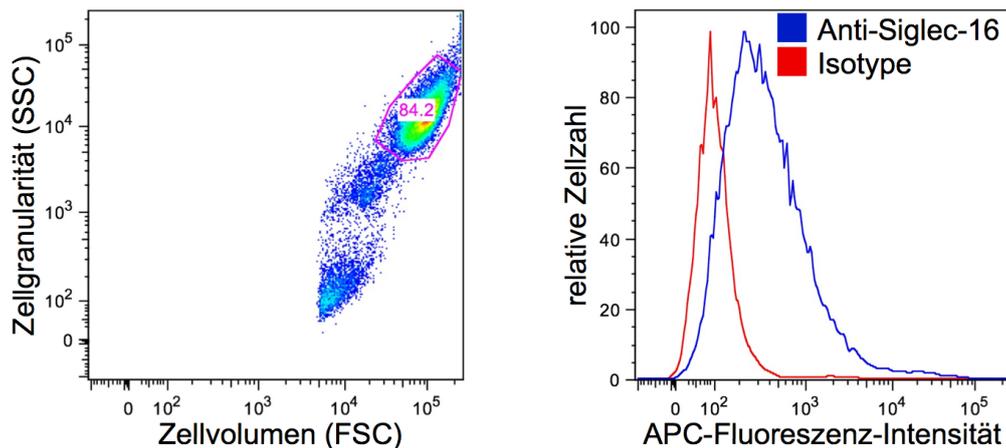


Abb. 25: Expression von Siglec-16 auf humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM). a) Zelllinie 1 (Siglec-16/Siglec-P16): 57,5 % der Zellen zeigen eine Expression von Siglec-16. b) Zelllinie 2 (Siglec-16/Siglec-16): 70,9 % der Zellen zeigen eine Expression von Siglec-16. c) Zelllinie 3 (Siglec-16/Siglec-16): 78,5 % der Zellen zeigen eine Expression von Siglec-16.

3.1.4 Einfluss von Immunstimulation auf die Genexpression von Siglec-16 in humanen aus induzierten Stammzellen generierten Mikroglia (iPSdM)

Um den Einfluss von verschiedenen Immunstimulatoren auf die Expression von Siglec-16 in Mikroglia zu untersuchen, wurden humane aus induzierten pluripotenten Stammzellen erzeugte Mikroglia (iPSdM-1) in Zellkultur mit LPS, IFN- γ , TNF- α und IL-4 stimuliert. Die RNA wurde aus den Zellen mittels Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode isoliert, mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die relative Expression von Siglec-16 mit Hilfe der quantitativen real-time PCR untersucht.

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von Siglec-16 nach Stimulation mit LPS um den Faktor $2,55 \pm 0,48$ ($p=0,036$). Die Stimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-4 erbrachte keinen signifikanten Unterschied in den Expressionsniveaus (IFN- γ : $p=0,113$; TNF- α : $p=0,159$; IL-4: $p=0,249$).

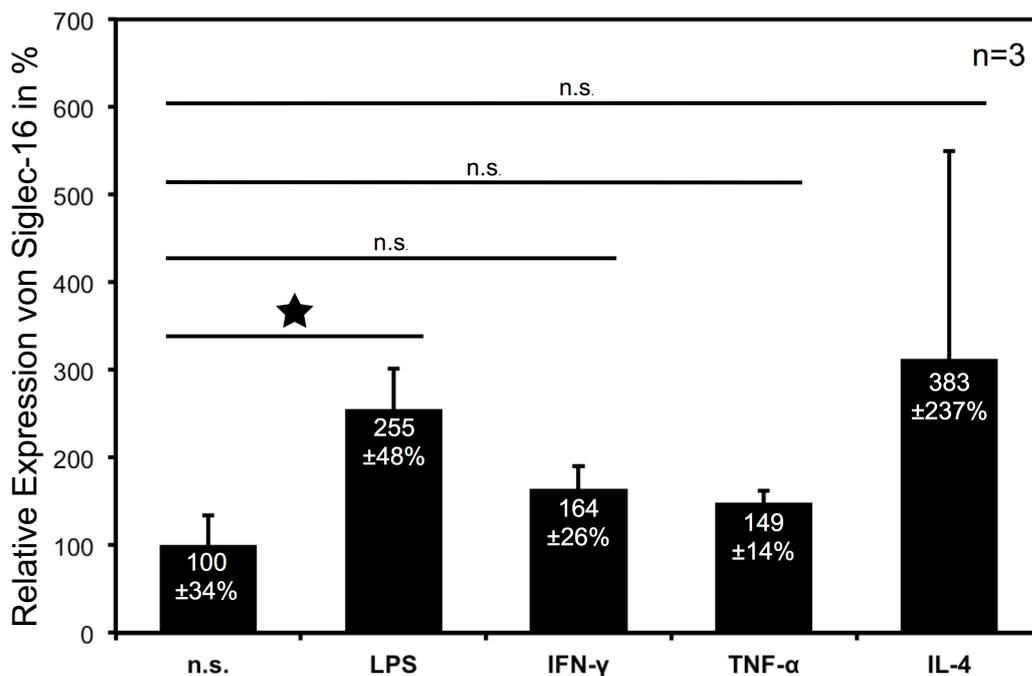


Abb. 26: Die relative Expression von Siglec-16 in aus induzierten pluripotenten Stammzellen erzeugten Mikroglia nach Stimulation mit LPS, IFN- γ , TNF- α und IL-4 ($n=3$). Nach LPS-Stimulation zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Expression von Siglec-16 um den Faktor $2,55 \pm 0,48$ ($p=0,036$). Die Expression von Siglec-16 nach Stimulation mit IFN- γ , TNF- α und IL-4 zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,113$; $p=0,159$; $p=0,249$).

3.2 Untersuchung von Siglec-16 auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM)

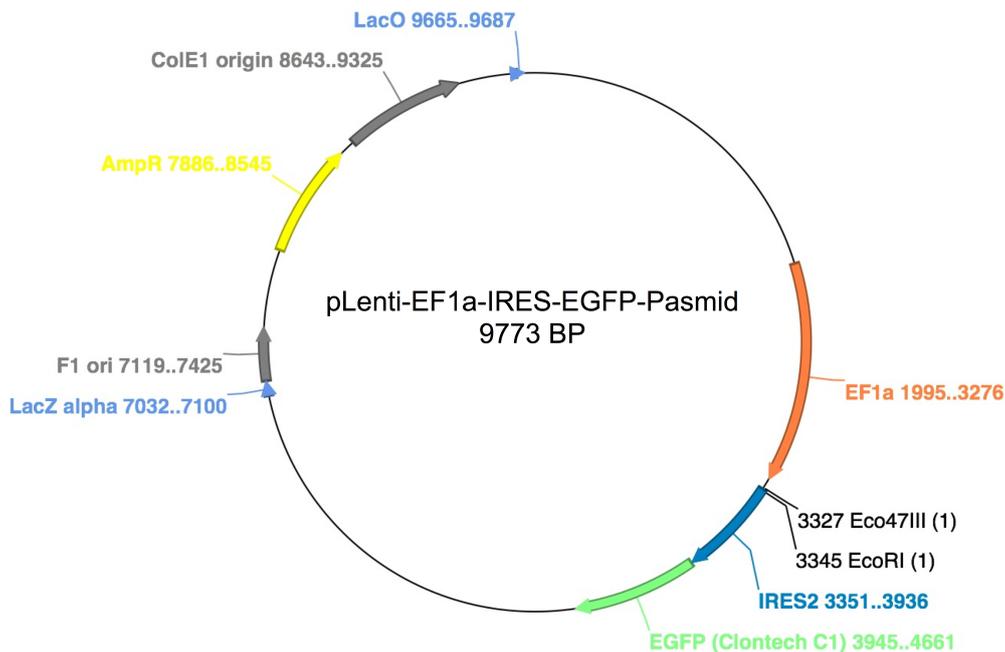
Um den Einfluss von Siglec-16 auf Mikroglia untersuchen zu können, war die Etablierung eines Zellkulturmodells notwendig. Hierzu wurde Siglec-16 mittels lentiviraler Transfektion in murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM; Beutner et al., 2010) überexprimiert. Die gleichzeitige Expression von EGFP ermöglichte die Selektion der transfizierten Zellen durch FACS-Sorting. Im Folgenden wurde der Einfluss von Siglec-16 auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren sowie auf die Phagozytoserate untersucht.

3.2.1 Das pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-GFP-Plasmid

Für die Erzeugung von lentiviralen Partikeln wurde das pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-EGFP-Plasmid kloniert. Hierzu wurde das gesamte Siglec-16-Gen des Iba1-Siglec-16-Plasmids mittels PCR amplifiziert und an den Schnittstellen Eco47III und EcoRI in das pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Plasmid integriert. Die korrekte Klonierung wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

Die Expression von Siglec-16 und EGFP steht unter der Kontrolle des EF1a-Promotors (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 alpha) (Qin et al., 2010). Die gleichzeitige Expression von Siglec-16 und EGFP wird durch die IRES-Sequenz (Internal Ribosomal Entry Site) ermöglicht (Thompson, 2012). Als Kontrolle diente das pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Plasmid, welches eine selektive Expression von EGFP bewirkt (siehe Abb. 27).

a) pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Plasmid



b) pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-EGFP-Plasmid

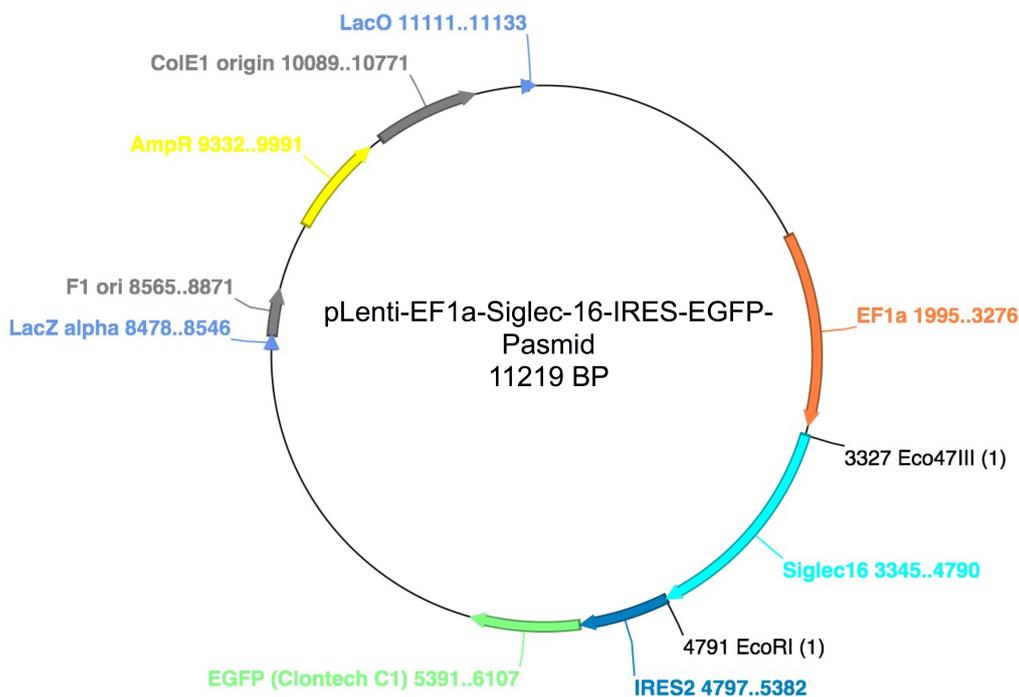


Abb. 27: a) Das 9.773 Basenpaare große pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmid ermöglicht eine Expression von EGFP auf murinen Mikrogliazellen. Die Expression steht unter der Kontrolle des EF1a-Promotors (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 alpha). b) Das 11.219 Basenpaare große pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-GFP-Plasmid ermöglicht eine simultane Expression von Siglec-16 und EGFP auf murinen Mikrogliazellen. Die Expression steht unter der Kontrolle des EF1a-Promotors. Die Gleichzeitige Expression von Siglec-16 und EGFP wird durch die IRES-Sequenz (Internal Ribosomal Entry Site) bewirkt.

3.2.2 Überexpression von Siglec-16 auf HEK 293 T Zellen

Um die korrekte Funktion des pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-EGFP-Plasmids zu zeigen, wurde das Plasmid durch Lipofektion in HEK 293 T Zellen (Human Embryonic Kidney 293T cells) eingeschleust und die Genexpression von Siglec-16 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurde die Expression von Siglec-16 nur auf EGFP-positiven Zellen gemessen. Als Kontrolle diente das pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Plasmid.

37,0 % der mit dem pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Plasmid und 44,4 % der mit dem pLenti-EF1a-Siglec16-IRES-EGFP-Plasmid transfizierten Zellen zeigten ein positives Signal für EGFP. In der EGFP-positiven Zellpopulation zeigte sich eine Expression von Siglec-16 auf den mit pLenti-Siglec-16-EF1a-IRES-EGFP-Plasmid transfizierten Zellen im Vergleich zur pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Kontrolle (siehe Abb. 28).

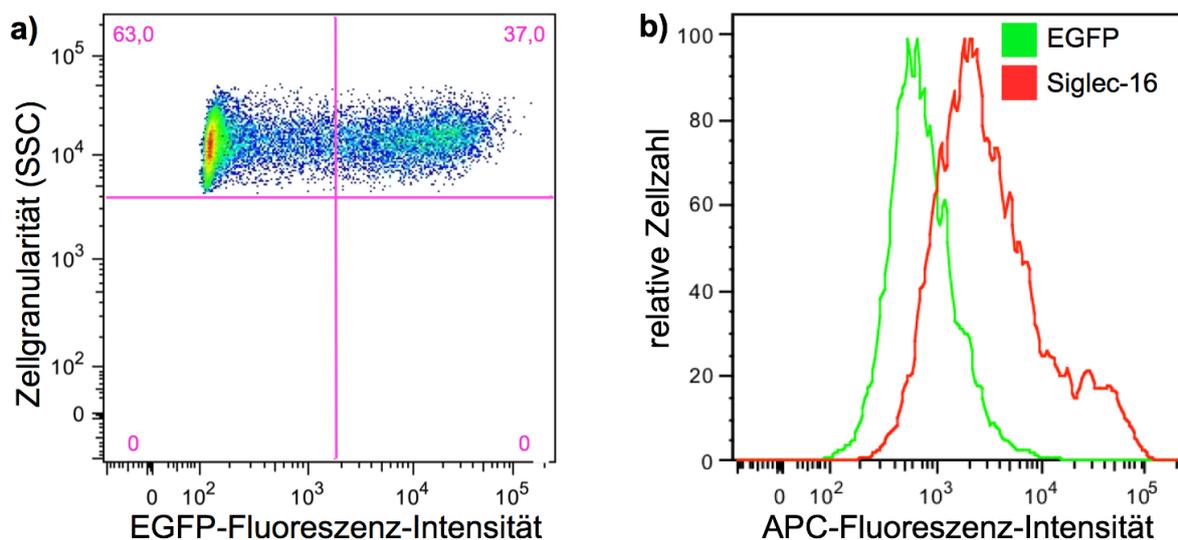


Abb. 28: Überexpression von Siglec-16 auf HEK 293 T Zellen. Untersuchung mittels Durchflusszytometrie. a) 37 % der transfizierten Zellen zeigen ein positives Signal für EGFP. b) Färbung mit dem Siglec-16-spezifischen Antikörper. Es zeigt sich eine Expression von Siglec-16 auf den mit pLenti-Siglec16-EF1a-IRES-EGFP transfizierten Zellen (rot) im Vergleich zur pLenti-EF1a-IRES-EGFP Kontrolle (grün) in der EGFP-positiven Zellpopulation.

3.2.3 Überexpression von Siglec-16 auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM)

Mit den Plasmiden pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-EGFP und pLenti-EF1a-IRES-EGFP wurden in HEK 293FT Zellen lentivirale Partikel hergestellt. Mit diesen erfolgte eine lentivirale Transduktion von murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM). Die Expression von EGFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (40-fache Vergrößerung) untersucht.

Es zeigte sich eine Expression von EGFP, sowohl in den mit dem pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-EGFP-Virus, als auch in den mit dem pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Virus transfizierten Mikroglia. Die Transfektionseffizienz lag zwischen 60 % und 80 % (siehe Abb. 29).

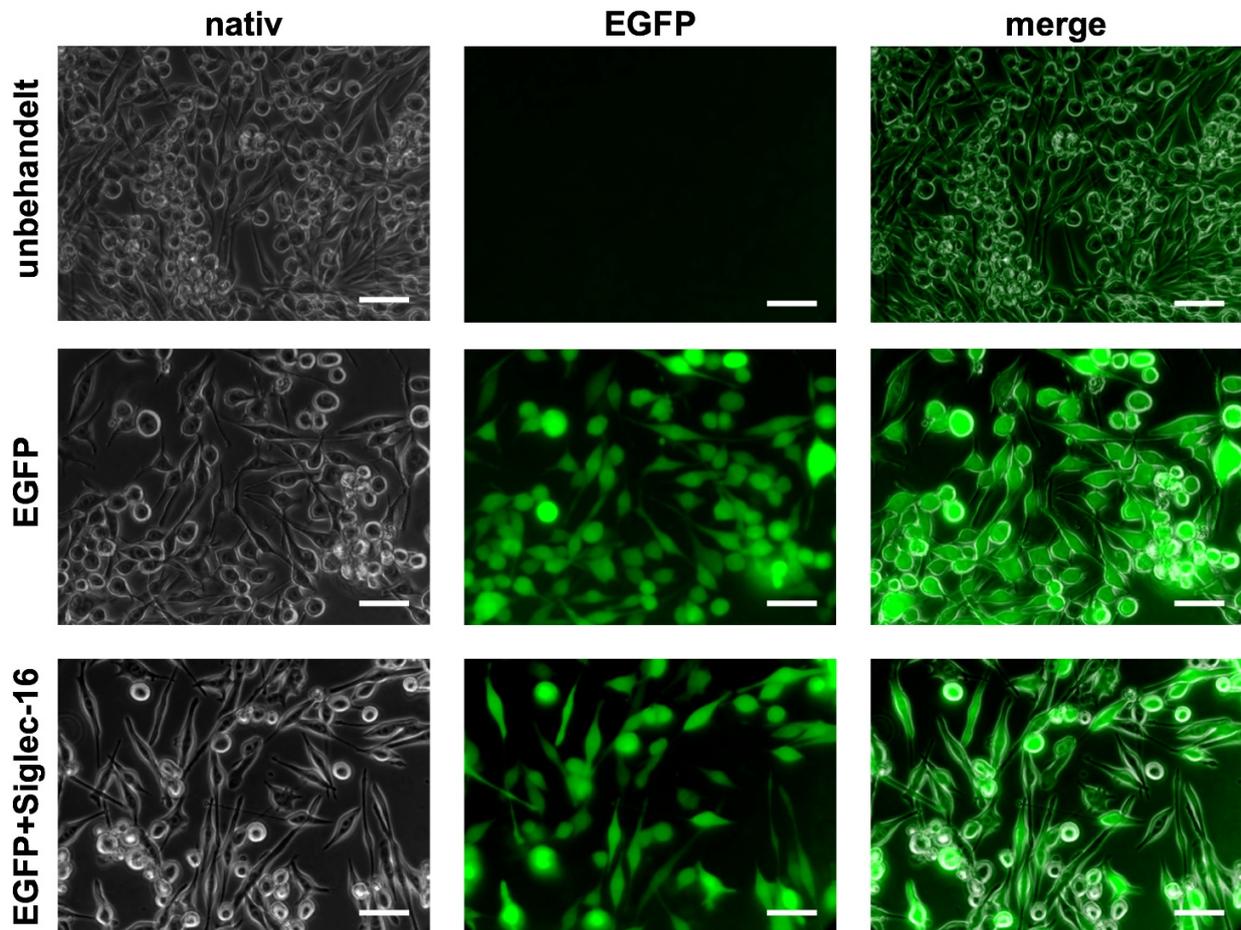


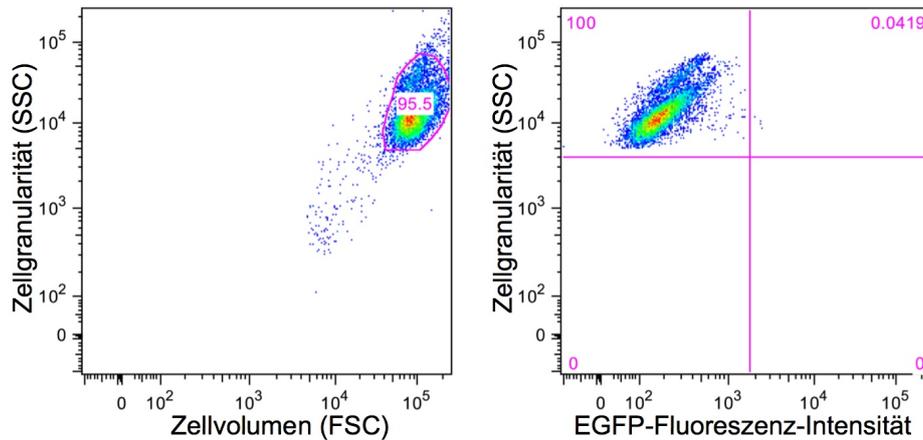
Abb. 29: Überexpression von Siglec-16 und EGFP auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM) mittels lentiviraler Transfektion mit pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-EGFP und pLenti-EF1a-IRES-EGFP. Nach Transfektion zeigt sich eine Expression von EGFP in 60-80 % der Zellen. 40-fache Vergrößerung. Maßstab 50 μ m.

3.2.4 Isolierung der EGFP-positiven Mikroglia (ESdM) mittels FACS-Sorting

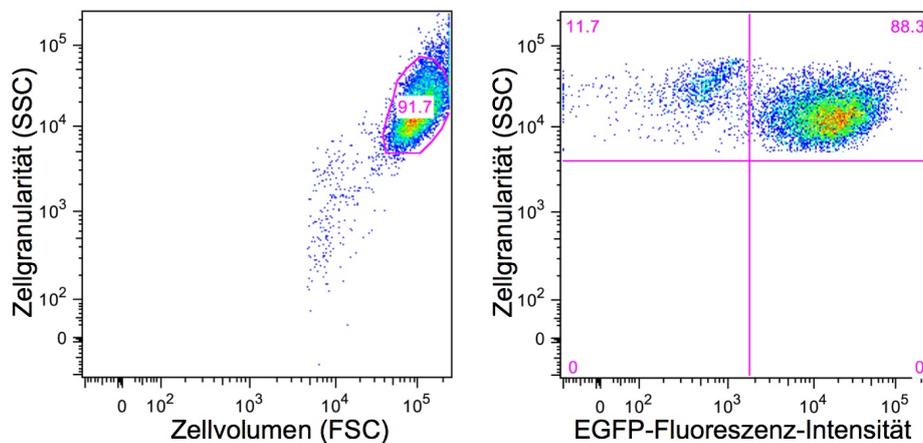
Die Markierung mit EGFP ermöglichte die Selektion der transfizierten Mikroglia mittels FACS-Sorting. Hierzu wurden die zuvor mit pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-EGFP und pLenti-EF1a-IRES-EGFP transfizierten ESdM in Zellkultur vermehrt und die EGFP-positiven Mikroglia mit Hilfe eines FACSAria in der Flow Cytometry Core Facility des Instituts für Molekulare Medizin der Universität Bonn isoliert. Das FACS-sorting wurde von Herrn Peter Wurst durchgeführt.

Die Messung ergab für das pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-GFP-Plasmid eine Transfektionseffizienz von 69 % und für die pLenti-EF1a-IRES-GFP-Plasmid von 88 %. In den nicht transfizierten Zellen war keine Expression von EGFP nachzuweisen (siehe Abb. 30).

a) Nicht transfizierte Mikroglia (ESDM)



b) pLenti-EF1a-IRES-GFP Plasmid



c) pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-GFP Plasmid

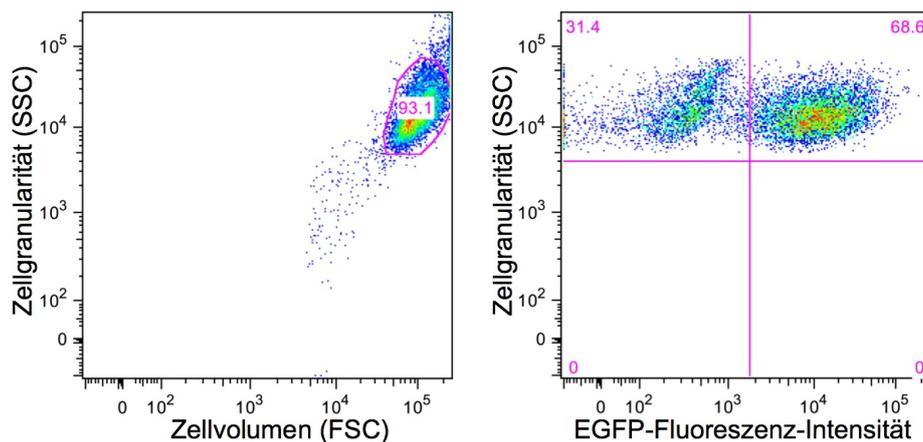


Abb. 30: Isolierung der EGFP exprimierenden murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM) mittel FACS-Sorting. a) Nicht transfizierte Mikroglia. Es ist keine Expression von EGFP festzustellen. b) Mit pLenti-EF1a-IRES-GFP transfizierte Mikroglia. Etwa 88 % der Zellen zeigen eine Expression von EGFP. c) Mit pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-GFP transfizierte Zellen. Etwa 69 % der Zellen zeigen eine Expression von EGFP.

3.2.5 Einfluss von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1

Der Einfluss eines Immunrezeptors auf die Bildung von Entzündungsmediatoren ist von großem Interesse, um seine Funktionsweise zu verstehen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α , IL-1 β und dem Aktivierungsmarker Iba1 in murinen Mikroglia (ESdM) untersucht. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit der aus ca. 20 Sialinsäuremonomeren bestehenden Polysialinsäure PSA-20 stimuliert. Dieser ist ein potentieller Ligand des Siglec-16-Rezeptors.

Hierzu wurden die zuvor selektionierten ESdM (siehe Kapitel 3.2.4) ausgesät und entweder mit PSA-20 behandelt oder ohne Stimulation inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode isoliert, mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die relative Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1 mit Hilfe der quantitativen real-time PCR untersucht.

Die Messung ergab eine signifikante Reduktion der Expression von TNF- α um 51,2 % (ohne Stimulation) ($p < 0,001$) und um 48,7 % (mit PSA-20 Stimulation) ($p < 0,001$) in den Siglec-16 exprimierenden Mikroglia im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Die mit PSA-20 stimulierten Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expression von TNF- α im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen (siehe Abb. 31 a)).

Die Expression von IL-1 β zeigte eine signifikante Reduktion um 25,4 % (ohne Stimulation) ($p < 0,01$) und um 19,5 % (mit PSA-20 Stimulation) ($p < 0,001$) in den Siglec-16 exprimierenden Mikroglia im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Die mit PSA-20 stimulierten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung in der Expression von TNF- α im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen ($p < 0,05$) (siehe Abb. 31 b)).

Die Expression von Iba1 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Siglec-16 exprimierenden Mikroglia und der EGFP-Kontrolle. Auch die Stimulation mit PSA-20 erbrachte keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 31 c)).

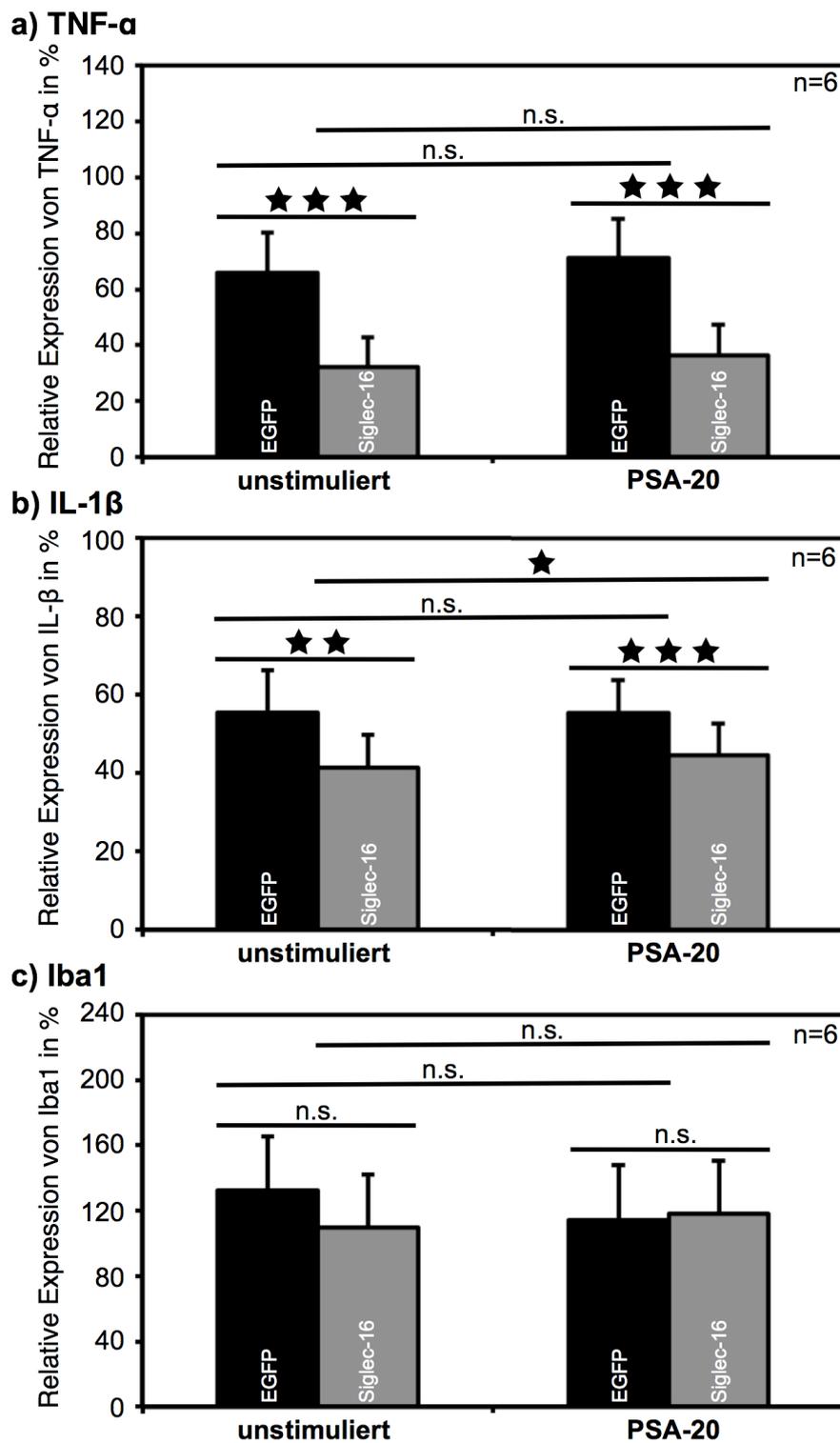
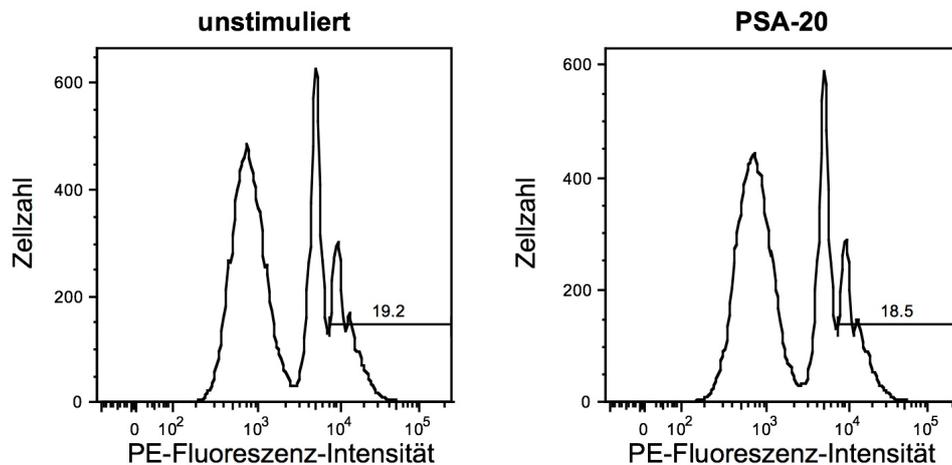


Abb. 31: Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1 in Siglec-16 exprimierenden Mikroglia (ESdM) (n=6). a) TNF- α : Signifikante Reduktion der Expression in den Siglec-16 exprimierenden Mikroglia. Die Stimulation mit PSA-20 erbrachte keinen signifikanten Unterschied. b) IL-1 β : Signifikante Reduktion in den Siglec-16 exprimierenden Mikroglia. Die Stimulation mit PSA-20 bewirkte eine signifikante Erhöhung der Expression des Zytokins. c) Iba1: Keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Iba1.

3.2.6 Einfluss von Siglec-16 auf die Phagozytoserate von Mikroglia

Der Einfluss von Siglec-16 auf die Phagozytose wurde mittels PE-markierten Latex Beads in murinen Mikroglia (ESdM) untersucht. Hierzu wurden die zuvor selektionierten ESdM (siehe Kapitel 3.2.4) ausgesät und entweder mit PSA-20 behandelt oder ohne Stimulation inkubiert. Im Anschluss wurde die Aufnahme von PE-markierten Latex Beads mittels Durchflusszytometrie untersucht. Gezählt wurde die Phagozytoserate ab dem zweiten Peak (siehe Abb. 32).

a) EGFP exprimierende Mikroglia



a) Siglec-16+EGFP exprimierende Mikroglia

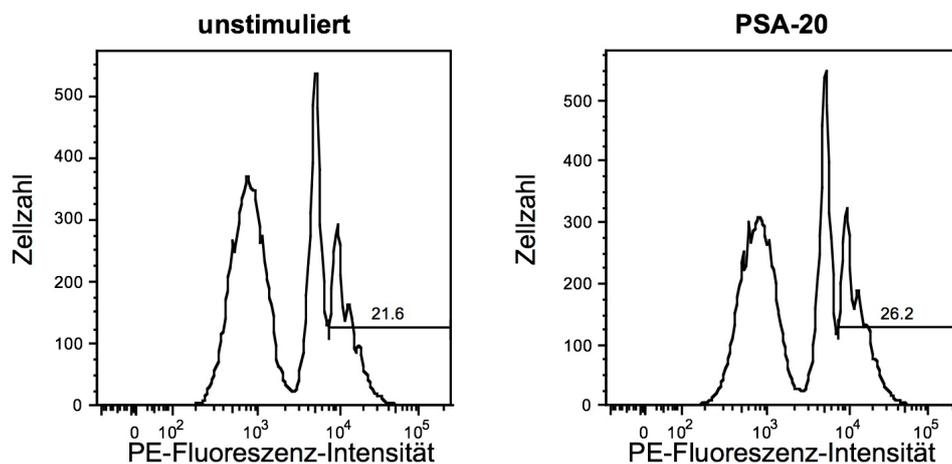


Abb. 32: Beispiele für den Latex Beads Phagozytose Assay. Nach Inkubation mit den PE-markierten Latex Beads wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Phagozytoserate wurde ab dem zweiten Peak gezählt. a) EGFP exprimierende Mikroglia ohne und mit Stimulation mit PSA-20. b) Siglec-16 und EGFP exprimierende Mikroglia ohne und mit Stimulation mit PSA-20.

Die EGFP exprimierenden Mikroglia (n=5) zeigten eine mittlere Phagozytoserate von $19,23 \pm 0,88$ % bei den nicht stimulierten Zellen und $19,62 \pm 1,32$ % bei den mit PSA-20 stimulierten Zellen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Phagozytoserate zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die Gruppe der Siglec-16 exprimierenden ESdM (n=5) zeigte eine Phagozytoserate von $21,42 \pm 1,92$ % bei den nicht stimulierten Zellen und $25,14 \pm 2,25$ % bei den mit PSA-20 stimulierten Zellen. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Phagozytose der Siglec-16 exprimierenden Zellen im Vergleich zur EGFP-Kontrollgruppe um 9,1 % ($p < 0,05$). Die Stimulation mit PSA-20 erbrachte eine signifikante Erhöhung der Phagozytose der Siglec-16 exprimierenden Mikroglia um 28,1 % im Vergleich zu den EGFP exprimierenden Mikroglia ($p < 0,001$) und eine signifikante Erhöhung um 17,4 % im Vergleich zu den nicht stimulierten Siglec-16 exprimierenden ESdM ($p < 0,01$) (siehe Abb. 33).

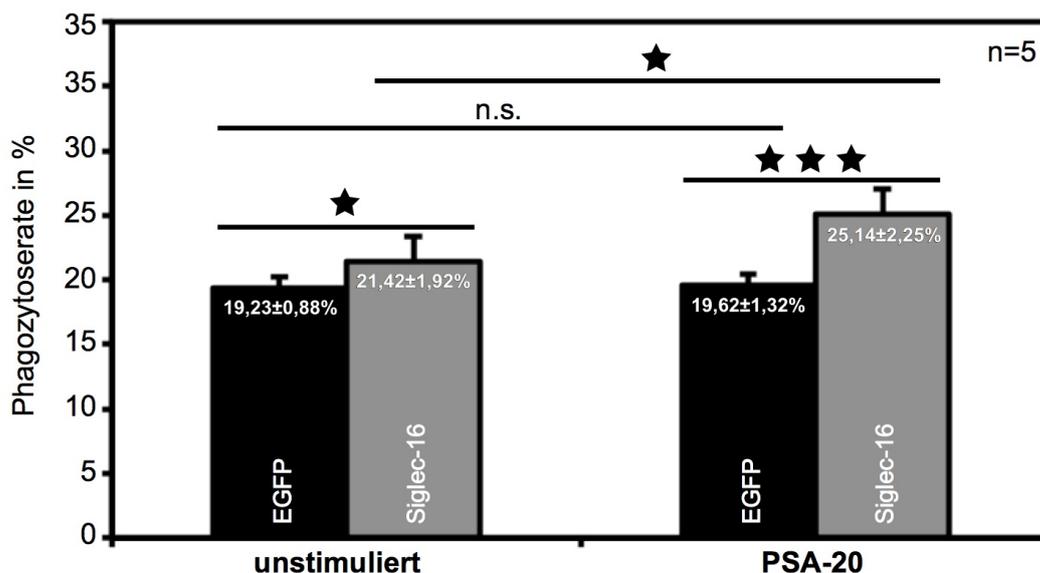


Abb. 33: Phagozytoseraten von mit PE markierten Latex Beads in Siglec-16 exprimierenden Mikroglia (ESdM) (n=5). Die Siglec-16 exprimierenden Mikroglia zeigen eine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate im Vergleich zur EGFP-Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die Stimulation mit PSA-20 zeigt eine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate der Siglec-16 exprimierenden Mikroglia im Vergleich zu den EGFP exprimierenden Mikroglia ($p < 0,001$) und eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den nicht stimulierten Siglec-16 exprimierenden ESdM ($p < 0,05$).

3.3 Generierung eines Siglec-16 transgenen Mausmodells

Um den Einfluss von Siglec-16 auf die Immunreaktion von Mikroglia auch im lebenden Organismus untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Siglec-16 transgenes Mausmodell erzeugt. Hierzu wurde ein Genkonstrukt mit dem mikroglia-spezifischen Iba1-Promotor und dem Exonbereich des Siglec-16-Gens mittels pronukleärer Injektion in das murine Genom eingebracht. Die Integration und die Anzahl der integrierten Transgene wurden mittels PCR, quantitativer real-time PCR und Southern Blot bestimmt. Die selektive Genexpression von Siglec-16 auf Mikroglia wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase PCR und der Mehrfarbendurchflusszytometrie untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss des Rezeptors auf die Zytokinproduktion analysiert.

3.3.1 Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid

Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid wurde aus dem PLL-PGK-Neo-Iba1-Siglec-11-Plasmid (Wang, 2009) durch die Entfernung der PGK-NEO-Kassette und durch den Ersatz des Siglec-11-Gens durch das Siglec-16-Gen erzeugt. Das Siglec-16-Gen steht unter der Kontrolle des Iba-1-Promoters, welcher eine selektive Expression von Siglec-16 auf Mikroglia ermöglicht (Hirasawa et al., 2005). Das WPRE-Element (Woodchuck Hepatitis Virus Post-Transcriptional Regulatory Element) erhöht die Stabilität der mRNA und verstärkt so die Genexpression (Loeb et al., 1999). Eine Ampicillin-Resistenz ermöglicht die Transformation und Vervielfältigung in Bakterienzellen (siehe Abb. 34).

3.3.2 Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen

Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen wurde aus dem Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid isoliert. Hierzu wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen NsiI, NdeI und BsiEI verdaut und mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das 4.045 Basenpaare große Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit und anschließend mit dem NucleoSpin Plasmid Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit einer Konzentration von 3-5 ng/µl in Injektionspuffer gelöst.

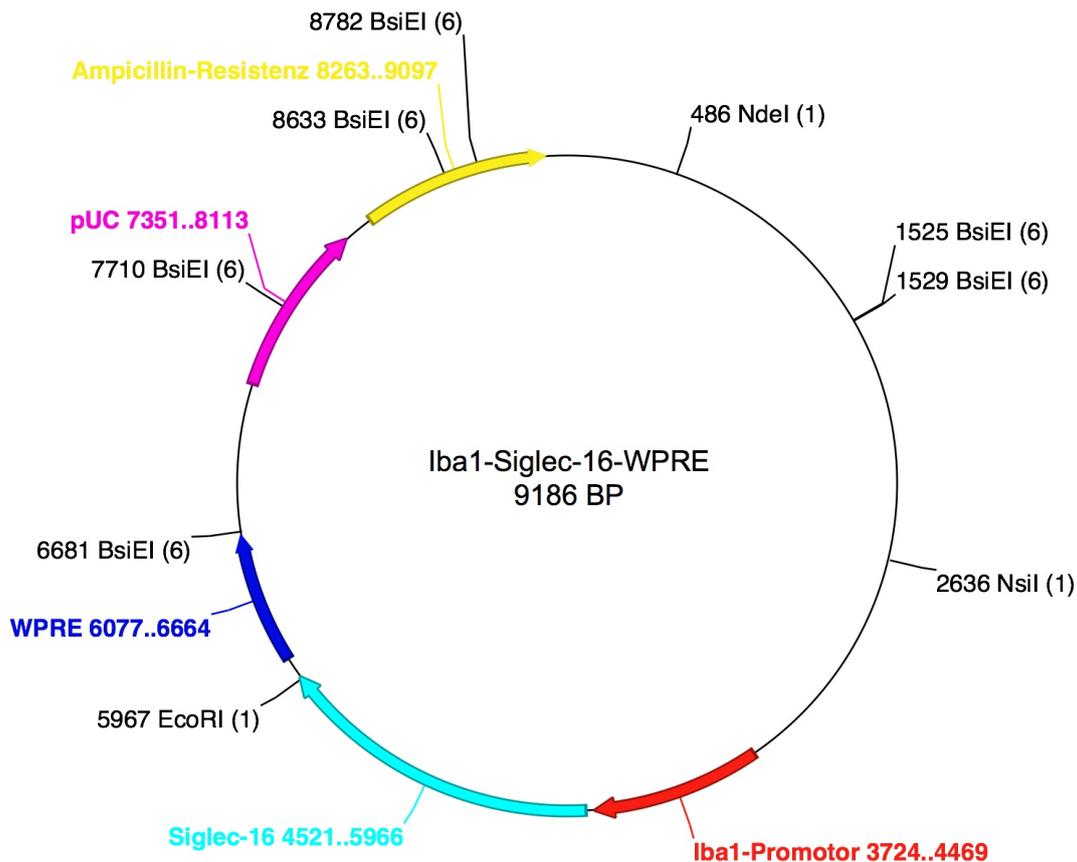


Abb. 34: Das Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid. Das Siglec-16-Gen steht unter der Kontrolle des Iba-1-Promoters. Dieser ermöglicht eine selektive Expression von Siglec-16 auf Mikroglia. Das WPRE-Element erhöht die Stabilität der mRNA und verstärkt so die Genexpression. Eine Ampicillin-Resistenz ermöglicht die Transformation und Vervielfältigung in Bakterienzellen.

3.3.3 Generierung der Iba1-Siglec-16-WPRE transgenen Maus und Genotypisierung der ersten Generation

Das isolierte und aufgereinigte Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen wurde mittels Mikroinjektion in den Pronucleus von Mausembryonen eingebracht. Im Weiteren erfolgte eine Entwicklung der Embryonen *in vitro* und ein anschließender transzervikaler Transfer in pseudoträchtige, zyklussynchronisierte Empfängertiere.

Die Mausembryonen entstammten aus einer Verpaarung von B6D2F1 Weibchen mit C57Bl/6 Männchen. Da die Mauslinie B6D2F1 aus einer Kreuzung der Linien C57Bl/6 mit DBA entstanden ist, betrug der Anteil des C57Bl/6 Genoms bereits 75 % des Genoms der ersten Generation F0. Die Mikroinjektion und der Embryonentransfer wurden von Frau Charlotte Schick im Haus für Experimentelle Therapie Bonn durchgeführt.

Nach Mikroinjektion und Embryonentransfer wurden 103 Mäuse der ersten Generation geboren. Um die Integration des Transgens in das murine Genom zu überprüfen wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen oder Ohrmuscheln isoliert und mittels PCR genotypisiert. Das Produkt wurde auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und mit der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das Gelbild wurde unter UV-Beleuchtung fotografiert (siehe Abb. 35).

Positive Proben zeigten zwei Banden mit einer Größe von 111 und 251 Basenpaaren. Bei 23 von 103 Mäusen konnte eine Integration des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens in das murine Genom festgestellt werden. Maus 6, 21, 35 und 75 wurden ausgewählt und weiterverpaart. Die Mäuse 6, 35 und 75 konnten Nachkommen zeugen. Die einzelnen Linien wurden nach dem jeweiligen Ursprungstier benannt.

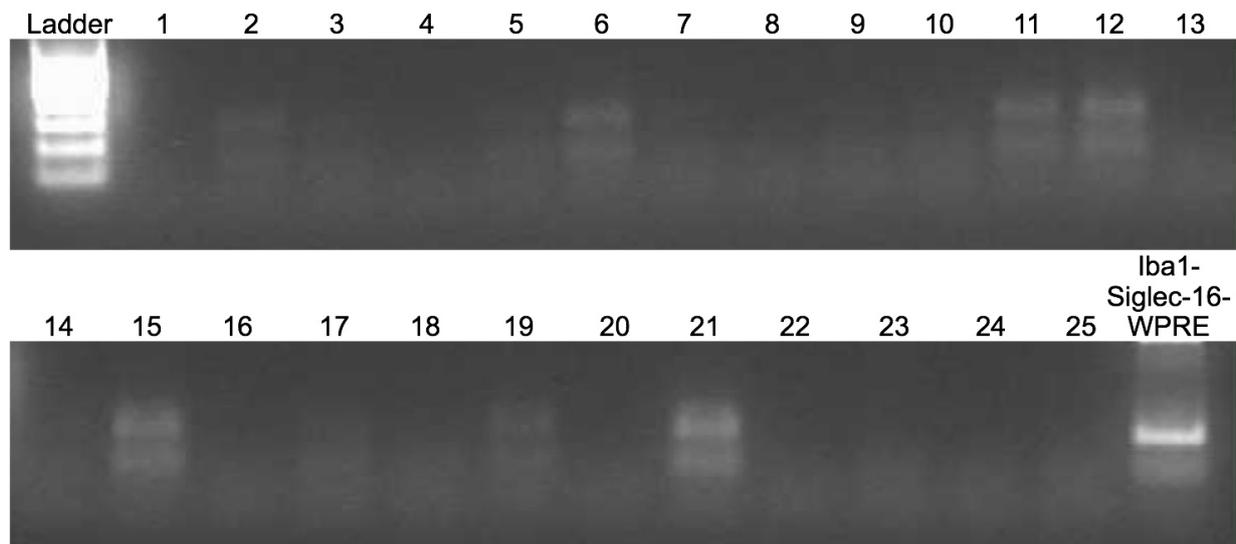
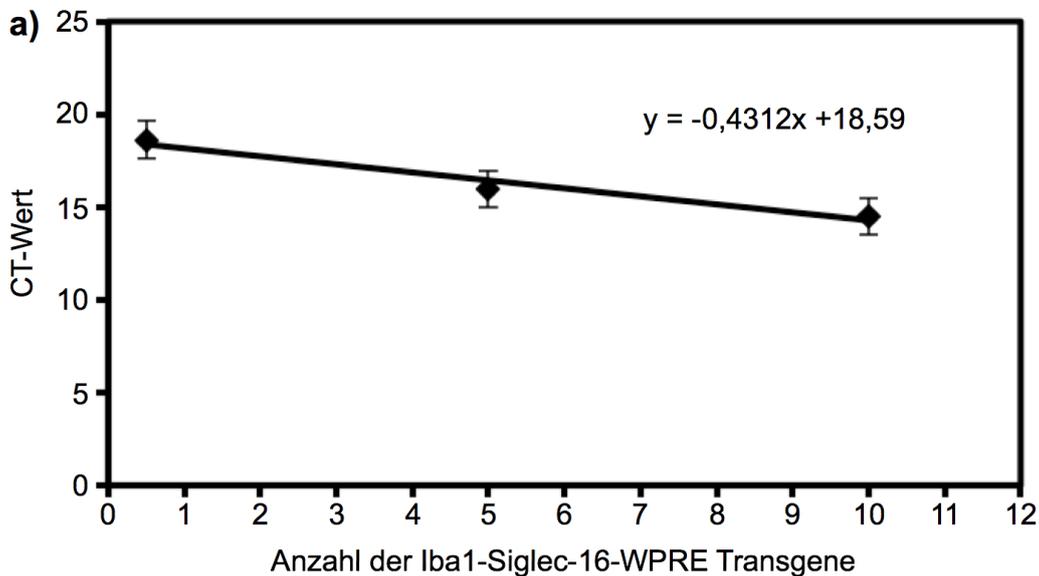


Abb. 35: Genotypisierung der Mäuse 1-25 der ersten Generation F0 nach Mikroinjektion und Embryonentransfer. Positive Proben zeigen zwei Banden mit einer Größe von 111 und 251 Basenpaaren (siehe Maus 2, 6, 11, 12, 15, 19, 21). Als positive Kontrolle diente das Iba1-Siglec-16-WPRE Plasmid.

3.3.4 Bestimmung der Anzahl der in das Genom der Maus integrierten Siglec-16-Transgene

Um die Anzahl der in das Genom integrierten Siglec-16-Transgene zu bestimmen, wurde eine quantitative real-time PCR von genomischer DNA der Mauslinien 6, 25 und 75 durchgeführt. Als Standard wurden äquivalente Mengen des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens für 0,5, 5 und 10 Genkopien verwendet (zur Berechnung siehe Abb. 36). Die CT-Werte (cycle treshhold) des Standards wurden graphisch aufgetragen und die Funktion der Ausgleichsgeraden bestimmt (siehe Abb. 36). Hiermit konnte die Formel zur Berechnung der Anzahl der in das Genom integrierten Siglec-16-Transgene bestimmt werden (x [Anzahl der Genkopien] = $(y$ [CT-Wert] - 18,59) / (- 0,4323)).



b)

$$\frac{\text{Masse der transgenen DNA}}{1 \mu\text{g der genomischen DNA}} = \frac{4045 \text{ BP des Transgens}}{3 \times 10^9 \text{ BP der genomischen DNA}}$$

Abb. 36: Bestimmung der Anzahl der in das Genom der transgenen Mäuse integrierten Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgene mittels quantitativer real-time PCR. a) Standard für die Anzahl der Iba1-Siglec-16-WPRE Genkopien. Es wurde die Anzahl der Transgene (0,5, 5, 10) gegen deren CT-Werte aufgetragen. Mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden wurde die Formel zur Berechnung der integrierten Transgene anhand des CT-Werts bestimmt. b) Formel zur Berechnung des Standards der äquivalenten Mengen des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens für eine entsprechende Anzahl an Genkopien (Partners Healthcare, 2014).

Mit Hilfe der ermittelten CT-Werte wurde die Anzahl der integrierten Transgene berechnet. Es ergaben sich für Mauslinie 6 $6,20 \pm 1,30$ Genkopien, für Mauslinie 35 $8,34 \pm 2,23$ Genkopien und für Mauslinie 75 $3,84 \pm 1,42$ Genkopien (siehe Abb. 37).

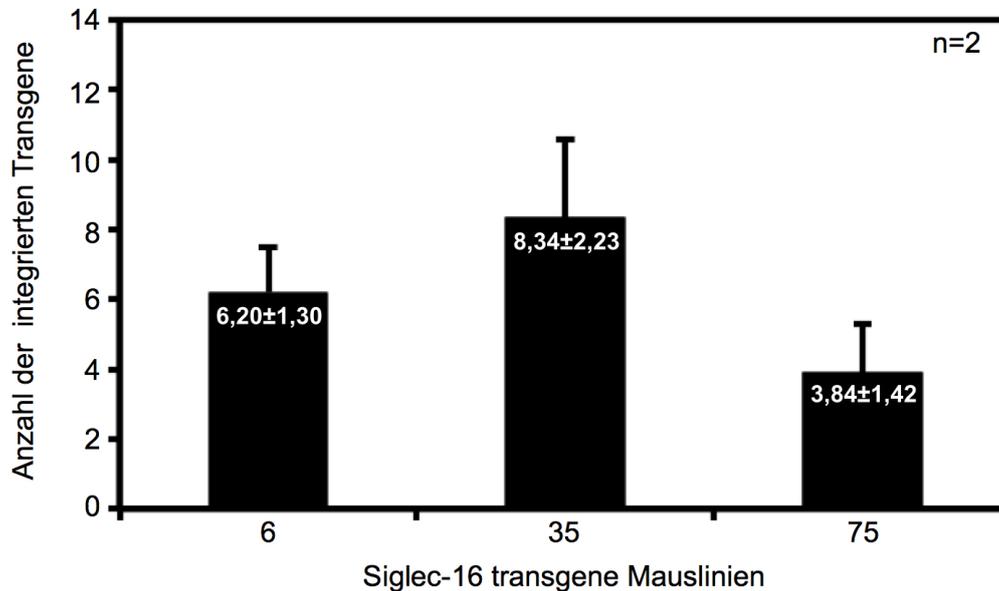


Abb. 37: Anzahl der in das Genom integrierten Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgene (n=2). Bestimmung mittels quantitativer real-time PCR.

3.3.5 Nachweis einer Integration des Siglec-16-Transgens in das Genom der Maus mit Hilfe des Southern Blots

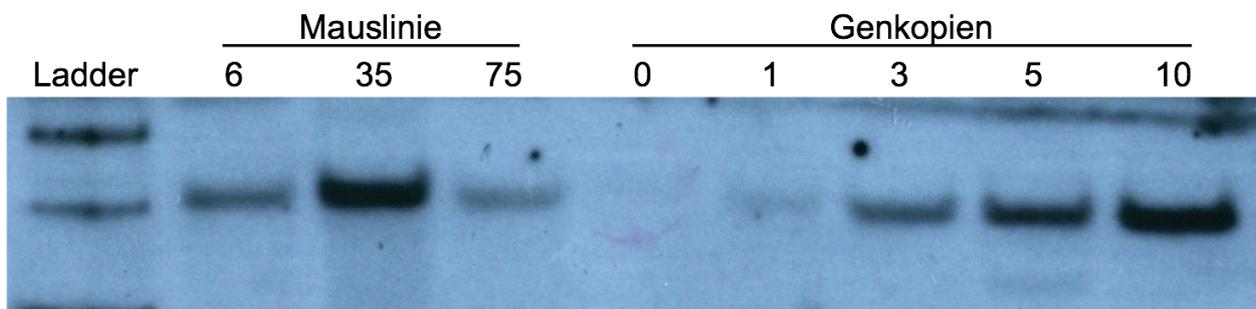
Die Integration des Siglec-16-Transgens in das Genom der Maus fand in dieser Arbeit frei und ungezielt statt. Hierbei integrieren in der Regel ein oder mehrere Transgene hintereinander in den gleichen Genomabschnitt (siehe Abb. 38 b)). Mit Hilfe des Southern Blots ist ein Nachweis der Integration der Transgene möglich. Zusätzlich kann die Anzahl der in das Genom integrierten Transgene bestimmt werden.

Hierfür wurde aus Schwanzspitzen und Lebergewebe isolierte genomische DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und mittels Kapillarkraft vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Die transgenen DNA-Fragmente wurden mit spezifischen mit Biotin gelabelten DNA-Sonden markiert und die Bindung mit HRP-gekoppelten anti-Biotin-Antikörpern sichtbar gemacht. Als Standard wurde das Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgen in entsprechenden

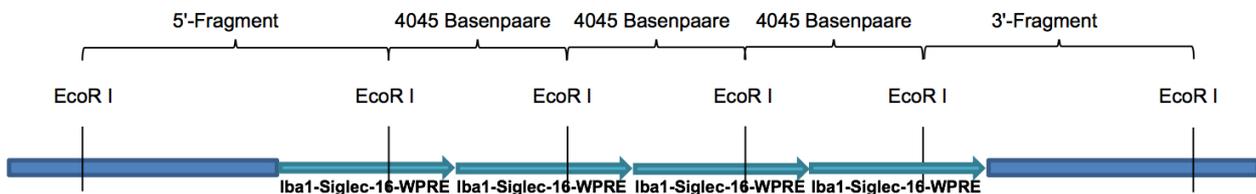
Konzentrationen für 1, 3, 5 und 10 Genkopien zusammen mit genomischer DNA einer Siglec-16 negativen Maus verwendet (Berechnung des Standards siehe Abb. 38 c)).

In allen drei Mauslinien gelang der Nachweis einer Integration des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens in das murine Genom. Die Anzahl der in das Genom integrierten Siglec-16-Transgene wurde durch den Vergleich der Intensitäten mit dem Standard ermittelt. Es ergaben sich 5-6 Genkopien für Mauslinie 6, 9-10 Genkopien für Mauslinie 35 und 3-4 Genkopien für Mauslinie 75 (siehe Abb. 38 a)).

a) Southern Blot



b) Schema der Integration des Transgens



c) Berechnung der Masse der transgenen Standard-DNA

$$\frac{\text{Masse der transgenen DNA}}{10 \mu\text{g der genomischen DNA}} = \frac{4045 \text{ BP des Transgens}}{3 \times 10^9 \text{ BP der genomischen DNA}}$$

Abb. 38: a) Southern Blot zur Bestimmung der Anzahl der in das Genom der transgenen Mäuse integrierten Iba1-Siglec-16-WPRE Transgene. Dargestellt sind die Mauslinien 6, 35 und 75 sowie ein Standard der entsprechenden Genkopien. Beim Vergleich mit dem Standard ergeben sich folgende Werte für die in das Genom integrierten Transgene: Linie 6: 5-6; Linie 35: 9-10; Linie 75: 3-4. b) Schematische Darstellung der Integration der in das Genom integrierten Transgene. Es sind die Restriktionsschnittstellen des Restriktionsenzym *EcoR I* eingezeichnet. Bei einem Verdau entstehen so n-1 des 4.045 Basenpaare großen Fragments sowie zwei Fragmente unterschiedlicher Größe des 5'- und 3'-Teils der genomischen DNA. c) Formel zur Berechnung des Standards der äquivalenten Mengen des Iba1-Siglec-16-WPRE-Transgens für eine entsprechende Anzahl an Genkopien (Partners Healthcare, 2014).

3.3.6 Untersuchung der Expression von Siglec-16 in den verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie 75

Zum Nachweis einer Expression von Siglec-16 in den verschiedenen Geweben der Mauslinie 75 wurde die RNA aus Gehirn, Leber, Milz und Blut extrahiert und mit der reversen Transkriptase PCR in cDNA umgeschrieben. Die Untersuchung der Expression von Siglec-16 erfolgte mittels PCR (Primer: Siglec-16-RT-PCR-Forward-2, Siglec-16-RT-PCR-Reverse-2).

Es zeigte sich eine deutliche Expression von Siglec-16 im Hirngewebe der Siglec-16-transgenen Maus. Es zeigte sich keine Expression in Lebergewebe und Blut und eine schwache Expression im Milzgewebe (siehe Abb. 39).

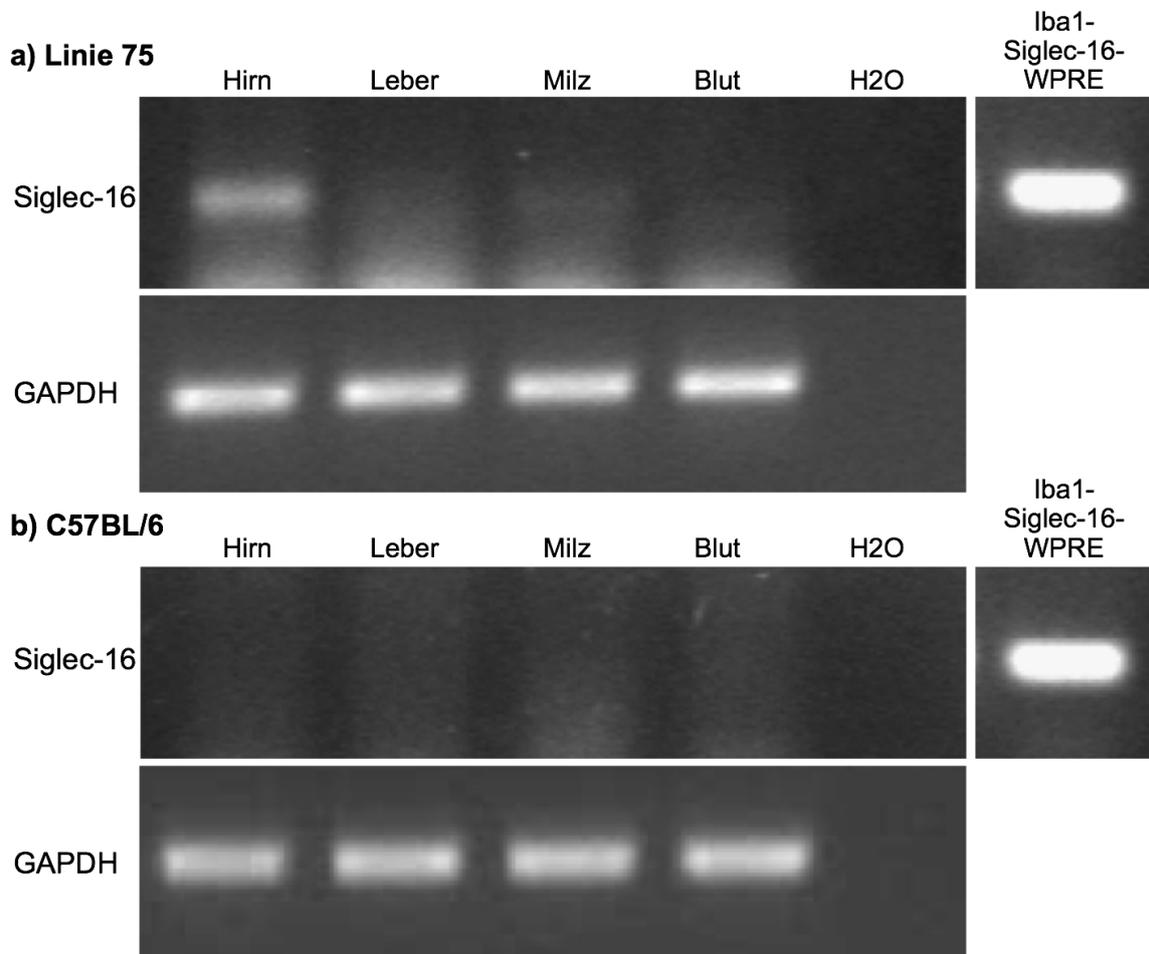


Abb. 39: a) Expression von Siglec-16 in den verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie 75. Es zeigt sich eine Expression von Siglec-16 im Gehirn der Siglec-16-transgenen Maus. Als Kontrolle diente eine C57BL/6 Maus (siehe b)), das Houskeeping Gen GAPDH und das Iba1-Siglec-16-WPRE-Plasmid.

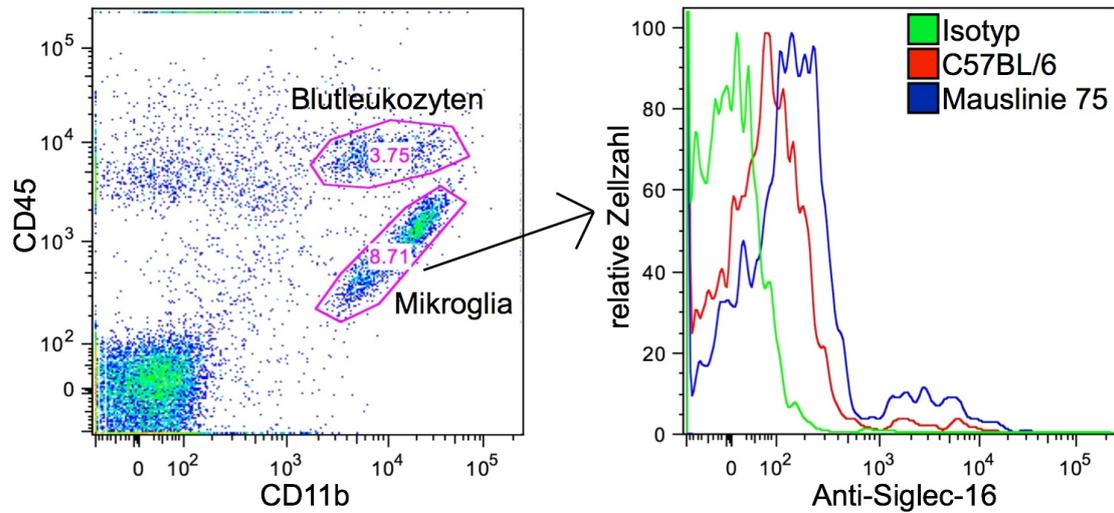
3.3.7 Nachweis einer Expression von Siglec-16 auf isolierten Mikroglia der transgenen Mauslinie 75

Mit Hilfe eines diskontinuierlichen Percoll-Gradienten ist es möglich Mikrogliazellen und Leukozyten aus murinem Hirngewebe zu isolieren (Cardona et al., 2006). Die Markierung mit den für Mikrogliazellen spezifischen Antikörpern Anti-CD45 und Anti-CD11b macht eine Analyse mit Hilfe der Mehrfarbendurchflusszytometrie möglich.

In dieser Arbeit wurden die Mäuse mit Avertin intraperitoneal betäubt und transkardial mit HBSS perfundiert. Den Mäusen wurden die Gehirne entnommen und die Mikrogliazellen und Leukozyten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Percoll-Gradienten isoliert. Die Zellen wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern gegen CD45, CD11b, Siglec-11 und Siglec-16 markiert. Der Antikörper gegen Siglec-11 bindet wegen der Homologie der extrazellulären Domäne sowohl an Siglec-11 als auch an Siglec-16. Die markierten Zellen wurden mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie analysiert. Es erfolgte eine Auswahl der CD11b positiven und der CD45 niedrig positiven Zellen, welche die Mikroglia population darstellten. Innerhalb dieser Subpopulation wurde eine Analyse der Siglec-16 Expression durchgeführt. Hierbei wurden zwei Siglec-16 transgene Mäuse der Mauslinie 75 mit einer negativen Maus des gleichen Wurfes verglichen (siehe Abb. 40).

Es zeigte sich eine verstärkte Expression von Siglec-16 in der transgenen Maus, sowohl nach Färbung mit dem Antikörper gegen Siglec-16, als auch mit dem Antikörper gegen Siglec-11. Anzumerken ist der nur geringe Unterschied der Fluoreszenzsignale der Mauslinie 75 im Vergleich zur negativen Maus. Eine Erklärung könnte eine unspezifische Bindung der Antikörper in der Maus sein. Diese unspezifische Bindung wird beim Vergleich mit der Isotypenkontrolle sichtbar (siehe Abb. 40).

a) Anti-Siglec-16



b) Anti-Siglec-11/16

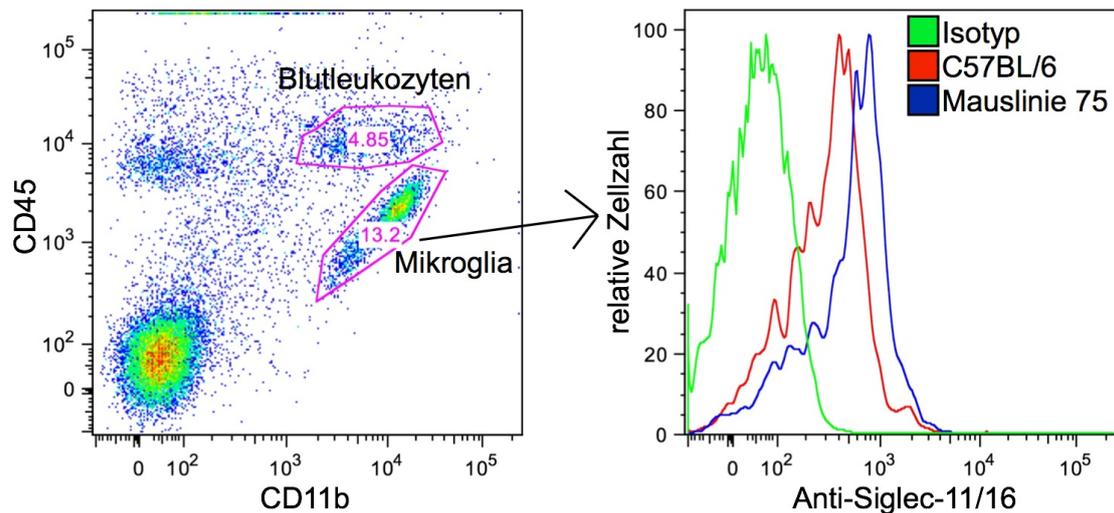


Abb. 40: Mehrfarbendurchflusszytometrie von mittels Percoll Gradienten aus Mausgehirnen isolierter Mikroglia. a) Färbung mit Antikörpern gegen CD45, CD11b und Siglec-16. Die Mikroglia population (CD45⁺(low)/CD11b⁺) ist von der Blutleukozyten population (CD45⁺(high)/CD11b⁺) abzugrenzen. Die Färbung mit dem anti-Siglec-16-Antikörper zeigt bei Mauslinie 75 (blau) eine stärkere Fluoreszenzintensität als bei der nicht transgenen Kontrolle (rot). Die Isotypenkontrolle ist in grün dargestellt. b) Färbung mit Antikörpern gegen CD45, CD11b und Siglec-11/16. Die Mikroglia population (CD45⁺(low)/CD11b⁺) ist von der Blutleukozyten population (CD45⁺(high)/CD11b⁺) abzugrenzen. Die Färbung mit dem anti-Siglec-11/16-Antikörper zeigt bei Mauslinie 75 (blau) eine stärkere PE-Fluoreszenzintensität als bei der nicht transgenen Kontrolle (rot). Die Isotypenkontrolle ist in grün dargestellt.

3.3.8 Untersuchung des Einflusses von Siglec-16 auf die Expression von TNF- α und IL-1 β im Siglec-16 transgenen Mausmodell

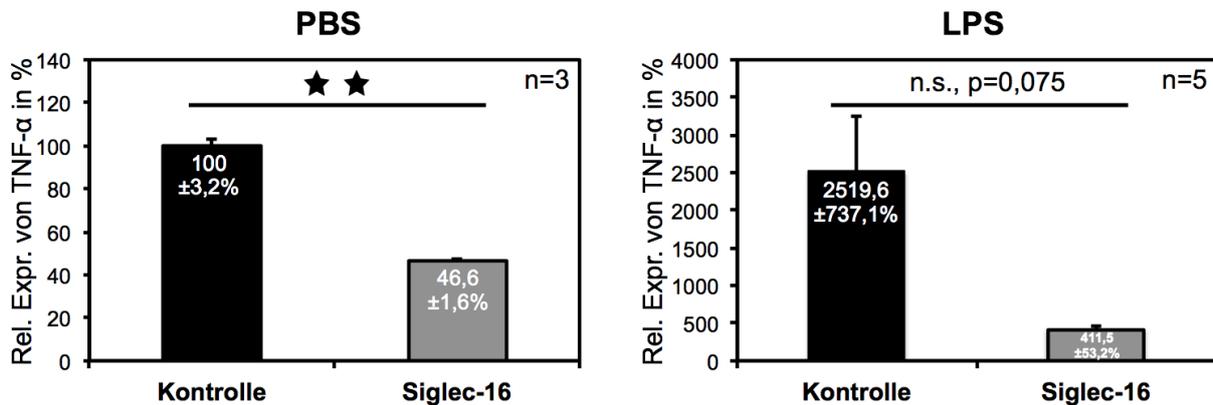
Um den Einfluss von Siglec-16 auf die inflammatorischen Prozesse im Mausmodell zu untersuchen, wurden transgene und nicht transgene Mäuse der Mauslinie 75 intraperitoneal entweder mit PBS oder mit LPS behandelt und im Anschluss mit Hilfe der quantitativen real-time PCR die relative Genexpression von TNF- α und IL1- β im Gehirn untersucht.

Die Messung ergab für eine PBS-Injektion eine signifikante Reduktion der Expression von TNF- α um 53,3 % in der Siglec-16 transgenen Maus im Vergleich zur Kontrollmaus ($p < 0,01$; $n=3$). Nach intraperitonealer LPS-Injektion zeigte die Siglec-16 transgene Maus eine um 83,7 % niedrigere Expression von TNF- α im Vergleich zur Kontrollmaus ($n=5$). Diese Reduktion war statistisch allerdings nicht signifikant ($p=0,075$) (siehe Abb. 41 a)).

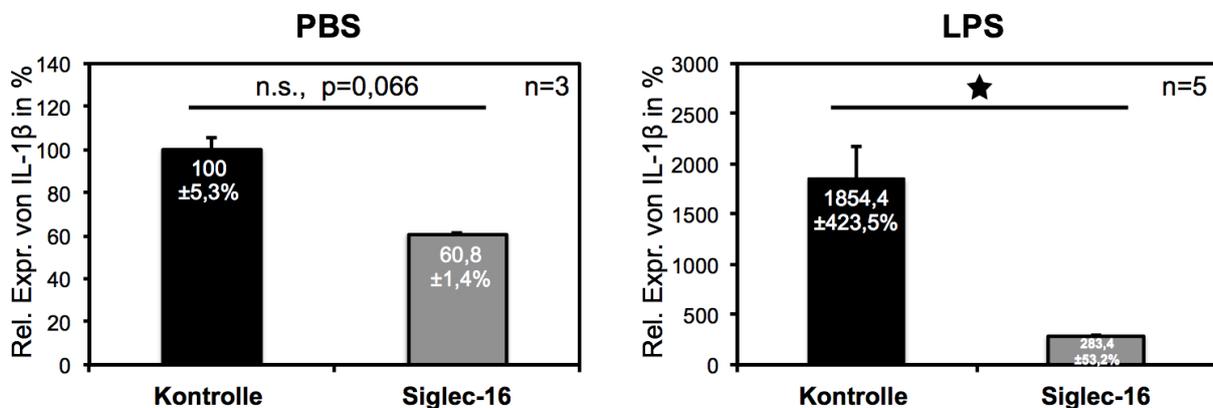
Für die Expression von IL1- β zeigte sich nach PBS-Injektion eine statistisch nicht signifikante Reduktion ($p=0,066$) von 39,2 % in der transgenen Maus im Vergleich zur Kontrollmaus ($n=3$). Nach intraperitonealer LPS-Injektion zeigte die Siglec-16 transgene Maus eine um 84,7 % niedrigere Expression von IL1- β im Vergleich zur Kontrollmaus ($n=5$). Der Unterschied war hierbei signifikant ($p < 0,05$) (siehe Abb. 41 b)).

Im Siglec-16 transgenen Mausmodell zeigte sich eine stärkere relative Reduktion der Genexpression von TNF- α und IL-1 β nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu der PBS-Kontrolle. Für TNF- α betrug hierbei die relative Reduktion der Expression 25,1 % ($p=0,062$) und für IL1- β 45,5 % ($p < 0,05$) (siehe Abb. 41 c)).

a) Relative Expression von TNF- α



b) Relative Expression von IL-1 β



c) Relative Reduktion der Expression von TNF- α und IL-1 β nach LPS-Injektion

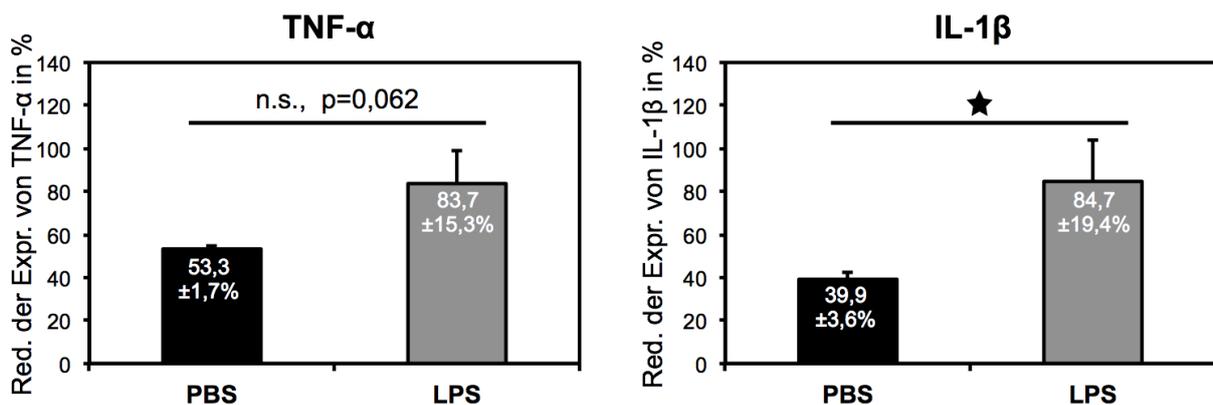


Abb. 41: Expression von TNF- α und IL-1 β im transgenen Mausmodell. Untersuchung mittels Quantitativer Real-Time PCR. a) Expression von TNF- α nach intraperitonealer Injektion von PBS oder LPS. b) Expression von IL-1 β nach intraperitonealer Injektion von PBS oder LPS. c) Relative Reduktion der Expression von TNF- α und IL-1 β nach LPS Injektion im Vergleich zur PBS-Kontrolle im Siglec-16 transgenen Mausmodell.

4. Diskussion

4.1 Bestimmung von Genotyp und Allelfrequenz des Siglec-16-Gens

In ersten genomweiten Analysen wurde das Siglec-16-Gen aufgrund einer 4 Basenpaare großen Deletion, durch die eine Verschiebung des Leserasters entsteht, als nicht funktionelles Pseudogen Siglec-P16 klassifiziert (Grimwood et al., 2004; Hayakawa et al., 2005). Jedoch konnten Cao et al. zeigen, dass neben Siglec-P16 auch ein funktionelles Siglec-16-Gen in einer Subpopulation der menschlichen Bevölkerung vorliegt. Die von Cao et al. beschriebene auf PCR-basierende Methode zur Bestimmung des Genotyps ließ aber keine genaue Differenzierung der verschiedenen Genotypen zu. Die Bestimmung einer Siglec-16/Siglec-P16-Heterozygotie war ebenso wie der direkte Nachweis des funktionellen Siglec-16-Gens nicht möglich (Cao et al., 2008).

Um genaue Aussagen zu Allelfrequenz und Genotyp des Siglec-16-Gens treffen zu können, war deshalb die Entwicklung eines neuen Verfahrens notwendig. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die die PCR-Amplifizierung von genomischer DNA mit einer anschließenden Sequenzierung kombiniert (siehe Kapitel 2.2.7). Hierdurch sind eine genaue Bestimmung des Genotyps und eine Differenzierung zwischen Siglec-16 und Siglec-P16 möglich. Darüber hinaus erlaubt die Kombination von PCR und Sequenzierung im Gegensatz zur alleinigen PCR noch weitere Einblicke in den untersuchten Genomabschnitt. Ein Problem dieser Methode ist die Überlagerung der DNA-Sequenzen, zu der es bei einer Siglec-16/Siglec-P16-Heterozygotie wegen der Verschiebung um 4 Basenpaare im Siglec-P16-Gen kommt. Mit einer genauen Kenntnis des Genomabschnitts ist aber eine exakte Bestimmung des Genotyps möglich.

Das funktionelle Siglec-16-Gen zeigte in der aktuellsten und umfangreichsten Untersuchung von Wang et al. eine Allelfrequenz zwischen 0,08 und 0,3 (Mittelwert 0,18). Hiernach besitzen ca. 30-50 % der menschlichen Population das Potential den Rezeptor Siglec-16 zu bilden. In dieser Studie wurden Daten aus PCR-Analysen und Einzelnukleotid-Polymorphismus-Analysen (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) zusammengefasst (Wang et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 27 Proben untersucht (siehe Kapitel 3.1.1). Es zeigte sich eine Allelfrequenz von 0,32 des funktionellen Siglec-16-Gens. In 51,9 % der Proben war somit eine Expression von Siglec-16

möglich. Die Allelfrequenz war in dieser Population damit größer als in der von Wang et al. untersuchten. Es ist jedoch anzumerken, dass die Stichprobe von Wang et al. mit 1.400 Probanden deutlich größer war. Zudem wurden weltweit Daten zusammengetragen, sodass populationsbezogene Verteilungsunterschiede mit in das Ergebnis eingeflossen sein könnten. Ein weiterer Unterschied liegt in der Verwendung von Proben von Gliom-Patienten in der vorliegenden Arbeit (5 Proben von Nicht-Gliom-Gewebe; 22 Proben von Gliom-Gewebe). Aufgrund der Auswahl dieses Kollektivs ist eine Aussage über die Allelfrequenz in der Gesamtpopulation schwierig.

Inwiefern das funktionelle Siglec-16-Gen mit der Pathogenese von Gliomen assoziiert ist, konnte in dieser Arbeit aufgrund der geringen Stichprobe nicht geklärt werden. In früheren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die vermehrte Expression von Polysialinsäuren mit der Tumorprogression und -ausbreitung, unter anderem auch bei Gliomen, assoziiert ist (Hildebrandt et al., 1998; Scheidegger et al., 1994; Smith et al., 1996; Suzuki et al., 2005; Tanaka et al., 2000). Im Anbetracht dieser Erkenntnisse scheint eine Beteiligung von Siglec-16 an der Pathogenese von Gliomen möglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2 Nachweis von Siglec-16 in humanem Gewebe

4.2.1 Nachweis von Siglec-16 in humanem Hirngewebe

Cao et al. haben eine Expression einer cDNA von Siglec-16 in fetalem Hirngewebe beschrieben. Dies ließ vermuten, dass Siglec-16 ebenso wie Siglec-11 auf humanen Mikroglia gebildet wird und diese beiden Rezeptoren ein aktivierendes/inhibierendes Rezeptorpaar bilden (Cao et al., 2008). Um diese These zu untersuchen, war es deshalb notwendig den Nachweis einer Expression von Siglec-16 auch in adultem humanen Hirngewebe zu erbringen.

In dieser Arbeit wurde dazu die Genexpression von Siglec-16 mittels reverser Transkriptase PCR in 3 Hirnproben von Gliom-Patienten untersucht (siehe Kapitel 3.1.2). Hierbei war jeweils eine Probe eines homozygoten Siglec-16/Siglec-16-Genotyps, eines homozygoten Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyps und eines heterozygoten Siglec-16/Siglec-P16-Genotyps vorhanden. In den beiden Proben mit dem funktionellen Siglec-16-Gen

(Siglec-16/Siglec-16-Genotyp und Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp) konnte eine eindeutige Expression von Siglec-16 nachgewiesen werden. Die Expression war in der homozygoten Probe (Siglec-16/Siglec-16-Genotyp) stärker ausgeprägt als in der heterozygoten Probe (Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp) (siehe Abb. 24). Es wurde keine Quantifizierung vorgenommen, um dies weiter zu untersuchen.

Interessanterweise konnte auch in der Probe mit Siglec-P16/Siglec-P16-Genotyp eine leichte Expression von Siglec-P16 gezeigt werden (siehe Abb. 24). Dies lässt vermuten, dass auch die mRNA des nicht funktionellen Siglec-P16-Pseudogens in geringem Maße gebildet wird. Folglich stellt sich die Frage, ob diese Expression lediglich als eine Restexpression in einem aktiven Bereich des Genoms zu deuten ist, da die Siglec-11- und Siglec-16-Expression überdies durch eng verwandte GATA-1 Bindungsstellen reguliert werden (Wang et al., 2012). Es wäre aber auch denkbar, dass dem Pseudogen Siglec-P16 an sich eine regulatorische Funktion zukommt.

Die Funktion von Pseudogenen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Da sie nicht für Proteine kodieren, werden sie oft als "junk DNA" bezeichnet (Pink et al., 2011). Häufig werden sie auch als Protogene angesehen, da sie, wie im Falle von Siglec-11 vermutet, an der Entstehung neuer Gene beteiligt sein können (siehe Abb. 11) (Wang et al., 2012). 2-20% der humanen Pseudogene werden jedoch in mRNA transkribiert (Harrison et al., 2005; Pink et al., 2011; Yano et al., 2004; Zheng et al., 2005; Zheng et al., 2007). Darüber hinaus ist diese Transkription gewebsspezifisch und kann durch bestimmte Faktoren ausgelöst werden. Ob diese mRNA-Sequenzen tatsächlich regulatorische Funktionen übernehmen, ist bisher ungeklärt (Pink et al., 2011). Im Anbetracht der evolutionären Konservierung des Siglec-P16-Gens scheint eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Expression von Siglec-11 aber durchaus möglich.

Die Ergebnisse der reversen Transkriptase PCR zeigen eine eindeutige Expression von Siglec-16 auf mRNA-Ebene in humanem Hirngewebe. Dies macht eine Expression des Rezeptors auf Mikroglia wahrscheinlich, da Siglecs hauptsächlich auf Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet werden. Die Expression des eng mit Siglec-16 verwandten Siglec-11 mikroglia-spezifisch und wird darüber hinaus durch eine ähnliche GATA-1 Bindungsstelle reguliert (Crocker et al., 2007). Überdies besitzt gerade Gliom-

Gewebe eine hohe Dichte an Mikroglia, so dass von einem Vorkommen von Mikroglia in dem untersuchten Material auszugehen ist (Wei et al., 2013).

Eine Expression von Siglec-16 auf einem anderen Zelltyp im untersuchten neuronalen Gewebe, wie beispielsweise auf Gliom-Zellen, ist jedoch möglich. Denn es lassen sich auch auf Gliom-Zellen Oberflächenrezeptoren nachweisen, die einen Einfluss auf Zelldifferenzierung und Proliferationsraten haben können (Li und Hall, 2011). Darum wäre insbesondere im Falle eines aggressiv proliferativ wachsenden Tumors die Expression eines aktivierenden Rezeptors, wie Siglec-16, denkbar. Weitere Untersuchungen könnten hier die Expression und den Einfluss von Siglec-16 klären.

4.2.2 Nachweis von Siglec-16 auf humaner Mikroglia

Um eine Expression von Siglec-16 auf Mikroglia zu zeigen, wurden in dieser Arbeit humane aus induzierten Stammzellen generierte Mikroglia (iPSdM) mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe Kapitel 3.1.3). Hierbei wurden eine Zelllinie mit heterozygotem Siglec-16/Siglec-P16-Genotyp und zwei Zelllinien mit homozygotem Siglec-16/Siglec-16-Genotyp analysiert. Es konnte eine Expression von Siglec-16 auf allen drei Mikrogliazelllinien nachgewiesen werden (siehe Abb. 25). Somit wurde in dieser Arbeit der erste Nachweis einer Expression von Siglec-16 auf der Zelloberfläche von humanen Mikroglia auf Proteinebene erbracht.

Für die Anfärbung der Zellen wurde der zur Zeit einzige kommerziell erhältliche Antikörper (Anti-Siglec-16, R&D Systems), welcher selektiv an das Siglec-16-Protein im humanen System bindet und kein Bindungsverhalten gegen Siglec-11 zeigt, verwendet. Damit kann ein falsch positives Signal wegen der Bindung an Siglec-11 ausgeschlossen werden.

Die Erzeugung von Zelllinien aus humanen induzierten Stammzellen ist ein noch sehr junges Verfahren. Es liegen bisher nur wenige Daten über Reproduzierbarkeit und Stabilität der hiermit generierten Daten vor (Yamanaka, 2012). Darüber hinaus handelt es sich bei einem Zellkultursystem um einen artifiziellen Versuchsaufbau. Auf Grund dessen sind die so erzeugten Daten nur in begrenztem Maße auf den lebenden Organismus übertragbar (Stanslay et al., 2012). Färbungen in humanem Gewebe könnten in Zukunft weitere Hinweise auf die Expression von Siglec-16 liefern. Leider ist der bisher

einzig für Siglec-16 erhältliche Antikörper für die Anfärbung von fixierten Gewebsschnitten nicht verwendbar, so dass erst die Entwicklung neuer Antikörper eine abschließende Beurteilung ermöglichen kann. In Zusammenschau der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ist aber eine Expression des Rezeptors Siglec-16 auf humanen Mikroglia wahrscheinlich.

4.3 Expression von Siglec-16 im murinen Modellorganismus

Um die Wirkungsweise des humanspezifischen Rezeptors Siglec-16 in einem lebenden Organismus analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit ein Siglec-16 transgenes Mausmodell erzeugt. Ferner wurde der Rezeptor auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia in Zellkultur untersucht.

4.3.1 Expression von Siglec-16 auf murinen Mikroglia in Zellkultur

Siglec-16 wurde zusammen mit dem fluoreszierenden Protein EGFP auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM) in Zellkultur durch lentivirale Transduktion überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.3). Eine anschließende Selektion der EGFP positiven Zellen mittels FACS-Sorting ermöglichte eine vergleichbare Expression in den verschiedenen Zellkulturen (siehe Kapitel 3.2.4).

Als Promotor wurde der EF1a-Promotor (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 alpha) verwendet. Dieser wird zur Überexpression von Genen häufig verwendet, da er eine stabile Expression des gewünschten Gens in verschiedensten Zellpopulationen erlaubt und unabhängig von Umgebungssituationen ist (Qin et al., 2010). Das Siglec-16-Gen wurde durch eine IRES-Sequenz vom EGFP-Gen getrennt. Dies ermöglicht eine gleichzeitige Expression der beiden Gene (Thompson, 2012). Durch die Lage des Siglec-16-Gens vor dem EGFP-Gen kann deshalb bei nachgewiesener Expression von EGFP von einer Siglec-16-Expression ausgegangen werden (siehe Kapitel 3.2.1).

Die aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia (ESdM) zeichnen sich durch ein mit primärer Mikroglia vergleichbares Oberflächenrezeptor- und Genexpressionsprofil, die Fähigkeit der chemokininduzierten Migration und Phagozytose, sowie durch eine stabile Proliferationsrate aus (Beutner et al., 2010). Auf Grund dessen ist diese Zelllinie

ein gutes Modell, um die Auswirkung eines Rezeptors auf Mikroglia *in vitro* zu untersuchen.

Ein Nachteil des murinen Systems bezüglich einer Überexpression von Siglec-16 ist der schwierige Nachweis des Rezeptors auf Proteinebene. Die bisher zur Verfügung stehenden Antikörper gegen Siglec-16 zeigen an murine Mikroglia ein starkes unspezifisches Bindungsverhalten im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (vergleiche auch Kapitel 3.3.8). Auf Grund dieses unspezifischen Bindungsverhaltens in der Maus ist eine Differenzierung zwischen Siglec-16 überexprimierenden Mikroglia und der EGFP-Kontrolle nicht möglich. Jedoch konnte in dieser Arbeit eine Expression von Siglec-16 mit dem verwendeten pLenti-EF1a-Siglec-16-IRES-EGFP-Plasmid auf HEK-Zellen (human embryonal kidney cells) im Vergleich zur pLenti-EF1a-IRES-EGFP-Kontrolle gezeigt werden (siehe Kapitel 3.2.2). Dies beweist die Funktionalität des verwendeten Vektorsystems und die Fähigkeit zur Expression von Siglec-16. Folglich ist bei dem Nachweis einer EGFP-Expression auch von einer Siglec-16-Expression auszugehen.

4.3.2 Expression von Siglec-16 auf murinen Mikroglia im transgenen Mausmodell

Hirasawa et al. konnten mit Hilfe des mikroglia-spezifischen Iba1-Promotors ein transgenes Mausmodell mit einer selektiven Expression von EGFP in Mikroglia erzeugen (Hirasawa et al., 2005). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit ein Siglec-16 transgenes Mausmodell generiert. In dem dabei verwendeten Genkonstrukt wurde im Vergleich zu Hirasawa et al. das EGFP-Gen durch das Siglec-16-Gen ersetzt und so eine selektive Expression des Rezeptors auf Mikroglia ermöglicht.

Die Integration des Konstrukts in das Genom konnte mittels PCR, quantitativer Real-Time PCR und Southern Blot gezeigt werden (siehe Kapitel 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6). Der Nachweis einer Genexpression von Siglec-16 im Gehirn konnte mit Hilfe der reversen Transkriptase PCR erbracht werden (siehe Kapitel 3.3.7). Außer dieser war bis auf eine schwache Expression in der Milz keine weitere Expression in Leber oder Blut nachzuweisen. Da der Iba1-Promotor nur im ZNS in Mikroglia aktiv ist (Hirasawa et al., 2005) und in anderen Organen keine nennenswerte Expression von Siglec-16 gezeigt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass das Gentranskript von Siglec-16 ausschließlich in Mikroglia gebildet wird.

In dieser Arbeit wurde kein fluoreszierendes Marker-Protein in das Transgen mit eingefügt, welches die Detektion einer selektiven Expression von Siglec-16 in Mikroglia erleichtert hätte. Hierfür sind zwei Gründe zu nennen: Zum einen geschieht die Integration des Transgens bei der verwendeten Methode frei und ungerichtet. Weder der Ort der Integration noch die Anzahl der in das Genom integrierten Transgene ist steuerbar. Dem zu Folge sind alle hieraus entstandenen Mauslinien trotz gleichem Transgen einzigartig und nur in begrenztem Maße untereinander vergleichbar. Eine zur Auswertung der gewonnenen Daten notwendige Kontrollmauslinie müsste in optimaler Weise eine Integration des EGFP-Kontrollkonstrukts an gleicher Stelle und in gleicher Anzahl vorweisen. Dies ist rein statistisch sehr unwahrscheinlich. Zum anderen ist die Unschädlichkeit von fluoreszierenden Marker-Proteinen bis zum heutigen Zeitpunkt zwar gut untersucht (Remington, 2011), aber ein Einfluss auf Genexpression und Zellaktivierung kann nicht ausgeschlossen werden. Vor allem bei der Untersuchung von sehr empfindlichen Prozessen, wie der Immunregulation, sollte deshalb weitestgehend auf interagierende Stimuli verzichtet werden.

Der Nachweis von Siglec-16 auf der Zelloberfläche der Mikroglia im transgenen Mausmodell war auf Grund der bereits besprochenen unspezifischen Bindung des Siglec-16 spezifischen Antikörpers nur begrenzt möglich (siehe hierzu auch Kapitel 4.3.1). Mit Hilfe eines diskontinuierlichen Percoll-Gradienten konnten zwar Mikroglia aus dem Gehirn der transgenen Mäuse isoliert werden und eine Expression von Siglec-16 mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden (siehe Kapitel 3.3.8). Jedoch war das positive Signal im Vergleich zur negativen Kontrolle wegen der unspezifischen Bindung des Antikörpers auf muriner Mikroglia nur sehr schwach. Es stehen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine im Mausmodell spezifischeren Antikörper zur Verfügung, so dass erst Untersuchungen mit neu entwickelten Antikörpern diese Problematik lösen können.

4.3.3 Die Expression von Siglec-16 zeigt in vitro und in vivo vergleichbare Ergebnisse

Die Analyse eines durch pronukläre Injektion und ungerichtete Integration erzeugten transgenen Mausmodells ist auf Grund der fehlenden Kontrollierbarkeit der Integrationsstelle erschwert. Um eine Funktionalität des Modells zu bestätigen, sind deshalb weitere davon unabhängig durchgeführte Versuche von besonderem Interesse.

In dieser Arbeit konnte sowohl im Siglec-16 transgenen Mausmodell als auch in Zellkulturexperimenten mit ESdM eine Senkung der Expression von TNF- α und IL-1 β bei Expression von Siglec-16 gezeigt werden. Darüber hinaus waren die beiden zur Überexpression verwendeten Vektorsysteme (Iba1- und EF1a-Promotor) ebenso verschieden wie die verwendeten Methoden zur Integration des Transgens in das Genom (lentivirale Transduktion und pronukleäre Injektion). Diese unabhängigen Methoden und deren vergleichbare Ergebnisse bestätigen, dass sowohl das erzeugte transgene Mausmodell als auch das Zellkultursystem mit muriner Mikroglia valide Daten liefert. Für weitere Untersuchungen von Siglec-16 können Mausmodell und Zellkultursystem somit herangezogen werden kann.

4.4 Regulation, Funktion und Wirkung von Siglec-16

4.4.1 Siglec-16 steigert die Phagozytoserate von Mikroglia

Mikroglia sind die ortsständigen Makrophagen des zentralen Nervensystems (Biber et al., 2007). Der Einfluss eines Rezeptors auf die Phagozytoserate von Mikroglia ist deshalb von besonderem Interesse. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Siglec-16 auf muriner Mikroglia zu einer signifikanten Steigerung der Phagozytoserate führt. Die Phagozytoserate konnte hierbei durch eine Stimulation mit PSA-20, einem möglichen Liganden des Siglec-16-Rezeptors, zusätzlich gesteigert werden.

Für die Untersuchung der Phagozytoserate wurde ein Versuchsaufbau mit Latex Beads gewählt. Dieser eignet sich gut, um den grundsätzlichen Einfluss auf die Phagozytoseeigenschaften von Zellen zu untersuchen. Es lassen sich hierbei jedoch keine Aussagen darüber treffen, welche Bestandteile bevorzugtes Ziel der Phagozytose sind. Hierzu müssten weitere Versuche mit apoptotischem neuronalen Material und neuronalen Kulturen durchgeführt werden.

Als ortsständige Makrophagen sind Mikroglia für das Abräumen von Pathogenen, Zelltrümmern und Zellbestandteilen verantwortlich (Sierra et al., 2013). Gerade eine Steigerung der Phagozytose ohne Entzündungsreaktion ist im empfindlichen neuronalen Gewebe von besonderer Bedeutung. Diese Eigenschaft konnte für den auf Mikroglia exprimierten Rezeptor Trem-2 gezeigt werden (Takahashi et al., 2005). Trem-2 ist ebenso

wie Siglec-16 mit dem Transmembranadaptermolekül DAP12 assoziiert (Colonna, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Siglec-16 die Expression der proinflammatorischen Entzündungsmediatoren senken kann (siehe Kapitel 3.2.5 und 3.3.8). In Zusammenschau der Daten ist es also durchaus möglich, dass es sich bei Siglec-16, ebenso wie bei Trem-2, um einen DAP12-assoziierten Rezeptor handelt, welcher eine Phagozytose ohne begleitende Entzündungsreaktion vermittelt.

Die Steigerung der Phagozytoserate durch Siglec-16 ist insbesondere im Hinblick auf den Rezeptor Siglec-11 interessant. Siglec-16 bindet aufgrund der großen Ähnlichkeit in der Sialinsäurebindungsregion der beiden Rezeptoren mit großer Wahrscheinlichkeit an den gleichen Liganden wie Siglec-11 (Cao et al., 2008). Für Siglec-11 konnte aber eine Senkung der Phagozytoserate in Mikroglia nachgewiesen werden (Wang und Neumann, 2010). Dies lässt vermuten, dass durch das Zusammenspiel der beiden Rezeptoren ein Gleichgewicht in der Phagozytose erzeugt werden kann.

4.4.2 Siglec-16 senkt die Expression von TNF- α und IL-1 β in vitro und in vivo

TNF- α und IL-1 β sind zwei zentrale Mediatoren der Immunantwort im murinen und humanen Organismus. Sie werden hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet (Aggrawal et al., 2012; Sims und Smith, 2010). Im Gehirn werden beide Botenstoffe vor allem von Mikroglia ausgeschüttet (Gudagno et al., 2013; Sims und Smith, 2010). Eine Erhöhung der Expression von TNF- α im Gehirn führt neben einer Aktivierung von Mikroglia zu einer Vermehrung von Astrozyten und zu einer Demyelinisierung von Nervenfasern (Probert et al., 1995; Wajant et al., 2003). IL-1 β ist als einer der zentralen Regulatoren von Entzündungsreaktionen im Gehirn (Basu et al. 2004; Kaushik et al., 2013; Saper und Breder 1992) an neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, sowie an akuten Ereignissen wie Trauma und Schlaganfall beteiligt (Halle et al. 2008; Meda et al. 1999; Rothwell und Luheshi 2000).

Wegen dieser zentralen Aufgaben von TNF- α und IL-1 β wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Immunrezeptors Siglec-16 auf die Expression der beiden Entzündungsmediatoren in muriner Mikroglia sowohl in Zellkultur als auch im transgenen Mausmodell untersucht. Hierbei zeigte sich unter dem Einfluss von Siglec-16 sowohl in

vitro (siehe Kapitel 3.2.5) als auch in vivo (siehe Kapitel 3.3.9) eine Reduktion der Expression von TNF- α und IL-1 β .

Der hemmende Effekt von Siglec-16 auf die Bildung von TNF- α und IL-1 β konnte somit in zwei voneinander unabhängigen Versuchssystemen gezeigt werden. Dies erlaubt die Annahme, dass Siglec-16 trotz seiner Assoziation mit dem aktivierenden ITAM tragenden DAP12 unter bestimmten Umständen eine inhibierende Wirkung auf die Immunantwort haben kann. Unter welchen Bedingungen dies geschieht, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.4.3 LPS erhöht die Expression von Siglec-16 auf humaner Mikroglia

Um die Funktions- und Wirkungsweise eines Immunrezeptors besser verstehen zu können, ist es wichtig die Regulation seiner Genexpression zu kennen. In dieser Arbeit wurden hierzu humane aus induzierten Stammzellen generierte Mikroglia in Zellkultur mit den Immunstimulatoren LPS, TNF- α , IFN- γ und IL-4 behandelt. Hierbei konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von Siglec-16 nach Stimulation mit LPS gezeigt werden (siehe Kapitel 3.1.4).

LPS ist ein komplexes Glykolipid, welches Bestandteil der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien ist (Bryant et al., 2010). Als Endotoxin ist es eines der am stärksten fieberauslösenden Moleküle und ist am Zustandekommen der Akuten Phase Reaktion sowie an dem klinischen Krankheitsbild der Sepsis beteiligt (Rivest et al., 2000). (Die Sepsis ist definiert als das Zusammentreffen von einer Bakteriämie im Blut mit einer systemischen Entzündungsreaktion des Körpers mit Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose oder -penie (AWMF, 2010).) Über eine Bindung an den Rezeptorkomplex aus CD14, TLR4 und MD2 bewirkt LPS eine intrazelluläre Aktivierung des NF κ B-, MAP3-Kinase- und IRF3-Signalweges (Bryant et al., 2010). In Folge dessen kommt es zu einer Freisetzung von TNF- α , IL-1 β und IL-6. Diese Zytokine bewirken dann eine massive Immunreaktion, welche die Bekämpfung des eingedrungenen Pathogens zum Ziel hat (Rivest et al., 2000). Ohne gegenregulatorische Maßnahmen aber kann es zu einer überschießenden Immunantwort kommen und so eine Sepsis mit hoher Letalität und Morbidität induziert werden (Schulte et al., 2013).

Für die Hochregulierung von Siglec-16 nach LPS-Stimulation können verschiedene Gründe in Betracht gezogen werden. Zum einen könnte die Wirkung von Siglec-16 über das ITAM-Motiv eine Verstärkung der durch LPS hervorgerufenen Immunreaktion bewirken, um die Bekämpfung des Pathogens zu unterstützen (Cao et al., 2008). Darüber hinaus würde eine Erhöhung der Phagozytoserate die Aufnahme von Bakterienbestandteilen, welche häufig Sialinsäuren in ihrer Zellmembran enthalten, verstärken (Pillai et al., 2012). Zum anderen könnte der Rezeptor aber auch über DAP12 eine Abschwächung der Immunreaktion bewirken. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass mit ITAMs assoziierte Rezeptoren eine Hemmung der von Toll-like-Rezeptor-4 induzierten Aktivierung herbeiführen können (Huyn et al., 2012). So führt eine Aktivierung des murinen mit DAP12 assoziierten Siglec-H-Rezeptors zu einer Hemmung des Signalweges von Toll-like-Rezeptoren auf dendritischen Zellen (Blasius und Colonna, 2006; Zhang et al., 2006). Siglec-H konnte nach Stimulation mit LPS und IFN- γ auch auf muriner Mikroglia nachgewiesen werden (Kopatz et al., 2013). Eine ähnliche Wirkungsweise von Siglec-16 mit Hemmung der Toll-like-Rezeptor vermittelten Zellaktivierung bei durch LPS induzierter Inflammation scheint deshalb möglich. Dies wäre gerade bei einer systemischen Entzündungsreaktion wichtig, um das Gehirn lokal vor irreversiblen Schädigungen einer überschießenden Immunantwort zu schützen. Im Gegensatz dazu könnte Siglec-16 durch eine Bindung an Bakterienbestandteile bei einer lokalen Infektion des ZNS eine aktivierende Wirkung entfalten und so die Bekämpfung der Pathogene unterstützen.

4.4.4 Siglec-16 bewirkt eine Abschwächung der durch LPS induzierten Entzündungsreaktion

Um den Einfluss von Siglec-16 auf die durch LPS induzierte Entzündungsreaktion zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit im Siglec-16 transgenen Mausmodell mittels intraperitonealer LPS-Injektion eine systemische Inflammation ausgelöst und im Anschluss die Expression von TNF- α und IL-1 β im Gehirn untersucht (siehe Kapitel 3.3.8).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Siglec-16 auf Mikroglia im transgenen Mausmodell zu einer deutlichen Reduktion der Bildung von TNF- α (83,7 %, $p=0,075$) und IL-1 β (84,7 %, $p<0,05$) nach Stimulation mit LPS führt. Darüber hinaus

zeigte sich nach LPS-Injektion im Vergleich zur PBS-Kontrolle eine stärkere relative Abschwächung der Expression der beiden Entzündungsmediatoren (siehe Kapitel 3.3.8).

IL-1 β und TNF- α sind zentrale Mediatoren für die über LPS vermittelte Immunreaktion (Rivest et al., 2000). Bei einer systemischen, durch LPS induzierten Entzündungsreaktion, kommt es im Gehirn zu einer Aktivierung von Mikroglia mit einer verstärkten Bildung der beiden Zytokine und der Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Sonneville et al., 2013). Dies führt bei einer überschießenden Immunantwort zu neurologischen Störungen, wie beispielsweise dem Krankheitsbild einer Sepsis-assoziierten Enzephalopathie. Welche Faktoren für das Überschießen der Immunantwort und der damit einhergehenden neuronalen Schädigung verantwortlich sind, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt (Eidelman et al., 1996; Sonneville et al., 2013).

In Zusammenschau der in dieser Arbeit gezeigten Daten scheint Siglec-16 bei der durch LPS induzierten Entzündungsreaktion im ZNS eine Rolle zu spielen. Es könnte nach einer systemischen Freisetzung von LPS aus den Zellwänden gramnegativer Bakterien zu einer Hochregulierung von Siglec-16 kommen. Durch den hemmenden Effekt des Siglec-16-Rezeptors auf die Immunantwort könnte so eine massive Reaktion der Mikroglia und eine damit einhergehende Schädigung des empfindlichen neuronalen Gewebes verhindert werden. Gerade im Hinblick auf die genetische Verteilung des funktionellen Siglec-16-Gens in der Gesamtpopulation könnte hier eine Erklärung für die Varianz im klinischen Erscheinungsbild von durch LPS induzierte Krankheitsbilder zu finden sein.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals der Nachweis einer Expression von Siglec-16 auf Mikroglia erbracht werden. Darüber hinaus konnten grundlegende Mechanismen der Regulation und Funktionsweise des Rezeptors gezeigt werden. Zusätzlich wurden mit der Generierung eines Siglec-16 transgenen Mausmodells, eines Zellkulturmodells mit Expression von Siglec-16 auf Mikroglia und eines Verfahrens zur genauen Bestimmung des Siglec-16-Genotyps Methoden etabliert, mit welchen weitere Fragestellungen zu beantworten sein können.

In zukünftigen Arbeiten sollte ein Schwerpunkt auf der besseren Detektierbarkeit von Siglec-16 in humanem Hirngewebe liegen. Die Entwicklung neuer Antikörper könnte dazu beitragen den Rezeptornachweis zu verbessern. Überdies wäre eine Bestimmung der an Siglec-16 bindenden Liganden, beispielsweise mit Hilfe eines Siglec-16-Fusionsproteins, für ein besseres Verständnis des Rezeptors von Interesse.

Weitere Untersuchungen könnten klären unter welchen Bedingungen Siglec-16, trotz seiner Assoziation mit dem ITAM tragenden DAP12, eine inhibierende Wirkung auf die Immunreaktion hat und welche Stimuli nötig sind, sein aktivierendes Potential hervorzurufen. Hier wären insbesondere humane Zellkultursysteme mit Ko-Kultur von Mikroglia und Neuronen und eine Kombination verschiedener Mausmodelle von Interesse.

Eine Klärung des Einflusses von Siglec-16 auf die durch LPS induzierte Entzündungsreaktion im ZNS könnte weitere Hinweise auf die Funktion des Rezeptors im menschlichen Organismus geben. Hierbei wäre eine genauere Analyse der freigesetzten Moleküle *in vitro* und *in vivo*, sowie eine Untersuchung des Einflusses von Siglec-16 auf die mit der Inflammation einhergehende Neurodegeneration im transgenen Tiermodell interessant.

Darüber hinaus könnten weitere Analysen des Siglec-16-Genotyps eine Beteiligung von Siglec-16 an neurologischen Krankheitszuständen, wie neurodegenerativen Erkrankungen oder malignen Hirntumoren, klären.

5. Zusammenfassung

Mikroglia sind die ortsständigen Immunzellen des zentralen Nervensystems und somit wesentlich an der Überwachung und Erhaltung der Homöostase im empfindlichen neuronalen Gewebe beteiligt. Sie treten als Teil des angeborenen Immunsystems über ihre Oberflächenrezeptoren mit ihrer Umgebung in Kontakt. Ein potentieller Rezeptor auf Mikroglia ist der erst kürzlich entdeckte humanspezifische Siglec-16-Rezeptor, der aufgrund einer Mutation nur in einer Subpopulation der Bevölkerung gebildet wird.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Vorkommen, Funktion und Wirkung von Siglec-16 auf Mikroglia. Dazu dienten humane Gewebeanalysen, Zellkulturmodelle von humaner und muriner Mikroglia und die Erzeugung eines Siglec-16 transgenen Mausmodells.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Nachweis einer Expression von Siglec-16 in adultem Hirngewebe sowie auf humanen aus induzierten pluripotenten Stammzellen generierten Mikroglia erbracht werden. Um eine bessere Aussage über den Genotyp und die Allelfrequenz von Siglec-16 treffen zu können, wurde ein auf PCR und Sequenzierung basierende Methode entwickelt, welche eine valide Genotypisierung ermöglicht. Die Etablierung einer Expression von Siglec-16 auf murinen aus embryonalen Stammzellen generierten Mikroglia war ebenso erfolgreich, wie die Erzeugung eines Siglec-16 transgenen Mausmodells mit einer selektiven Expression von Siglec-16 auf Mikroglia. Im murinen System konnte sowohl in Zellkultur als auch im Tiermodell ein hemmender Einfluss von Siglec-16 auf die Genexpression der Entzündungsmediatoren TNF- α und IL-1 β gezeigt werden. In Funktionsanalysen von humanen Mikroglia in Zellkultur konnte eine durch LPS induzierte Steigerung der Siglec-16-Expression gezeigt werden. Interessanterweise zeigte sich ein abschwächender Effekt von Siglec-16 auf die durch LPS vermittelte Entzündungsreaktion im Siglec-16 transgenen Mausmodell. Im Weiteren zeigte sich ein positiver Einfluss von Siglec-16 auf die Phagozytoserate von Mikroglia.

Weitere Untersuchungen könnten die Bedingungen analysieren, unter welchen Siglec-16 trotz seiner Assoziation mit dem ITAM tragenden DAP12 eine inhibierende Wirkung auf die Immunreaktion hat und welche Stimuli nötig sind sein aktivierendes Potential hervorzurufen. Darüber hinaus könnten weitere Analysen eine mögliche Beteiligung von Siglec-16 an pathologischen Zuständen des ZNS klären.

6. Literaturverzeichnis

Addgene, 2014 a: pMD2.G (Plasmid #12259). www.addgene.org/12259/ (05.06.2014)

Addgene, 2014 b: psPAX2 (Plasmid #12260). www.addgene.org/12260/ (05.06.2014)

Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012; 119: 651-665

Ajami B, Bennett J L, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1538-1543

AWMF, 2010: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/079-001I_S2k_Sepsis_2010-abgelaufen.pdf (Zugriffsdatum: 07.09.2015)

Balakirev ES, Ayala FJ. Pseudogenes: Are they junk or funktional DNA? *Annu Rev Genet* 2003; 37: 123-151

Barker CF, Billingham RE. Immunological privileged sites. *Adv Immunol* 1977; 25: 1-54

Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 2004; 78: 151–156

Beutner C, Roy K, Linnartz B, Napoli I, Neumann H. Generation of microglial cells from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2010; 5.9: 1481-1494

Beutner C, Linnartz-Gerlach B, Schmidt SV, Beyer M, Mallmann MR, Staratschek-Jox A, Schultze JL, Neumann H. Unique transcriptome signature of mouse microglia. *Glia* 2013; 61.9: 1429-1442

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* 2007; 30: 596-602

Blasius AL, Colonna M. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol* 2006; 27: 255-260

Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 135-136

Boche D, Perry VH, Nicoll JAR. Review: Activation patterns of Microglia and indentification in the human brain. *Neuropath Appl Neurobiol* 2013; 39: 3-11

Brites D, Vaz AR. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 1-24

Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 8-14

- Cao H, Crocker PR. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation. *Immunology* 2010; 132: 18-26
- Cao H, Lakner U, de Bono B, Traherne JA, Trowsdale J, Barrow AD. SIGLEC16 encodes a DAP12-associated receptor expressed in macrophages that evolved from its inhibitory counterpart SIGLEC11 and has functional and non-functional alleles in humans. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2303-2315
- Cardona AE, Huang DR, Sasse ME, Ransohoff RM. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nat Protoc* 2006; 1: 1947-1951
- Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio Techniques* 1993; 15: 532-537
- Chomczynski P, Sacchi N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159
- Colonna M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 445-453
- Crocker PR, Clark EA, Filbin M, Gordon S, Jones Y, Kehrl JH, Kelm S, Douarin NL, Powell L, Roder J, Schnaar RL, Sgroi DC, Stamenkovic I, Schauer R, Schachner M, van den Berg TK, van der Merwe PA, Watt SM, Varki A. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 1998; 8: v
- Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 255-266
- Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Finsen B, Castellano B. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 2003; 458: 144-157
- Del Rio-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos I La microglia en estado normal II Intervención de la microglia en los procesos patológicos III Naturaleza probable de la microglia. *Bol de la Soc esp de biol* 1919; 9: 69-120
- Del Rio-Hortega P. Microglia. In: Penfield W Hrsg. *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. New York: Hoeber 1932: 482-534
- Drenckhahn D. *Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie; Zellbiologie - Band 2*. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2004
- Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, Sprung CL. The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA* 1996; 275: 470-473
- Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL. *The mouse in biomedical research*. Burlington - San Diego - London: Academic Press, Elsevier, Inc., 2007

Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Brevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC, Kaspar BK. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* 2014; 81: 1009-1023

Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 2007; 28: 12-18

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330: 841-845

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 2013; 45.7: 1-14

Gondo Y. 2008. Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 803-810

Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, Terry A, Schmutz J, Lamerdin J, Hellsten U, Goodstein D, Couronne O, Tran-Gyamfi M, Aerts A, Altherr M, Ashworth L, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caenepeel S, Carrano A, Caoile C, Chan YM, Christensen M, Cleland CA, Copeland A, Dalin E, Dehal P, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Garcia C, Georgescu AM, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Ho I, Huang W, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Larionov V, Leem SH, Lopez F, Lou Y, Lowry S, Malfatti S, Martinez D, McCready P, Medina C, Morgan J, Nelson K, Nolan M, Ovcharenko I, Pitluck S, Pollard M, Popkie AP, Predki P, Quan G, Ramirez L, Rash S, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, She X, Smith D, Slezak T, Solovyev V, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wagner M, Wheeler J, Wu K, Xie G, Yang J, Dubchak I, Furey TS, DeJong P, Dickson M, Gordon D, Eichler EE, Pennacchio LA, Richardson P, Stubbs L, Rokhsar DS, Myers RM, Rubin EM, Lucas SM. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 2004; 428: 529-535

Gudango J, Karajgikar M, Brown A, Cregan SP. Microglia-derived TNF α induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of Bcl-2 family member Puma. *Cell Death Dis* 2013; 4: e538

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 2008; 9: 857-865

Hamerman JA, Tchao NK, Lowell CA, Lanier LL. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nature Immunol* 2005; 6: 579-586

Harrison PM, Zheng D, Zhang Z, Carriero N, Gerstein M. Transcribed processed pseudogenes in the human genome: an intermediate form of expressed retrosequence lacking protein-coding ability. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 2374-2383

Hayakawa T, Angata T, Lewis AL, Mikkelsen TS, Varki NM, Varki A. A human-specific gene in Microglia. *Science* 2005; 309: 1693

Hildebrandt H, Becker C, Gluer S, Rosner H, Gerardy-Schahn R, Rahmann H. Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth. *Cancer Res* 1998; 58: 779-784

Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S, Kohsaka S. Visualization of Microglia in Living Tissues Using Iba1-EGFP Transgenic Mice. *J Neurosci Res* 2005; 81: 357-362

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749–3752

Hume DA. Applications of myeloid-specific promoters in transgenic mice support in vivo imaging and functional genomics but do not support the concept of distinct macrophage and dendritic cell lineages or roles in immunity. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 525-538

Huynh L, Wang L, Shi C, Park-Min KH, Ivashkiv LB. ITAM-coupled receptors inhibit IFN- γ signaling and alter macrophage responses to TLR4 and *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2012; 188: 3447-3457

Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biophys Biochem Res Commun* 1996; 224: 855-862

Ivashkiv LB. How ITAMs inhibit signaling. *Sci Signal* 2011; 4: pe20

Jaenisch R. Germ line integration of Moloney Leukemia Virus: effect of homozygosity at the M-MuLV locus. *Cell* 1977; 12: 691-696

Jaenisch R. Transgenic animals. *Science* 1988; 240: 1468-1474

Kaushik DK, Thounaojam MC, Kumawat KL, Gupta M, Basu A. Interleukin-1 β orchestrates underlying inflammatory responses in microglia via Krüppel-like factor 4. *J Neurochem* 2013; 127: 233-244

Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 2013; 16 : 273-280

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. *Physiol Rev* 2011; 91: 461-553

Kopatz J, Beutner C, Welle K, Bodea LG, Reinhardt J, Claude J, Linnartz-Gerlach B, Neumann H. Siglec-h on activated microglia for recognition and engulfment of glioma cells. *Glia* 2013; 61: 1122-1133

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of Microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39: 151-170

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 glycoalyx. *Glia* 2013; 61: 37-46

Li YM, Hall WA. Cell surface receptors in malignant glioma. *Neurosurgery* 2011; 69: 980-994

Loeb JE, Cordier W, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2295-2305

Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YV. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progr Neurobiol* 2009; 89: 277-287

Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011; 20: 359-268

Meda L, Baron P, Prat E, Scarpini E, Scarlato G, Cassatella MA, Rossi F. Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta- amyloid. *J Neuroimmunol* 1999; 93: 45-52

Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki A, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* 2009; 58: 141-149

Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1544-1553

National Center for Biotechnology Information, 2012a: NCBI - National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Zugriffsdatum: 11.05.2012)

National Center for Biotechnology Information, 2012b: Homo sapiens sialic acid binding Ig-like lectin 11 (SIGLEC11), RefSeqGene on chromosome 19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_030323.1?from=5001&to=17180&report=genbank (Zugriffsdatum: 11.05.2012)

National Center for Biotechnology Information, 2012c: Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p2 Primary Assembly. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000019.10?from=49969655&to=49975819&report=genbank (Zugriffsdatum: 11.05.2012)

National Center for Biotechnology Information, 2012d: Homo sapiens sialic acid binding Ig-like lectin 16 (gene/pseudogene), mRNA (cDNA clone IMAGE:5590502). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/24658684> (Zugriffsdatum: 11.05.2012)

Napoli I, Neumann H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2010; 225: 24–28

Neumann H, Wekerl H. Brain microglia: watchdogs with pedigree. *Nat Neurosci* 2013; 16: 253-255

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-1318

Partners Healthcare. 2014: Transgenic core. http://www.partners.org/researchcores/transgenic/transgenic_BWH.html (01.08.2014)

Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res* 2009; 204: 313-321

Patterson PH. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol Med* 2011; 17: 389-394

Pfirsch-Maisonnas S, Aloulou M, Xu T, Claver J, KanamarY X, Tiwari M, Launay P, Monteiro RC, Blank U. Inhibitory ITAM signaling traps activating receptors with the phosphatase SHP-1 to form polarized “inhibisome” clusters. *Sci Signal* 2011; 4: ra24

Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. Siglecs and Immune Regulation. *Ann Rev Immunol* 2012; 30: 357-392

Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Carter DRF. Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA* 2011; 17: 792-798

Poueymirou WT, Auerbach W, Auerbach W, Frendewey D, Hickey JF, Escaravage JM, Esau L, Doré AT, Stevens S, Adams NC, Dominguez MG, Gale NW, Yancopoulos GD, DeChiara TM, Valenzuela DM. F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 91-99

Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15: 300-312

Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11294-11298

Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hular I, Xiang AP, Ren BZ, Lahn BT. Systemic comparison of constitutive Promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS ONE* 2010; 5: e10611

- Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system. *Nature* 2010; 468: 253-262
- Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 623-635
- Remington SJ. Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Sci* 2011. 20: 1509-1519
- Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Exp Biol Med* 2000; 223: 22-38
- Robertson EJ. Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line. *Biol Reprod* 1991; 44: 238-245
- Rothwell NJ und Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 2000; 23: 618-625
- Rulicke T, Hübscher U. Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp Physiol* 2000; 85: 589-601
- Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 347-355
- Saper CB, Breder CD. Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog Brain Res* 1992; 93: 419-428
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al.. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 2012; 74: 691-705
- Scheidegger EP, Lackie PM, Papay J, Rothm J. In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Lab Invest* 1994; 70: 95-106
- Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated View. *Mediators Inflamm* 2013; 165974: 1-16
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 483-495
- Sierra A, Abiega O, Shahraz A and Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 2013; 7.6: 1-22
- Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 89-102

- Smith SR, Auerbach B, Morgan L. Serum neural cell adhesion molecule in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Br J Haematol* 1996; 92: 67-70
- Solito E, Sastre M. Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 2012; 3.14: 1-10
- Sonneville R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, Chretien F, Sharshar T. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care* 2013; 3: 15
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpur M, Huttner HB. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013; 153: 1219-1227
- Suzuki M, Suzuki M, Nakayama J, Zuzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M. Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycob* 2005; 15: 887-894
- Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture system in the study of microglia biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 115
- Takahashi K, Rochford CDP, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglia triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* 2005; 201: 647-657
- 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
- Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H. Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3072-3080
- Thompson SR. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol* 2012; 20: 558-566
- Tortora GJ, Derrickson BH. *Anatomie und Physiologie*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 2010; 8.11: 1-16
- Turnbull IR, Colonna M. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 155-161
- Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2012. 1253: 16-36

- Varki A, Schauer R. Sialic Acids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009; Chapter 14
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10: 45-65
- Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 2013; 36: 209-217
- Wang X, Mitra N, Cruz P, Deng L, Varki N, Angata T, Green ED, Mullikin J, Hayakawa T, Varki A. Evolution of Siglec-11 and Siglec-16 genes in hominins. *Mol Biol Evol* 2012; 29: 2073-2086
- Wang Y. Study of Human-specific microglial receptor Siglec-11 and generation of transgenic mice expressing human Siglec-11. Inaugural-Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2009
- Wang Y, Neumann H. Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11. *J Neurosci* 2010; 30: 3482-3488
- Wei J, Gabrusiewicz K, Heimberger A. The controversial role of microglia in malignant gliomas. *Clin Dev Immunol* 2013; 285246: 1-12
- Yamanaka. Induced Pluripotent stem cells: past, present, and future. *J Stem* 2012; 10: 678-684
- Yano Y, Saito R, Yoshida N, Yoshiki A, Wynshaw-Boris A, Tomita M, Hirotsune S. A new role for expressed pseudogenes as ncRNA: Regulation of mRNA stability of its homologous coding gene. *J Mol Med* 2004; 82: 414-422
- Zaccai NR, Maenaka K, Maenaka T, Crocker PR, Brossmer R, Kelm S, Jones EY. Structure-guided design of sialic acid-based Siglec inhibitors and crystallographic analysis in complex with sialoadhesin. *Structure* 2003; 11: 557-567
- Zhang J, Raper A, Sugita N, Hingorani R, Salio M, Palmowski MJ, Cerundolo V, Crocker PR. Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 2006; 107: 3600-3608
- Zheng D, Zhang Z, Harrison PM, Karro J, Carriero N, Gerstein M. Integrated pseudogene annotation for human chromosome 22: Evidence for transcription. *J Mol Biol* 2005; 349: 27-45
- Zheng D, Frankish A, Baertsch R, Kapranov P, Reymond A, Choo SW, Lu Y, Denoeud F, Antonarakis SE, Snyder M, Ruan Y, Wie CL, Gingeras TR, Guigo R, Harrow J, Gerstein MB. Pseudogenes in the ENCODE regions: Consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome Res* 2007; 17: 839-851

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Neumann für das Überlassen dieser wissenschaftlichen Fragestellung. Ich danke Herrn Prof. Dr. Harald Neumann insbesondere für die stetige und intensive Begleitung meines Projektes. Seine große Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, sowie seine ständige Bereitschaft zur kritischen und ideenreichen Reflexion haben zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Björn Scheffler und Herrn Roman Reinartz danke ich für das Bereitstellen der humanen Hirngewebsproben.

Frau Charlotte Schick danke ich für die gelungene Durchführung der pronukleären Injektionen, sowie die Aufzucht der Mauslinien.

Herrn Peter Wurst danke ich für die kompetente Einweisung in die Durchflusszytometrie und die Durchführung des FACS-sorting.

Mein besonderer Dank gilt Frau Jessica Reinartz und Frau Rita Jietou für ihre stets interessierte, fachkundige und lehrreiche Zusammenarbeit.

Der gesamten AG Neumann möchte ich für ein immer hilfsbereites und freundschaftliches Arbeitsumfeld danken.

Frau Dr. med. Anna Westermann (B.A.) danke ich für die sehr hilfreiche und konstruktive Diskussion meiner Arbeit.

Überdies gilt mein Dank den Gutachtern meiner Arbeit für die kritische Auseinandersetzung und Beurteilung.