

**CHARAKTERISIERUNG DER**  
***Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptor B4***  
**(LILRB4)- EXPRESSION**  
**IN MIKROGLIAZELLEN**



**Dissertation**

zur Erlangung des Grades „Dr. med.“  
aus dem Institut für Anatomie  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Jan Felix Kretzschmar  
geb. in Chemnitz

**Rostock 2020**



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. Björn Spittau (Universität Bielefeld, Institut für Anatomie)
2. Prof. Dr. Ralph Lucius (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Anatomie)
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. med. Andreas Hermann (Universität Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie)

**Jahr der Einreichung:** 2020

**Jahr der Verteidigung:** 2021

## Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 6 Nr. 1 der Promotionsordnung der Universität Rostock für die Medizinische Fakultät.

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „*Charakterisierung der Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptor B4 (LILRB4)- Expression in Mikrogliazellen*“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
3. Die Ordnung der Universität Rostock zur Sicherung der Redlichkeit in der Wissenschaft habe ich zur Kenntnis genommen und akzeptiert.
4. Die Dissertation oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer anderen Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
5. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich.
6. Die Bedeutung der eidesstaatlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstaatlichen Versicherung sind mir bekannt.

**Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reinste Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.**

Rostock, der .....

.....

(Jan Felix Kretzschmar)



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Mikroglia</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Historie und Entdeckung .....	3
1.1.2 Ontogenese und Entwicklung.....	4
1.1.3 Homöostase.....	5
1.1.4 Aktivierung .....	7
1.1.5 TGF $\beta$ .....	9
1.1.6 LPS.....	10
1.1.7 Siglec-H .....	11
<b>1.2 LILRB4</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 Die Homöostase des Immunsystems durch ITAMs und ITIMs.....	13
1.2.2 Signaltransduktion der ITAMs und ITIMs.....	13
1.2.3 Nomenklatur der LILRs .....	15
1.2.4 Struktur und Liganden von LILRB4 .....	16
1.2.5 Genetische Polymorphismen.....	17
1.2.6 Expression von LILRB4.....	18
1.2.7 Funktion von LILRB4.....	18
1.2.8 LILRB4- Expression auf Mikroglia .....	20
<b>2 ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Materialien</b> .....	<b>23</b>
3.1.1 Reagenzien.....	23
3.1.2 Antikörper .....	23
3.1.3 Primer .....	24
3.1.4 Kits.....	24
3.1.5 Geräte.....	24
3.1.6 Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	25
3.1.7 Lösungen, Puffer und Medien .....	25
3.1.8 Software.....	26
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.2.1 Tiere und Zelllinien.....	26
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	26
3.2.3 Behandlung der BV2- Kulturen.....	27
3.2.4 RNA-Isolierung der BV2- Zellen .....	27
3.2.5 cDNA-Synthese aus BV2- RNA.....	28

3.2.6 Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT- qPCR).....	28
3.2.7 Durchflusszytometrie mit <i>in vitro</i> Mikroglia.....	29
3.2.7.1 Herstellung primärer Mikrogliaulturen aus P0/P1- Mäusen .....	29
3.2.7.2 Behandlung der primären Mikrogliaulturen .....	30
3.2.7.3 Isolierung und Färbung der <i>in vitro</i> Mikrogliazellen.....	30
3.2.8 Durchflusszytometrie mit <i>ex vivo</i> Zellen.....	31
3.2.8.1 Isolierung der <i>ex vivo</i> Peritonealmakrophagen .....	32
3.2.8.2 Percoll- Isolierung der <i>ex vivo</i> Mikrogliazellen .....	32
3.2.8.3 Isolierung von <i>ex vivo</i> Knochenmarksmonozyten .....	33
3.2.8.4 Färbung der <i>ex vivo</i> Zellen.....	33
3.2.9 Gating- Strategie .....	34
3.2.10 ICC (Immunzytochemie).....	36
3.2.11 Statistik .....	36
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Nachweis der Wirkung von TGF<math>\beta</math> und TGF<math>\beta</math>- Inhibitor mittels ICC .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 RT- qPCR- Ergebnisse: LILRB4- Transkription in BV2- Zellen.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Durchflusszytometrie von <i>in vitro</i> Mikroglia .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 <i>Ex vivo</i> Durchflusszytometrie aus Wildtypmäusen .....</b>	<b>45</b>
4.4.1 <i>Ex vivo</i> Mikroglia im Vergleich zu <i>in vitro</i> Mikroglia.....	45
4.4.2 <i>Ex vivo</i> Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten im Vergleich.....	47
4.4.3 Vergleich männlicher und weiblicher 7 Tage alter <i>ex vivo</i> Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten.....	49
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 LILRB4- Transkription der BV2- Zelllinie.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2 LILRB4- Oberflächenrezeptorausprägung primärer Mikroglia.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 LILRB4- Oberflächenproteinlevel: <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> Mikroglia im Vergleich .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4 Mikrogliale LILRB4- Oberflächenrezeptorlevel im Vergleich zu Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten.....</b>	<b>55</b>
<b>5.5 Oberflächenproteinlevel von Siglec-H.....</b>	<b>56</b>
5.5.1 <i>In vitro</i> und <i>ex vivo</i> Mikroglia im Vergleich .....	57
5.5.2 Siglec-H Proteinlevel von Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten.....	59
<b>5.6 Ausblick.....</b>	<b>60</b>
<b>6 ANHANG.....</b>	<b>61</b>
<b>6.1 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>6.2 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>6.3 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>

<b>6.4 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>6.5 Veröffentlichungen .....</b>	<b>80</b>
<b>6.6 Danksagung .....</b>	<b>81</b>
<b>6.7 Lebenslauf.....</b>	<b>82</b>





## ZUSAMMENFASSUNG

Mikroglia sind die entscheidenden Immunzellen des ZNS, welche eine wesentliche Rolle in der neuronalen Entwicklung, Homöostase, Neuroinflammation und in altersabhängigen Dysfunktionen spielen. Faktoren wie TGF $\beta$  halten Mikroglia in Funktionszuständen der Überwachung, Faktoren wie LPS versetzen sie in einen aktivierten Zustand. Jeder dieser Phänotypen weist seine eigene molekulare Signatur mit spezifischen Markern auf. LILRB4 gilt als Marker aktivierter und krankheitsassoziiertes Mikroglia. Im peripheren Immunsystem limitiert er u.a. überschießende, inflammatorische Immunantworten. Seine Regulation und Funktion im ZNS ist hingegen noch weitgehend unbekannt.

Diese Dissertation wurde geschrieben, um die Regulierung von LILRB4 in verschiedenen mikroglialen Phänotypen zu beschreiben und soll dazu beitragen seine Funktion im ZNS besser zu verstehen.

Für dieses Ziel wurden mittels RT- qPCR die RNA- Expressionslevel von LILRB4 untersucht. Es wurde durch Stimulation mit TGF $\beta$  eine Suppression auf homöostatischen BV2- Zellen und durch Stimulation mit LPS eine Hochregulierung auf aktivierten BV2- Zellen detektiert. Kürzere Behandlungszeiträume ergaben eine stärkere Veränderung der LILRB4- Genexpression in beide Richtungen. TGF $\beta$  konnte bei der simultanen Behandlung mit beiden Stimuli die Effekte von LPS nicht vollständig dämpfen.

Um die Oberflächenproteinlevel von LILRB4 zu erforschen, wurden Durchflusszytometrieanalysen genutzt. Wir liefern erstmals Beweise, dass annähernd alle *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia LILRB4 exprimieren. Des Weiteren identifizierten wir TGF $\beta$ R1- Inhibitor und LPS als signifikante Induktoren von LILRB4- Oberflächenrezeptoren in primären Mikroglia über die Behandlungszeiträume von 3, 5 und 7 Tagen. LPS offenbarte sich dabei als signifikant stärkerer Stimulus. Außerdem konnte erstmals belegt werden, dass eine längere Kultivierung ohne Mediumwechsel eine signifikante Induktion der Rezeptordichte von LILRB4 herbeiführt. Wir gehen deshalb davon aus, dass eine längere Kultivierung Mikroglia chronisch aktiviert.

Zusätzlich entdeckten wir auf *in vitro* Mikroglia eine um ein Vielfaches höhere LILRB4- Rezeptordichte als auf *ex vivo* Mikroglia. Diese Ergebnisse bestätigen

die unterschiedliche molekulare Signatur von kultivierten und *ex vivo* Mikroglia und damit auch ihre eingeschränkte Vergleichbarkeit.

Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass neben Mikroglia auch annähernd alle *ex vivo* Peritonealmakrophagen und *ex vivo* Knochenmarksmonozyten LILRB4 exprimieren. Zum ersten Mal wurden diese Zelltypen hinsichtlich ihrer Rezeptordichte verglichen. Wir registrierten die höchste Rezeptorausprägung von LILRB4 in Peritonealmakrophagen und die niedrigste in Mikroglia. Daher sind Mikroglia möglicherweise von den 3 Zelltypen am wenigsten aktiviert.

Hinsichtlich des Isolationszeitpunktes aus P7 und P30 Mäusen und des Geschlechtes konnten keine signifikanten Unterschiede für LILRB4 in Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten festgestellt werden. Dies zeigt, dass sowohl unreife, als auch adulte Mikroglia die gleiche LILRB4- Rezeptorausprägung besitzen und lässt vermuten, dass LILRB4 auf einem konstanten Niveau bleibt, bis es zu einer Aktivierung kommt.

LILRB4 stellt daher keinen Mikroglia- spezifischen und auch keinen Reifemarker dar, ist aber gewebespezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt.

Siglec-H kommt wie LILRB4 zu nahezu 100% auf allen untersuchten Zelltypen vor. Dabei wurde der Rezeptor erstmalig auf Peritonealmakrophagen detektiert. Er ist ebenfalls kein Mikroglia- spezifischer und auch kein Reifemarker. Allerdings ist die Siglec-H Rezeptorausprägung auf den verschiedenen Immunzellen annähernd gleich. Wir beweisen erstmals, dass der TGF $\beta$ R1- Inhibitor ebenfalls einen signifikanten Induktor der Siglec-H Oberflächenrezeptoren darstellt. Auch bei längerer Kultivierung primärer Mikroglia und bei primären Mikroglia i.V. mit *ex vivo* Mikroglia zeigte sich eine signifikant höhere Siglec-H Rezeptordichte. Durch Stimulation mit LPS kam es hingegen nur bei 7-tägiger Behandlung zu einem signifikanten Abfall der Siglec-H Oberflächenrezeptoren. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich im Gegensatz zu LILRB4 verschiedene proinflammatorische Stimuli und Behandlungsspannen unterschiedlich auf das Rezeptorlevel der Zelloberfläche von Siglec-H auswirken.

Zusammenfassend tragen diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Transkription und Translation von LILRB4 in Mikroglia bei, bestätigen LILRB4 als Rezeptor, der auf aktivierten Mikroglia hochreguliert wird und lassen vermuten, dass LILRB4 womöglich auch in Mikroglia an der Limitierung einer inflammatorischen Immunantwort beteiligt ist.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Mikroglia

Mikroglia bilden das Bindeglied zwischen Immunsystem und ZNS, fungieren als residente und angeborene Immuneffektorzellen im Gehirn und machen 10-15% der gesamten Zellpopulation des ZNS aus (Lawson L J et al. 1990). Sie besitzen ein sehr plastisches transkriptomisches und proteomisches Profil, mit dessen Hilfe die Mikroglia ihre Morphologie und Funktion an bestimmte Bedingungen anpassen können. Physiologisch als auch pathologisch werden ihnen vielfältige Aufgaben zugeschrieben. Mikroglia lassen sich in Zuständen der Homöostase und Aktivierung beschreiben, abhängig vom inflammatorischen Milieu im gesunden ZNS, im Alterungsprozess oder bei neurodegenerativen Erkrankungen (Butovsky O, Weiner H L 2018).

### 1.1.1 Historie und Entdeckung

R. Virchow legte den Grundstein ihrer Entdeckung, indem er 1856 erstmals eine Gruppe von Zellen beschrieb, die als unterstützendes Bindeglied zwischen den Neuronen fungieren. Er nannte sie Glia (gr.: Leim), denen auch die Mikroglia angehören (Virchow R 1846). Die Erstbeschreibung der Mikroglia erfolgte durch F. Nissl. Aufgrund ihres bogenförmigen Kerns im aktivierten Zustand, gab er ihnen den Namen „Stäbchenzellen“. Er beschrieb sie als reaktive, bipolare Neuroglia, die ihre Ausläufer in pyramidale Neuronenschichten erweitern und sich an den dendritischen Spitzen der Neuronen ausrichten (Nissl F 1899). Fast zeitgleich entdeckte W. F. Robertson Zellen mit kurzen und wenigen Ausläufern, die in pathologischen Zuständen zur Phagozytose fähig sind. Um sie von Neurogliazellen abzugrenzen und aufgrund des vermuteten Ursprungs im Mesoderm, nannte er sie „Mesoglia“ (Robertson W 1899). 1913 beschrieb R. Cajal die Mikroglia als „el tercer elemento“ (das dritte Element), um sie besser von den Neuronen (erstes Element) und den astrozytischen Neuroglia (zweites Element) zu unterscheiden (Y Cajal R 1913).

Ihren heutigen Namen erhielten die Zellen vom spanischen Neuroanatomen R. Horteaga. Er trug maßgeblich zur Bestimmung von Form, Funktion und Herkunft dieser Zellgattung bei. Mikroglia werden daher gelegentlich auch als Horteaga-Zellen bezeichnet. Ihm gelang die Differenzierung des dritten Elements in die

Oligodendrozyten und Mikroglia. Hortega entdeckte das Potential der Mikroglia, sich in zwei verschiedene Erscheinungsformen zu differenzieren: zum einen in die ruhende und ramifizierte Form im physiologischen und zum anderen in die amöboide Form im embryonalen und im verletzten ZNS.

Genau wie Robertson und Cajal vermutete auch Hortega den Ursprung der Mikroglia im mesodermalen Gewebe. Er zeigte, dass die Mikroglia gegen Ende der Ontogenese und in der frühen postnatalen Phase ins Gehirn einwandern. Des Weiteren stellte er eine große Ähnlichkeit mit der Monozyten-/ Makrophagenlinie fest, da Mikroglia genau wie Makrophagen migratorische und phagozytotische Eigenschaften besitzen (Del Rio-Hortega P 1919, 1932).

### **1.1.2 Ontogenese und Entwicklung**

Zur Herkunft der Mikroglia gab es lange Zeit kontroverse Diskussionen. Heute ist bekannt, dass Mikroglia im Gegensatz zu allen anderen Gliazellen mesodermalen Ursprungs sind, die dem Neuroektoderm entspringen. Amöboide, erythromyeloide Vorläuferzellen aus dem Dottersack wandern ab dem 8. embryonalen Tag (E8.0) in das sich entwickelnde Gehirn. Die Zahl der einwandernden Vorläuferzellen steigt bis kurz vor der Geburt an. Bereits ab E9.5 lassen sich der hämatopoetische Marker CD45 sowie adulte Makrophagen-/ Mikroglia- Marker wie F4/80, CX3CR1 und CD11b nachweisen. Aus den Vorläufern entwickeln sich Mikroglia, 95% davon werden in den ersten beiden postnatalen Wochen gebildet. Im embryonalen und postnatalen Gehirn kommt es dann zur Proliferation der jungen Mikroglia (Alliot F et al. 1999; Ginhoux F et al. 2010; Kierdorf et al. 2013; Schulz C et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass postnatale Mikroglia sich während des gesamten Lebens durch mikrogliale Vorläuferzellen, die das Gehirn pränatal besiedeln, unabhängig von Makrophagen oder zirkulierenden Monozyten *in situ* selbst erneuern (Ajami et al. 2007; Ginhoux F et al. 2010). Humane Mikroglia haben eine Austauschrate von 28% pro Jahr im Median, d.h. im Durchschnitt leben sie 4,2 Jahre (Réu P et al. 2017). Die Entwicklung von Mikroglia ist stark abhängig von den Zytokinen CSF und IL-34, die an CSF-1R binden. IL-34 fördert den Gewebe-spezifischen Signalweg, der für die Differenzierung der Mikroglia im ZNS erforderlich ist (Ginhoux F et al. 2010; Ajami et al. 2007). Die Transkriptionsfaktoren PU.1 und IRF8 sind weitere wichtige Regulatoren myeloider Zellen, u.a. von Makrophagen und Mikroglia (Kierdorf et al. 2013). Dies wurde

in PU.1- defizienten Mäusen und Zebrafischen bestätigt, welche mit einem Verlust der Mikroglia assoziiert sind (Herbomel P et al. 2001).

### **1.1.3 Homöostase**

Postnatal beginnen die amöboiden Mikroglia ihre Form zu ändern: der Zellkörper schrumpft und wird spindelförmig, es bilden sich weit verzweigte „Rami“ (Zellausläufer), die sich über ein Gebiet von bis zu 60 µm erstrecken. Man bezeichnet sie jetzt als ruhende, ramifizierte, homöostatische oder auch M0- Mikroglia. Obwohl als „ruhend“ bezeichnet, sind sie dennoch ständig aktiv. Daher wurde alternativ der Begriff „Überwachungs- Zustand“ (engl.: „surveillance state“) eingeführt, um zu verdeutlichen, dass die Mikroglia nicht ruhen, sondern auch im physiologischen Zustand im ZNS verschiedene Funktionen ausüben.

Ihre Ausläufer tasten die Umgebung fortwährend ca. einmal pro Stunde mit ihren beweglichen, pseudopodienartigen Fortsätzen ab, ohne dabei das fragile neuronale Netzwerk zu stören und können zudem Kontakt zu Nervenzellen, Astrozyten und Blutgefäßen aufnehmen. So können sie die Gewebhomöostase und -integrität überwachen (Biber K et al. 2007; Gomez-Nicola D, Perry V H 2015; Hanisch U K, Kettenmann H 2007; Nimmerjahn A et al. 2005; Wake H et al. 2009). Obwohl Mikroglia mit anderen Zellen in Kontakt treten, berühren sie sich gegenseitig nicht, d.h. sie haben ihr eigenes autonomes Gebiet im ZNS (Perry V H, Teeling J 2013).

Außerdem tragen Mikroglia zur Neurogenese bei. Viele neu gebildete Neurone und Oligodendrozyten unterliegen der durch Mikroglia geförderten Apoptose und werden während der Gehirnentwicklung und -reifung anschließend von ihnen phagozytiert. Das wird als entscheidender Prozess für die Justierung der Anzahl und Lokalisation der Neurone angesehen (Sierra A et al. 2010; Wakselman S et al. 2008). Durch die Phagozytose fehlerhafter und redundanter synaptischer Verbindungen und Axone formen Mikroglia einen neuronalen Kreislauf im sich entwickelnden Gehirn. Dieser Mechanismus des „synaptischen Prunings“ ermöglicht eine Reifung der Synapsen. Rezeptoren wie CXCR1 und Komplementfaktoren wie C1q und C3 (CD11b) spielen dabei eine wichtige Rolle (Bialas A R, Stevens B 2013; Paolicelli R C et al. 2011; Schafer D P, Stevens B 2013). Untersuchungen zeigten, dass der Ligand CX3CL1 in der Zeit der Synapsenreifung hoch ex-

primiert ist und dass in CX3CR1- defizienten Mäusen sich das Pruning verzögerte, u.a. durch eine reduzierte Mikroglia- Zellzahl (Paolicelli R C et al. 2011). Diese nicht- inflammatorische Phagozytose von Gehirnzellen zählt zu den Funktionen des homöostatischen Phänotyps (Fourgeaud L et al. 2016).

Des Weiteren fungieren Mikroglia als trophische Unterstützung für angrenzende Neurone durch die Sekretion neurotrophischer Faktoren wie NGF, BDNF, NT3, FGF oder IGF1, die wiederum Rezeptortyrosinkinasen und die PI3K beeinflussen (Shi S H et al. 2003).

Durch verschiedene Mechanismen werden die Mikroglia in ihrem homöostatischen Zustand gehalten. Neurone unterdrücken z.B. die Mikrogliaaktivierung durch Zell- Zell- Kontakte, dabei bindet CX3CL1 auf Neuronen an CX3CR1 auf den Mikroglia. Mäuse mit fehlendem CX3CR1 zeigten einen hyperaktiven Mikroglia-Phänotyp und einen ausgeprägten Neuronenuntergang (Cardona A E et al. 2006). Auch die mikroglialen Rezeptoren CD45, CD200R oder CD172 hemmen die mikrogliale Zellaktivität durch Interaktion mit den zugehörigen neuronalen Oberflächenrezeptoren CD22, CD200 und CD47 (Mott R T et al. 2004; Ransohoff R M, Cardona A E 2010). In CD200- defizienten Mäusen wurde demonstriert, dass die Mikrogliazellen eine weniger ramifizierte Morphologie zeigten und sich kompensatorisch die CD11b und CD45- Expression erhöhte (Hoek R M et al. 2000).

Mehrere Gene wurden identifiziert, die auf adulten M0- Mikroglia hochreguliert sind und sie in diesem Zustand halten, wie z.B. Siglec-H, die in aktivierten Mikroglia hingegen weniger exprimiert sind (siehe Abb. 1) (Krasemann S et al. 2017; Butovsky et al. 2014; Matcovitch-Natan et al. 2016; Buttgerit A et al. 2016).

Zusätzlich tragen auch Transkriptionsfaktoren zur Aufrechterhaltung des homöostatischen Phänotyps bei. Zusso M et al. (2012) konnten nachweisen, dass RUNX-1 nicht nur eine wichtige Rolle in der Regulierung von Proliferation und Gewebshomöostase postnataler Mikroglia spielt, sondern darüber hinaus den Übergang von amöboiden zu ramifizierten Mikroglia unterstützt. In einer Studie wurde der Transkriptionsfaktor MEF2C beschrieben, der in homöostatischen Mikroglia die inflammatorische Antwort unterdrückt und dessen Expression im Alterungsprozess sinkt (Maticovitch-Natan et al. 2016). Das SALL1- Gen, das an der kortikalen Neurogenese beteiligt ist, hemmt vermutlich reaktive Mikroglia und vermittelt einen homöostatischen Überwachungszustand (Buttgerit A et al. 2016).

### **1.1.4 Aktivierung**

Mikroglia werden durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert, u.a. durch neuronale Schäden und Infektionen unterschiedlicher Ursache mit dem Ziel, die Gewebshomöostase wiederherzustellen. Die Transformation der fein verzweigten, ruhenden Mikroglia in vergrößerte Zellen mit kurzen und dicken Ausläufern bis hin zur amöboiden Form ist ein Kennzeichen der mikroglialen Zellaktivierung. Durch die Aktivierung kommt es zur Veränderung ihres molekularen Profils und ihrer Funktion. Sie setzen vermehrt inflammatorische Zytokine frei, phagozytieren abgestorbene Zellen und versuchen den Gewebeumbau zu unterstützen (Kettenmann H et al. 2011).

Um die verschiedenen Funktionszustände zu charakterisieren, wurden Mikroglia bisher häufig anhand der M1/M2- Klassifikation der Makrophagen unterteilt. Neue Ergebnisse zeigen jedoch, dass diese Einteilung in eine klassische proinflammatorische und alternative antiinflammatorische Aktivierung nicht auf Mikroglia übertragbar ist und sich für das Verständnis der komplexen Vorgänge der Mikrogliaaktivierung mehr hinderlich als förderlich darstellt (Ransohoff R M 2016). Es ist erwiesen, dass Mikroglia unterschiedliche Zustände der Aktivierung einnehmen können, allerdings wurden bis heute noch keine klaren Phänotyp- Identitäten charakterisiert.

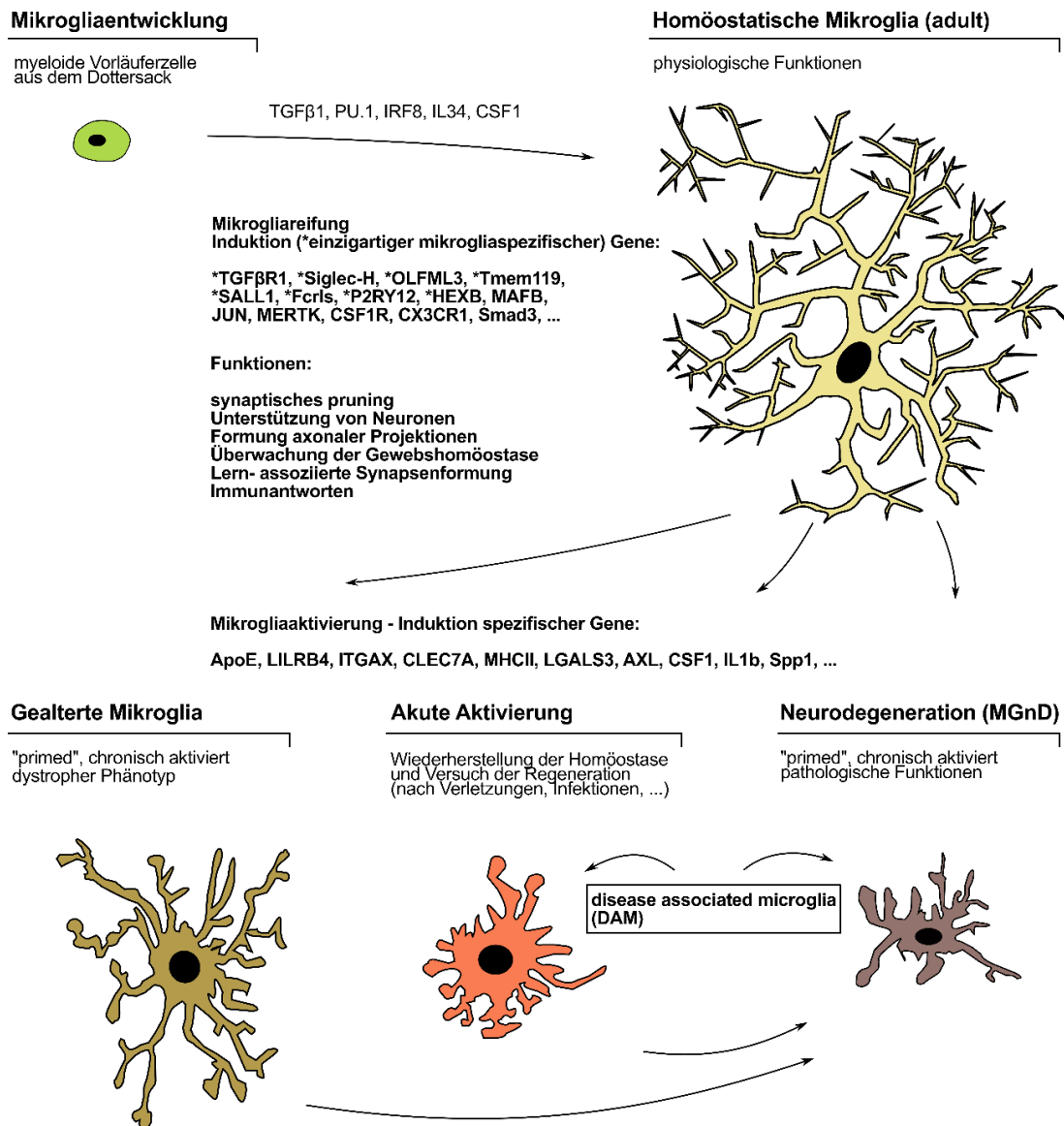
Eine akute, proinflammatorische Aktivierung der Mikroglia kann durch unterschiedliche Stimuli wie LPS aus gramnegativen Bakterien, ausgelöst werden. In gealterten Mikroglia und bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieb man den Zustand der „primed“ Mikroglia. Dieser hypersensitive Phänotyp entsteht durch eine chronische Aktivierung. Man kann diesen Phänotyp allerdings nicht eindeutig einer pro- oder antiinflammatorischen Polarisierung zuordnen, da keine übermäßigen Mengen an Zytokinen produziert werden. Erst durch einen proinflammatorischen Stimulus wird vermutlich ein hyperreaktiver Zustand ausgelöst, der durch die vermehrte Produktion von Zytokinen und anderen Molekülen zur Neurotoxizität beiträgt. Die Signalwege, durch die Mikroglia „geprimed“ werden, sind allerdings immer noch unklar (Holtman I R et al. 2015). Zwei weitere Begriffe zur Beschreibung aktivierter Mikroglia-Phänotypen wurden kürzlich vorgeschlagen: die „disease-associated microglia“, kurz DAM (Keren-Shaul H et al. 2017), und als eine Art Untergruppe die „microglia of neurodegenerative disease“, kurz MGnD (Krasemann S et al. 2017). DAM beschreiben zum

einen aktivierte Mikroglia, die versuchen, die Gewebshomöostase durch Regeneration der Neurone wiederherzustellen und zum anderen pathologische Mikroglia wie die MGnD, die zur Neurodegeneration beitragen.

Mehrere Signaturgene und Chemokine wurden beschrieben, die in aktivierten Mikroglia induziert, aber während der Homöostase runterreguliert sind (siehe Abb. 1). Als wichtiges Beispiel wurde vor Kurzem der ApoE-TREM2- Signalweg von Krasemann S et al. untersucht. LILRB4 wurde ebenfalls als DAM- assoziierter Rezeptor beschrieben, der auf aktivierten Mikroglia hochreguliert wird (Voet S et al. 2018).

Als Hauptimmunzellen des ZNS exprimieren Mikroglia viele Rezeptoren, die exogene Pathogen- assoziierte molekulare Muster erkennen (PAMPs). Beispiele dieser Muster- erkennenden Rezeptoren (PRRs) sind die auf und in Mikroglia lokalisierten Toll- artige Rezeptoren (TLRs) und die zytoplasmatischen NOD- artigen Rezeptoren (NLRs) (Blasius A L, Beutler B 2010; Kawai T, Akira S 2011). Mikroglia exprimieren alle TLRs und gelten als wichtigste Sensoren der PAMPs im ZNS (Olson J K, Miller S D 2004). TLRs und NLRs können zusätzlich auch endogene Schadens- assoziierte molekulare Muster (DAMPs) erkennen. Dabei handelt es sich um metabolische Produkte und Moleküle toter Zellen, die z.B. durch neuronale Verletzungen freigesetzt werden. Eine Aktivierung der PRRs, z.B. durch einen pathogenen Erreger, bewirkt ebenfalls eine Mikrogliaaktivierung. Durch eine anhaltende Aktivierung kann es allerdings zur pathologischen Inflammation und Neurodegeneration im ZNS kommen (Saijo K, Glass C K 2011).





### Abb. 1: Mögliche Darstellung der Mikroglia-Phänotypen

Dargestellt wurden die verschiedenen Entwicklungsstufen und Erscheinungsformen der Mikroglia in einem vereinfachten Modell. Überlappungen zwischen den einzelnen Phänotypen sind möglich. Es wurde eine Auswahl an Rezeptoren abgebildet, die besonders auf homöostatischen oder auf aktivierten Mikroglia exprimiert sind (komplette Auflistung siehe z.B. Butovsky et al. (2014) oder Krasemann S et al. (2017)). Rezeptoren, die im ZNS ausschließlich auf Mikroglia nachzuweisen sind und daher gut als Marker genutzt werden können, wurden mit \* markiert. Nicht dargestellt wurden primäre Mikroglia und mikrogliale Zelllinien, die auch ihre eigene molekulare Signatur besitzen und von den hier dargestellten Phänotypen abzugrenzen sind.

#### 1.1.5 TGFβ

TGFβ gehört zu einer Familie multifunktionaler Zytokine, die allgemein an Prozessen wie Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Tod von Zellen beteiligt sind (Kawabata M 1998). TGFβ1 zählt zu den wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen für Makrophagen und Mikroglia und gilt als entscheidende Isoform für das angeborene und adaptive Immunsystem (Travis M A, Sheppard D 2014; Kelly A et al. 2017). Hauptsächlich wird TGFβ von Astrozyten

gebildet, kann aber auch autokrin von Mikroglia sezerniert werden (Kiefer et al. 1995). Freigesetztes TGF $\beta$  bindet den homodimeren TGF $\beta$ R2, ein Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor. Dieser bildet mit TGF $\beta$ R1 einen tetrameren Komplex. TGF $\beta$ R1 ist dadurch phosphoryliert und aktiviert. Über SMAD-Proteine oder nicht-SMAD-abhängige Signalwege kommt es zur intrazellulären Signalweiterleitung und Regulierung der Transkription (Massagué J, Wotton D 2000).

Experimente mit TGF $\beta$ 1<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen zeigten, dass es postnatal zu einem Wasting-Syndrom mit inflammatorischen Zellinfiltrationen kommt (Shull M M et al. 1992; Kulkarni A B, Karlsson S 1993). Außerdem kam es während der embryonalen Entwicklung entweder zum Tod oder neonatal zu Neurodegeneration, einem verminderten Überleben von Neuronen, einem Verlust von Mikroglia und einer Infiltration von Monozyten ins ZNS (Brionne T C et al. 2003; Butovsky et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$  die Neurogenese (Dias J M et al. 2014), Gliogenese (Stipursky J et al. 2014), Myelination (Palazuelos J et al. 2014) und das synaptische Pruning (Bialas A R, Stevens B 2013) reguliert. TGF $\beta$  ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung homöostatischer Mikroglia von entscheidender Bedeutung, was durch das Fehlen von Mikroglia in TGF $\beta$ 1-defizienten Mäusen bestätigt werden konnte (Butovsky et al. 2014). In vitro-Experimente zeigten, dass TGF $\beta$ 1-defiziente Mikroglia ein kürzeres Überleben aufweisen und durch die Expression von proinflammatorischen Aktivitätsmarkern in einen aktivierten Zustand versetzt werden (Spittau et al. 2013). In dem Zusammenhang wurde demonstriert, dass in mit M-CSF und TGF $\beta$  kultivierten Mikroglia das Signal proinflammatorischer Gene inhibiert wird (Butovsky et al. 2014). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass TGF $\beta$ 1 eine wichtige Rolle spielt, die Mikroglia im M0-Überwachungszustand zu halten, um so eine ungewollte Aktivierung mit möglichen neuronalen Schäden zu verhindern (Spittau et al. 2013). Z.B. reduziert TGF $\beta$ 1 die Aktivierung von Mikroglia und BV2-Zellen durch LPS, da man eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine zeigen konnte (Kim S S et al. 2004).

### **1.1.6 LPS**

Lipopolysaccharide (LPS) sind in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien zu finden und bestehen aus Fett- und Zuckerbestandteilen (Rietschel E T, Brade H 1992). Beim Zerfall der Bakterien wird LPS im Blut vom Serumprotein

LPS- bindendes- Protein (LBP) erkannt und gebunden. Dieser Komplex bindet wiederum an den Membranrezeptor CD14. Für eine intrazelluläre Signaltransduktion geht CD14 eine funktionelle Verbindung mit dem TLR4 auf der Mikroglia-membran ein. Über eine Signalkaskade kommt es zur Aktivierung der MAP- Kinasen und NF- $\kappa$ B. Die Transkription bestimmter Gene wird hochreguliert und als Folge kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.

LPS kann über die zirkumventrikulären Organe die Blut- Hirn- Schranke passieren und so an Mikroglia binden, die dadurch in einen aktivierten Phänotyp versetzt werden. Dabei stellt LPS einen sehr starken Reiz der akuten Aktivierung dar. Durch die Sekretion proinflammatorischen Zytokine wirkt LPS potentiell neurotoxisch (Rivest S et al. 2000). Daher wird LPS sehr oft experimentell für eine Aktivierung von Mikrogliazellen verwendet (Nakamura Y 2002).

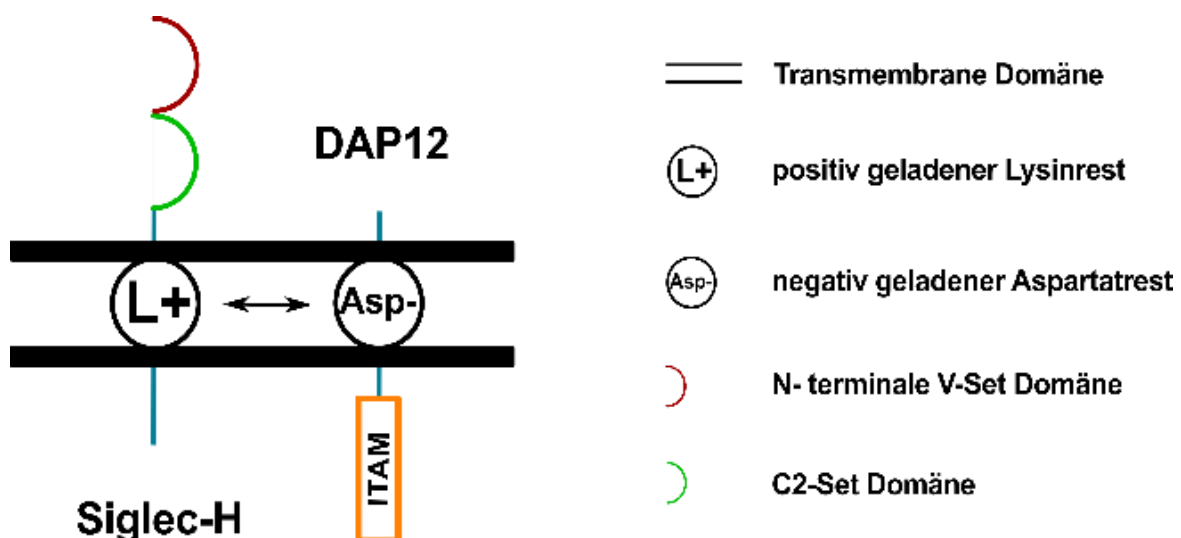
### **1.1.7 Siglec-H**

Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins, kurz Siglecs, sind vorwiegend auf Leukozyten exprimiert und werden charakteristisch auf bestimmten Zelltypen exprimiert (Zhang J et al. 2006). Siglec-H ist ein Nagetier- spezifisches *Singlepass*- Transmembranprotein, das zur CD33- verwandten Siglec- Familie gehört (Macauley M S et al. 2014). Es wurde als spezifischer Marker für Mikroglia im ZNS und für plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) beschrieben, kommt aber auch auf Milz- und Lymphknotenmakrophagen, sowie auf dendritischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark vor (Blasius A L et al. 2006; Zhang J et al. 2006; Schlitzer A et al. 2015). Im ZNS kann Siglec-H genutzt werden, um Mikroglia von ZNS- assoziierten Makrophagen und ZNS- infiltrierenden Monozyten zu unterscheiden, welche diesen Rezeptor (bis auf wenige Ausnahmen) nicht exprimieren. Siglec-H kommt im Gegensatz zu anderen Mikroglia- spezifischen Markern auf mikroglialen Vorläufern und auf reifen Mikroglia vor, sowohl im homöostatischen, als auch im aktivierten Zustand (Konishi et al. 2017).

Siglec-H gilt als Oberflächenrezeptor, der internalisiert werden kann und dessen Liganden bisher noch nicht identifiziert wurden. Er besitzt die Fähigkeit zur Phagozytose, Endozytose und Antigenpräsentation (Blasius A L et al. 2006; Kopatz et al. 2013). Blasius A L et al. vermuteten eine antiinflammatorische Funktion, da Siglec-H die IFN1- Produktion in pDCs hemmt. Darüber hinaus konnten Takagi H et al. (2011) und Schmitt H et al. (2016) zeigen, dass in Siglec-H defizienten

Mäusen die proinflammatorische IFN1- Produktion durch eine übermäßige Aktivierung des NF- $\kappa$ B- Signalwegs in pDCs induziert wird und dass es bei Siglec-H- *Knockout*- Mäusen zu Autoimmunreaktionen kommt. Dies lässt vermuten, dass Siglec-H dazu beiträgt, die Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Es wurde herausgefunden, dass ein Siglec-H- *Knockdown* die proinflammatorische Zytokinproduktion In Mikroglia fördert, ohne die mikrogliale Proliferation zu beeinflussen. Siglec-H gilt daher als Suppressor proinflammatorischer Immunantworten in aktivierten Mikroglia (Konishi et al. 2017). Butovsky et al. (2014) konnten nachweisen, dass in TGF $\beta$ 1R<sup>-/-</sup> Mäusen die Siglec-H Expression stark vermindert ist.

Ebenfalls charakteristisch für Siglecs ist ihre Ig- artige extrazelluläre Domäne und die Signaltransduktion über ein ITIM oder ITIM- ähnliches Motiv (siehe 1.2.1 und 1.2.2). Siglec-H stellt einen Sonderfall dar, da es kein Tyrosin- basiertes Signalmotiv besitzt (Zhang J et al. 2006) und vermittelt stattdessen sein inhibitorisches Signal über das Adapterprotein DAP12, das wiederum an ein ITAM gekoppelt ist (siehe Abb. 2) (Blasius A L et al. 2006). Paradoxerweise vermittelt DAP12 auch proinflammatorische Immunantworten, z.B. über den TREM2- ApoE- Signalweg. Siglec-H und TREM2 scheinen daher als entgegengesetzte Regulatoren zwischen Homöostase und Mikrogliaaktivierung zu fungieren (Konishi H, Kiyama H 2018).



**Abb. 2: Maus- spezifisches Singlepass- Transmembranprotein Siglec-H**

Siglec-H besitzt 2 extrazelluläre Ig- Domänen und einen positiv geladenen transmembranen Lysinrest. Über die entgegengesetzt geladenen Aminosäurereste ist Siglec-H an DAP12 gekoppelt, welches das Signal über ein ITAM weiterleitet.

## 1.2 LILRB4

### **1.2.1 Die Homöostase des Immunsystems durch ITAMs und ITIMs**

Für das Immunsystem ist eine Homöostase zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen wichtig, um die Stärke ihrer Immunantwort feinabzustimmen. Häufig werden diese Signale durch das Zusammenspiel von Immun- Rezeptor Tyrosin- basierten inhibitorischen (Vivier E, Daëron M 1997) und aktivierenden Motiven (Cambier J C 1995a, 1995b), kurz ITIMs und ITAMs, vermittelt. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von ITAMs kann inflammatorische Immunreaktionen begünstigen, wodurch z.B. autoimmunologische Erkrankungen ausgelöst werden (Clynes R et al. 1999; O'Keefe T L et al. 1999; Bolland S, Ravetch J V 2000; Zhou J S et al. 2005). Auf der anderen Seite kann sie sich hingegen negativ bei verschiedenen Krebserkrankungen äußern (Zhang F et al. 2015; Kang et al. 2016).

Man vermutet, dass inhibitorischen Rezeptoren mit ITIMs nur im Zusammenspiel mit ITAM- ass. aktivierenden Rezeptoren ihre Funktion entfalten können (Billadeau D D, Leibson P J 2002; Isakov N 1997). Es ist anzunehmen, dass die Intensität und Dauer, als auch die Schwelle zur Auslösung einer Immunantwort maßgeblich durch das Verhältnis von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche bestimmt wird (Ravetch J V, Lanier L L 2000).

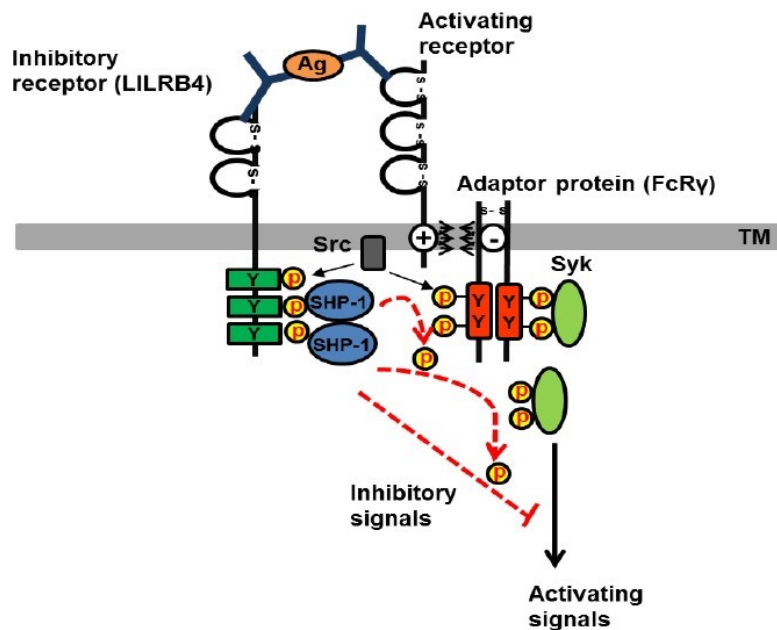
Mikroglia exprimieren, als wichtigste Immunzellen des ZNS, verschiedene Rezeptoren, welche die ITAM- und ITIM- Signalkaskade auslösen. ITAM- ass. Rezeptoren begünstigen die Mikrogliaaktivierung, Phagozytose und Migration. ITIM- ass. Rezeptoren wie die Siglecs haben eine gegenregulatorische Funktion und können neuroinflammatorische Prozesse abmildern (Linnartz B, Neumann H 2013). Eine Dysbalance kann im ZNS durch chronische Inflammation zu Neurodegeneration führen (Linnartz et al. 2010).

### **1.2.2 Signaltransduktion der ITAMs und ITIMs**

Die leukocyte immunoglobulin-like receptors, kurz LILRs, zu denen auch LILRB4 zählt, sind eine Gruppe angeborener Immunrezeptoren myeloider und lymphoider Zellen, die ihr inhibitorisches oder aktivierendes Signal über ITIMs oder ITAMs vermitteln (van der Touw W et al. 2017).

Durch Bindung eines Liganden an ITAM- ass. Rezeptoren, wie die LILRAs, werden die Src- Familie- Kinasen aktiviert, welche die Tyrosinreste der ITA- Motive phosphorylieren. Dadurch kommt es zur Rekrutierung der Milz- Tyrosin- Kinase, kurz Syk, in myeloiden Zellen und des  $\zeta$ - assoziierten Proteins von 70 kDa, kurz Zap-70, in Lymphozyten (Fütterer K et al. 1998). Syk und Zap-70 können dann eine Reihe nachfolgender Proteine durch Phosphorylierung aktivieren, wie z.B. die Phosphatidylinositol 3- Kinase (PI3K) oder das SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76), das wiederum die Mitogen- aktivierte Protein-Kinase (MAPK) und die Phosphoinositid- Phospholipase  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) aktivieren kann (Sada K et al. 2001; Samelson L E 2002).

Inhibitorische Rezeptoren mit ITI- Motiven, wie LILRB4, benötigen eine Co- Aktivierung von ITAM- assoziierten Rezeptoren, da sie zur Rekrutierung von Phosphatasen (wie SHP und SHIP) aktivierte Kinasen als Substrat benötigen. Nach der Ligandenbindung und der Co- Aktivierung werden auch bei inhibitorischen Rezeptoren die Src- Familie- Kinasen aktiviert, welche die Tyrosinreste der ITI- Motive phosphorylieren (Billadeau D D, Leibson P J 2002). Daraufhin docken Src homologon 2 domain containing phosphatases (SHP1 und SHP2) und SH2- containing inositol polyphosphate 5-phosphatases (SHIPs) an und werden aktiviert (Ravetch J V, Bolland S 2001; Kang et al. 2016). SHIP hydrolysiert Phosphatidylinositol (3,4,5) -triphosphat (PIP3) zu Phosphatidylinositol (3,4) - diphosphat (PIP2). Auf diese Weise wird eine Aktivierung der PLC $\gamma$  verhindert, es kann kein Calcium freigesetzt werden und folglich wird die Zellaktivierung gehemmt (Damen J E et al. 2001). SHPs und SHIPs dephosphorylieren Tyrosinreste verschiedener Signalmoleküle, wodurch die komplette Aktivierungskaskade gehemmt wird. Dazu zählen ITAMs, Src- Kinasen, Zap-70, Syk, PLC $\gamma$  und PI3K. Dementsprechend kommt es durch die Aktivierung von ITIM- ass. Phosphatasen zu einer Hemmung der Immunzellaktivierung (van der Touw W et al. 2017).



**Abb. 3: LILRB4- vermittelte Hemmung der Monozytenaktivierung (Park M 2016)**

Ein Antigen vernetzt einen ITIM- assoziierten inhibitorischen Rezeptor (LILRB4) und einen ITAM- assoziierten aktivierenden Rezeptor (z.B. FcγRI) und bewirkt so deren gleichzeitige Aktivierung. Der aktivierende Rezeptor vermittelt sein Signal über ein Adaptermolekül (wie FcRγ oder DAP12). ITIMs und ITAMs werden durch Src- Familie Kinasen phosphoryliert (p) und damit aktiviert. Die phosphorylierten ITAMs vermitteln ein Aktivierungssignal durch Phosphorylierung der Proteinkinase Syk. Phosphorylierte ITIMs rekrutieren hingegen die Tyrosinphosphatase SHP-1, die das Aktivierungssignal durch Dephosphorylierung der Proteinkinase Syk hemmt.

### 1.2.3. Nomenklatur der LILRs

Zur einheitlichen Benennung der Rezeptorfamilie einigte man sich auf die offizielle Bezeichnung leukocyte immunoglobulin-like receptors, kurz LILRs. Alternativ kommen in der Literatur gelegentlich noch die Bezeichnungen immunoglobulinlike transcripts (ILTs), myeloid inhibitory receptors (MIRs) und CD85a-m vor (Cosman et al. 1997; Colonna M et al. 1997; Cella M et al. 1997; Colonna M et al. 1999).

Man unterteilt die LILRs in drei Hauptgruppen, basierend auf ihrer Struktur und Funktion (Martin A M et al. 2002): die aktivierenden LILRAs, die inhibitorischen LILRBs und die löslichen LILRs (Brown D et al. 2004). Bisher sind 13 verschiedene LILR- Gene bekannt: 6 aktivierende, 5 inhibitorische und 2 Pseudo- Gene (LILRP1 und LILRP2).

LILRB4 wurde erstmal von Arm J P et al. (1997) und Borges L et al. (1997) beschrieben. Sein murines Ortholog nennt sich gp49B1. Allerdings beschränkte man sich zur Vereinfachung in dieser Dissertation meist auf die Bezeichnung LILRB4.

### **1.2.4 Struktur und Liganden von LILRB4**

Inhibitorische LILRs besitzen 2- 4 extrazelluläre Ig- Domänen, eine transmembrane Domäne und 2- 4 zytoplasmatische ITIMs als lange zytosolische Domäne (s. Abb. 3 und 4).

Die Bedeutung der unterschiedlichen Anzahl der zytoplasmatischen ITIMs ist bislang noch unklar. Möglicherweise ist der Typ und die Anzahl der Phosphatasen, die rekrutiert werden, abhängig von der Anzahl der ITIMs.

LILRB4 besitzt 3 zytoplasmatische ITIMs. Das murine Ortholog gp49B1 hat im Gegensatz zum humanen LILRB4 nur 2 ITIMs. Außerdem hat LILRB4 2 SH3-Bindungsmotive zwischen den drei ITIMs und eine Prolin- reiche Region in seiner intrazellulären Domäne.

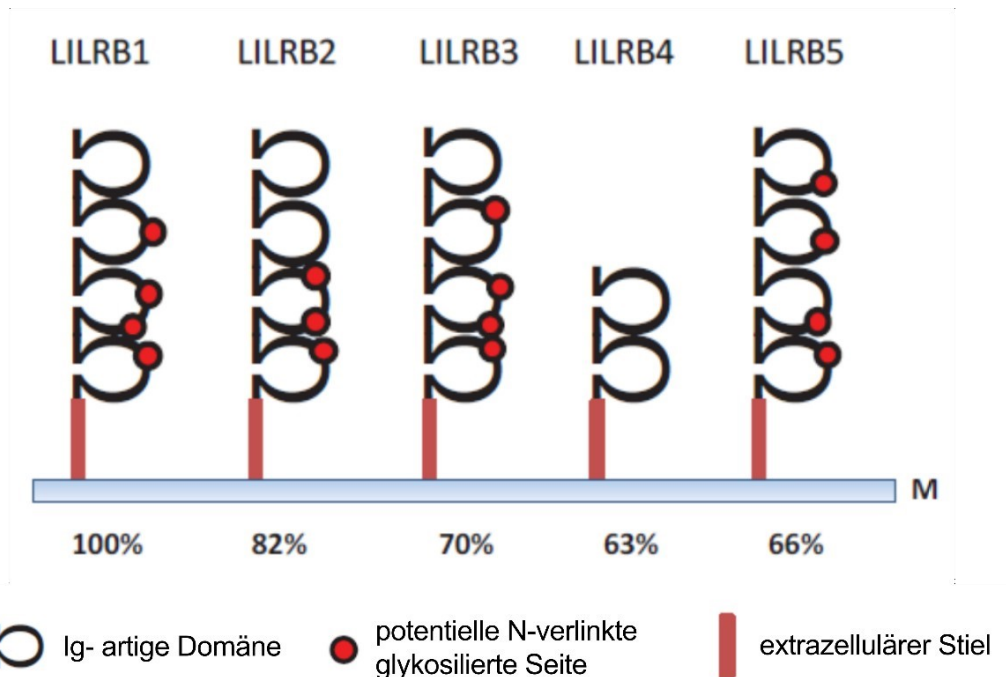
LILRB4 ist das einzige inhibitorische Mitglied mit nur 2 extrazellulären C2- Typ Ig- Domänen, während alle anderen Rezeptoren der LILRBs 4 extrazelluläre Domänen besitzen. Eine Besonderheit ist die hohe Homologie der extrazellulären Domäne der LILRs mit 63 - 84 %. Das kann eine Ursache dafür sein, dass LILRs sich Liganden zur Aktivierung teilen können, was einen synergistischen Effekt zur Folge hat (Colonna M et al. 1998; Colonna M et al. 1999; Fanger N A et al. 1999; Borges L, Cosman D 2000). Die extrazelluläre Domäne von LILRB4 hat vergleichsweise die niedrigste Homologie unter den LILRBs zu LILRB1 (der LILR, der am besten auf Liganden untersucht wurde) (Borges L, Cosman D 2000). Die Anzahl der extrazellulären Ig- Domänen beeinflusst die Affinität und Spezifität für Liganden (Hulett M D et al. 1991; Allen J M, Seed B 1989). Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass LILRB4 einzigartige Liganden binden kann. Jedoch wurden bisher für LILRB4 noch keine Liganden identifiziert (Pitcher L A, van Oers N S C 2003). Eine MHC- Bindung ist für LILRB4 aufgrund der Konformation und Elektrostatik nicht möglich (Cheng et al. 2011). Für gp49B1 konnte Integrin  $\alpha\beta 3$  als einziger Ligand beschrieben werden (Castells M C et al. 2001; Daheshia M et al. 2001).

Von einigen LILRs (LILRA1,2,5 und LILRB1,4) können lösliche Rezeptorisoformen durch alternatives mRNA- Splicing hergestellt werden (Borges et al. 2003; Suci-Foca et al. 2007; Des Jones et al. 2009).

Die meisten LILRs besitzen mindestens 2 N- terminale Glykosylierungen in ihrer extrazellulären Domäne. Bei der Glykosylierung werden Zuckermoleküle an Proteine durch eine posttranslationale Modifikation angeheftet (Apweiler R 1999).



Der Sinn der Glykosilierung besteht in einer unspezifischen Schutzfunktion vor Proteasen und gegenseitigen Proteininteraktionen. Auch die Bindungsaffinität für Liganden wird durch die Modifikation beeinflusst (Isaji T et al. 2006; Zhao Y et al. 2008; Takahashi M et al. 2009). Die einzige Ausnahme ist LILRB4, der keine Glykosilierung aufweist.



**Abb. 4: Die extrazelluläre Domäne der LILRB-Rezeptorfamilie (Lu H K 2011)**

LILRs besitzen 2-4 Ig-artige, extrazelluläre Domänen. Die meisten LILRs besitzen mehrere glykosylierte Seiten, mit Ausnahme von LILRB4. Die Prozentanteile entsprechen der Aminosäure-Übereinstimmung der extrazellulären Domäne, verglichen mit LILRB1.

### 1.2.5 Genetische Polymorphismen

Allgemein können Rezeptorpolymorphismen die Expression, Funktion und Bindung gegenüber Liganden beeinflussen (Yawata M et al. 2006). Bei LILRB4 wurden bisher 15 SNPs identifiziert, d.h. es gibt 15 einzigartige Varianten des Rezeptors. Damit ist er wahrscheinlich der am meisten polymorphe Rezeptor seiner Familie (Chang C C et al. 2008). Die Bedeutung der Vielfältigkeit von LILRB4 ist allerdings noch ungeklärt. Man vermutet, dass bestimmte LILR-Polymorphismen eine immunologische Dysbalance durch funktionelle Defekte des Rezeptors evolvieren können und so die Anfälligkeit für Krankheiten provozieren. Ein Zusammenhang zu autoimmunologischen Erkrankungen konnte bereits gezeigt werden (Koch S et al. 2005; Mamegano K et al. 2008; Ordóñez D et al. 2009).

### **1.2.6 Expression von LILRB4**

LILRB4 ist auf dendritischen Zellen, Monozyten, von Monozyten abgeleiteten Osteoklasten, Makrophagen (Borges L et al. 1997; Cella M et al. 1997), Mikroglia (Kamphuis W et al. 2016; Zöller T et al. 2018), Endothelzellen (Kim-Schulze S et al. 2006) und Mastzellen (Tedla N et al. 2008) exprimiert. Auf B- Zellen ist LILRB4 bei Leukämiepatienten exprimiert (Colovai A I et al. 2007). Gp49B1 wurde zusätzlich auf Neutrophilen (Zhou J S et al. 2003), NK- Zellen (Wang L L et al. 2000) und T- Zellen (Gu X et al. 2003) identifiziert.

### **1.2.7 Funktion von LILRB4**

Klinisch zeigte sich, dass LILRB4 immunsuppressiv wirkt und eine Immuntoleranz herbeiführt. Das Expressions- Level von LILRB4 ist mit Tumor-, Autoimmun- und inflammatorischen Erkrankungen assoziiert.

LILRB4 ist einerseits bei Pankreaskarzinom- Patienten mit schlechter Prognose (Cortesini R 2007), auf B- Zellen bei Patienten mit CLL (Colovai A I et al. 2007) und bei Patienten mit monozytärer AML hochreguliert (Deng et al. 2018). Bei den Patienten mit AML konnte nachgewiesen werden, dass LILRB4 eine Suppression der T- Zellen bewirkt und die Infiltration der Tumorzellen fördert, da sie vom Immunsystem weniger angegriffen werden (Deng et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass Probanden mit Melanom, kolorektalem- oder Pankreaskarzinom im Vgl. zur Kontrollgruppe signifikant häufiger löslichen LILRB4 im Serum aufwiesen (40% im Vgl. zu 6%) (Suciu-Foca et al. 2007). LILRB4 ist auch auf myeloiden Suppressorzellen bei Lungenkrebs- Patienten exprimiert. Dabei war eine erhöhte LILRB4- Expression mit einem schlechtem Outcome assoziiert (de Goeje P L et al. 2015).

Auf der anderen Seite haben Studien zu Organtransplantationen gezeigt, dass Herztransplantatempfänger ohne eine Allograft- Ablehnung hochregulierten LILRB4 auf dendritischen und endothelialen Zellen aufwiesen (Chang C C et al. 2002; Manavalan J S et al. 2004). Löslicher LILRB4 ist in der Lage T- Zell- vermittelte Zytotoxizität und Proliferation zu hemmen und die Differenzierung regulatorischer T- Zellen zu fördern (Vlad G et al. 2006). Außerdem konnte durch eine Behandlung mit löslichem LILRB4 eine Allograft- Transplantatablenkung pankreatischer Inselzellen verhindert werden (Vlad G et al. 2008).

Über eine SHP-1 Rekrutierung hemmt LILRB4 die FcεRI (IgE)-vermittelte Mastzellaktivierung. LILRB4<sup>-/-</sup> defiziente Mäuse entwickelten häufiger und schwerer Mastzell-abhängige anaphylaktische Inflammationen. Weiterhin kam es, durch die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten mit LPS, in den LILRB4<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen zu deutlich stärkeren pathologisch inflammatorischen Antworten. Die schnelle Hochregulierung von LILRB4 in LILRB4<sup>+/+</sup> Mäusen lässt eine gegenregulatorische Funktion vermuten, um pathologische Inflammationen zu begrenzen (Katz H R 2007).

Gu X et al. (2003) konnten darlegen, dass die IFNγ-Produktion in T- und NK-Zellen in LILRB4<sup>-/-</sup> defiziente Mäusen im Vgl. zu LILRB4<sup>+/+</sup> Mäusen erhöht ist.

Des Weiteren wurde eine erhöhte LILRB4-Expression in humanen und murinen atherosklerotischen Plaque-ass. Makrophagen beschrieben. In LILRB4<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen konnten *in vivo* und *in vitro* aufgrund einer verringerten SHP-1 Phosphorylierung proinflammatorische Effekte durch ein erhöhtes NF-κB-Signal nachgewiesen werden. Die LILRB4<sup>-/-</sup> Defizienz beschleunigte atherosklerotische Läsionen und die Plaqueinstabilität. (Jiang Z et al. 2017).

Zhou J S et al. (2005) zeigten, dass LILRB4 auf Neutrophilen Granulozyten nach LPS-Injektion sehr schnell hochreguliert wurde. Durch die LILRB4-ass. Supprimierung von Schlüsselzytokinen und -chemokinen wurde die pathologische Inflammation bei RA und Synovitis runterreguliert. In den Versuchen stellte man eine Aggravation der klinischen Symptome (Gelenkschwellung) in LILRB4<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen und ein Maximum der Symptome nach 7-tägiger LPS-Behandlung fest.

Man stellte in RT-PCR Analysen fest, dass LILRB4 auf Makrophagen und dendritischen Zellen durch eine Behandlung mit *Salmonella typhimurium* bzw. mit LPS hochreguliert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass LILRB4 eine wichtige Rolle zur Limitierung der Immunantwort während Infektionen spielt. Dies erfolgt z.B. durch eine Hochregulierung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und durch eine Runterregulierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 *in vitro* (Brown D P et al. 2009).

Auf dendritischen und endothelialen Zellen wurde wiederum gezeigt, dass IL-10 LILRB4 hochregulieren kann (Gleissner C A et al. 2007). Neben IL-10, können auch Kortikosteroide, Vitamin D3 und Aspirin LILRB4 hochregulieren (Rea D et al. 2000; Penna G et al. 2005; Buckland M et al. 2006), Rapamycin (Fedoric B

Krishnan R 2008) und TNF $\alpha$  (Ju X S et al. 2004) können hingegen LILRB4 runterregulieren.

LILRB4 kann über den ITIM- ass. Signalweg die Calcium- Mobilisierung und so die Zellaktivierung von Monozyten hemmen, nachdem sie durch CD11b, HLA-DR und Fc $\gamma$ R3 stimuliert wurden. Es wurde belegt, dass LILRB4 auch die APC-Aktivierung negativ reguliert und darüber hinaus der Antigenaufnahme und -präsentation dient (Cella M et al. 1997). Des Weiteren kann LILRB4 die Fc $\gamma$ RI (CD64)- vermittelte Monozytenaktivierung hemmen. Fc $\gamma$ RI vermittelt u.a. die Zellaktivierung, Phagozytose und den oxidativen Burst. In dem Zusammenhang wurde LILRB4 als potenter Inhibitor proinflammatorischer Zytokine, wie TNF $\alpha$ , beschrieben (Lu H K et al. 2009).

### **1.2.8 LILRB4- Expression auf Mikroglia**

Kamphuis W et al. (2016) beschrieben die Expression von LILRB4 auf CD11c<sup>+</sup> Mikroglia. Anhand eines Mausmodells für Alzheimer Demenz fanden sie heraus, dass diese aktivierten Mikroglia durch die Aufnahme und den Abbau von A $\beta$  vermutlich der Plaquebildung entgegenwirken können. Die u.a. erhöhte Expression von LILRB4 ließ eine immununterdrückende/ immuntolerierende Wirkung der CD11c<sup>+</sup> Mikroglia vermuten. Auch Krasemann S et al. (2017) konnten in Mausmodellen für ALS, MS und AD eine erhöhte Genexpression von LILRB4 in Mikroglia nachweisen. In gealterten kortikalen, CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> Mikroglia (24 Monate alte Mäuse im Vgl. zu 6 Monate alten Mäusen) zeigte sich ebenfalls eine Hochregulierung von Genen, die mit der Immunfunktion zusammenhängen, einschließlich LILRB4 (Zöller T et al. 2018). Auf Makrophagen wurde bereits eine erhöhte LILRB4- Expression durch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B- Signalwegs festgestellt (Jiang Z et al. 2017). Auch das NF- $\kappa$ B Regulatorprotein A20 spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Mikrogliaaktivierung und Neuroinflammation, indem es die NF- $\kappa$ B- Aktivierung hemmt. Voet S et al. (2018) konnten in A20- Knockout Mäusen eine hochregulierte Genexpression von LILRB4 nachweisen.

## 2 ZIELSTELLUNG

Mikroglia gelten als Hauptimmunzellen des ZNS. Sie werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst, welche die Mikroglia in unterschiedliche Funktionszustände der Homöostase und Aktivierung versetzen. TGF $\beta$  zählt zu den wichtigsten Homöostase- Faktoren, während LPS einen klassischen Faktor der akuten Aktivierung darstellt.

LILRB4 trägt durch seine ITIM- assoziierte Signaltransduktion zur Homöostase im peripheren Immunsystem bei. Er wurde in diesem Zusammenhang als immunsuppressiver Rezeptor beschrieben, der durch die Limitierung überschießender, inflammatorischer Immunantworten eine immunologische Toleranz vermittelt. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die LILRB4- Transkription in gealterten, neurodegenerativen und durch LPS aktivierten Mikroglia induziert wird, sind seine Expression und Funktion in Mikroglia noch weitgehend unerforscht.

Die Hauptziele und -fragen dieser Dissertation sind daher im Folgenden zusammengefasst:

**1) Untersuchung der LILRB4- Expression von BV2- Zellen und der LILRB4- Rezeptorlevel primärer Mikroglia in unterschiedlichen Aktivierungszuständen.**

Mithilfe der RT- qPCR wurde die LILRB4- Expression von BV2- Zellen untersucht, die mit TGF $\beta$ , LPS und beiden Stimuli zeitgleich über Behandlungszeiträume von 6, 12 und 24 Stunden behandelt wurden. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurden mit TGF $\beta$ - Inhibitor und mit LPS behandelte primäre Mikroglia über die Behandlungszeiträume von 3, 5 und 7 Tagen untersucht. Dabei wurde ermittelt, welcher prozentuale Anteil der Mikroglia LILRB4- positiv ist und anschließend wurde ihre Rezeptorausprägung auf der Zelloberfläche verglichen.

**2) Wie unterscheiden sich die LILRB4- Rezeptorlevel bei *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia?**

In der Zellkultur angezüchtete Mikroglia wurden mit frisch isolierten P7- und P30- Mikroglia mithilfe der Durchflusszytometrie verglichen. Dabei wurde der prozentuale Anteil LILRB4- positiver Zellen und ihre LILRB4- Rezeptormenge auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit des Isolationszeitpunktes bestimmt.

**3) Wie unterscheiden sich die LILRB4- Rezeptorlevel von *ex vivo* Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten?**

Es wurde mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht, wie sich der prozentuale Anteil LILRB4- positiver Zellen und zum anderen die Rezeptorlevel der Zelloberfläche von LILRB4 bei den verschiedenen Zelltypen unterscheiden.

**4) Vergleich der LILRB4- und Siglec-H- Rezeptorlevel auf der Zelloberfläche.**

Obwohl der Rezeptor LILRB4 vermehrt auf aktivierten Mikroglia, der Rezeptor Siglec-H jedoch vermehrt auf homöostatischen Mikroglia exprimiert ist, vermitteln beide über den ITIM/ ITAM- Signalweg ein inhibitorisches Signal. Daher wurden erneut mithilfe der Durchflusszytometrie *in vitro* Mikroglia, sowie *ex vivo* Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten in Abhängigkeit des Isolationszeitpunktes P7/ P30 und des Geschlechts untersucht. Primäre Mikroglia wurden analog mit TGF $\beta$ - Inhibitor und LPS über die Zeiträume von 3, 5 und 7 Tagen behandelt. Der prozentuale Anteil Siglec- H- positiver Zellen und die Siglec- H- Rezeptormenge auf der Zelloberfläche wurden mit der von LILRB4 verglichen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Reagenzien

**Tab. 1: Chemikalien**

Name	Hersteller
BSA (Pulver)	Roth (80762)
Chloroform	SIGMA (096K0064)
DMEM Ham's F12	SIGMA (Lot RNBC9420)
DMSO	Roth (A994.1)
EDTA	Carl Roth (T136.1)
Ethanol	SIGMA (E7023)
FCS	PAA (A15-102)
GelRed 10000X	GENAXXON (18G1231)
HBSS	GIBCO (14175-053)
Nuklease freies Wasser	Roth (T143)
NGS	ThermoFisher (31872)
PFA (Paraformaldehyd)	Roth (0335.3)
Penicillin/ Streptomycin	PAA (P011-010)
Percoll	SIGMA (P1644)
PBS	GIBCO (14190-094)
Poly-L-Lysin	SIGMA (P6407-5MG)
Triton-X-100	Roth (3051.3)
TRIzol	ThermoFisher (15596026)

**Tab. 2: Proteine und Zytokine**

Name	Quelle	Hersteller	Konzentration
LPS	E. coli (O26:B6)	SIGMA (L8274)	1µg/ml
TGFβ1	Mensch (rekombinant)	PeptoTech (100-21C)	500ng/ml

**Tab. 3: Inhibitoren und Enzyme**

Name	Hersteller	Konzentration
TGFβR1- Inhibitor	Merck (Lot 2934785)	1µg/µl
DNase1	Roche (11284932001)	
Trypsin 1X	PAA (L11-660)	

#### 3.1.2 Antikörper

**Tab. 4: Primäre Antikörper**

Antigen	Host	Hersteller (Produktnummer)
pSMAD1/2/3	Maus	Santa Cruz (sc-7960)

**Tab. 5: Sekundäre Antikörper**

Target	Konjugat	Hersteller (Produktnummer)
Ziege Anti- Maus	AlexaFluor 594nm	Abcam (ab 150116)

**Tab. 6: Andere Färbereagenzien**

Target	Konjugat	Hersteller (Produktnummer)
Isolektin (IB4)	Alexa Fluor 488nm	ThermoFisher (Invitrogen 121411)
DAPI	461nm	SIGMA (D9542)

**Tab. 7: Durchflusszytometrie Antikörper**

Antigen	Fluorophor	Hersteller (Produktnummer)
LILRB4	Alexa Fluor 647 (APC)	BioLegend (Lot B251491)
Siglec-H (CD140b)	Alexa Fluor 647 (APC)	BioLegend (Lot B174333)
F4/80	Alexa Fluor 488 (FITC)	BioRad (MCA497A488)
CD11b	Alexa Fluor 488 (FITC)	BioRad (MCA74A488T)
CD45	Alexa Fluor 647 (APC)	BioRad (MCA1031A647T)
CD16/CD32	-	BioLegend (Lot B266362)

### 3.1.3 Primer

Alle Primer sind von MWG Eurofins Genomics.

**Tab. 8: qPCR Primer**

Gen	Sequenz (forward/ reverse)
LILRB4	(f) ATGGGCACAAAAAGSSGGCTAA (r) GGCATAGGTTACATCCTGGGTC
GAPDH	(f) AGGTCGGTGTGAACGGATTTG (r) TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

### 3.1.4 Kits

**Tab. 9: Kits**

Name	Hersteller (Nummer)
Monarch Total RNA Miniprep Kit	New England BioLabs Inc. (T2010S)
Monarch RNA Cleanup Kit	New England BioLabs Inc. (T2030S)
ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit	New England BioLabs Inc. (E6560S)
Luna Universal qPCR Master Mix	New England BioLabs Inc. (M3003L)

### 3.1.5 Geräte

**Tab. 10: Geräte**

Name	Produktname/ Hersteller
Brutschrank	HERA cell 240/ Heraeus
Fluoreszenzmikroskop	ECLIPSE E400/ Nikon



Lichtmikroskop	ECLIPSE TS100 Nikon
Real Time qPCR Maschine	BioRad (Serial No: BR006702)
cDNA- Synthesegerät	Mastercycler/ (nexus gradient eppendorf)
Durchflusszytometriegerät	Cytoflex (107251)/ Beckmann Coulter
Spektrometer	BioSpectrometer/ eppendorf
Pipettierhilfe	pipetus/Hirschmann
Sterilbank	HERAsafe/ Heraeus
Zentrifuge 1	Biofuge pico, Heraeus
Zentrifuge 2	Centrifuge 5804 R, eppendorf
Zentrifuge 3	Mini Star silverline, VWR
Vortexer	uniTEXER1, LLG Labware
Rüttlerplatte	IKA-Virbrax-VXR Typ VX 2 E, Janke & Kunkel
Thermomixer	ThermoMixer C, eppendorf

### **3.1.6 Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

**Tab. 11: Verbrauchsmaterialien**

<b>Name</b>	<b>Hersteller (Produktname)</b>
Coverslips 12mm	VWR (ECN631-1577)
Kulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	SPL (ISO 13485)
Kulturflasche 25cm <sup>2</sup>	TPP (ISO 9001)
Zellkulturtestplatte 12/24	TPP (LOT 20180003)
Pipettenspitzen 10µl	SurPhob (LOT 19114)
Pipettenspitzen 200µl	nerbe plus (LOT P-154575)
Pipettenspitzen 1000 µl	SurPhob (LOT 19212)
Reaktionstube safe-lock 1,5 ml	eppendorf (0030 120.086)
Reaktionstube safe-lock 2,0 ml	eppendorf (0030 120.094)
Zell- Sieb 70µm Nylon	FALCON (REF 352350)
konische Tubes 15 ml	Falcon (352096)
konische Tubes 50 ml	Falcon (352070)
Microseal® ,B' Adhesive Seals	BioRad (MSB 1001)
96 Well PCR Plate, farblos	Biozym (710875)
96-Well Unskirted PCR Plates	BioRad (MLL 9601)

### **3.1.7 Lösungen, Puffer und Medien**

**Tab. 12: Lösungen, Puffer und Medien**

<b>Name</b>	<b>Bestandteil</b>
Dissektions- Puffer	HBSS 1% BSA 1mM EDTA
ICC Block- Lösung	10% NGS 0,1% TritonX-100 in PBS
Percoll Stock- Lösung	90% Percoll- Lösung 10% PBS 10X
Durchflusszytometrie- Puffer	1% FCS in PBS 1X

**3.1.8 Software****Tab. 13: Software**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Version/ Jahr</b>
Bio-Rad CFX Maestro	Bio-Rad	2017
CITAVI	Citavi	6
CytExpert	Beckman Coulter	2.1
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.	8.0
Inkscape	Inkscape	0.92.4
MS Office	Microsoft	2016
Zen Pro	Carl Zeiss AG	2010

**3.2 Methoden****3.2.1 Tiere und Zelllinien**

Für die RT- qPCR- Analysen wurde die mikrogliale BV2- Zelllinie genutzt. BV2- Zellen sind immortalisierte, murine Mikrogliazellen durch die virale Transduktion der Onkogene v-raf und v-map (Blasi E et al. 1990). Sie stellen ein verbreitetes Modell zur Untersuchung von Mikroglia dar (Laurenzi M A et al. 2001).

Für die ICC und alle Durchflusszytometrierversuche wurden gesunde NMRI-Mäuse genutzt.

**3.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zuerst eine Zellsuspension aus abgeschüttelten primären Mikroglia bzw. abgeschabten BV2- Zellen hergestellt. Diese wurde mit 90 µl Medium 1:10 verdünnt. Von der Verdünnung wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für die Bestimmung wurden die Zellzahlen von 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Die Zellzahl pro ml Suspension wurde folgendermaßen ermittelt:

*Zellzahl/ml = Mittelwert der Zellzahl aus 4 Großquadraten x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante (10<sup>4</sup>)*

### **3.2.3 Behandlung der BV2- Kulturen**

Die BV2- Zellen wurden in DMEM/F12- Medium + 10% FCS + 1% Streptomycin/Penicillin im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor der Behandlung wurde das Medium entfernt, 2-mal mit PBS gewaschen und 2h mit Serum- freiem Medium inkubiert. Durch die Serum- freie Inkubation über 2h konnten Effekte durch Mediatoren wie TGFβ, die im serumhaltigen Medium enthalten sind, zurückgesetzt werden. Es handelt sich dabei um ein etabliertes Verfahren, das bereits in anderen Experimenten (z.B. der Arbeitsgruppe Spittau) angewandt wurde. Anschließend behandelte man die BV2- Kulturen in neuem Serum- freiem Medium (s. Tabelle 13). Die Behandlung erfolgte über eine Zeitlinie von 6h, 12h und 24h.

**Tab. 14: Behandlung der BV2- Zellkulturen**

<b>Gruppe</b>	<b>Behandlung</b>
Kontrolle	-
TGFβ	500ng/ml (5µl/5ml Medium)
LPS	1 µg/ml (5µl/5ml Medium)
LPS + TGFβ	1 µg/ml + 5ng/ml

### **3.2.4 RNA-Isolierung der BV2- Zellen**

Pro Zellkulturplatte wurden 0,5 ml Trizol zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert, damit sich die Zellen vom Boden lösen können. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 100 µl Chloroform zugegeben und resuspendiert (ca. 30-mal). Es erfolgte eine erneute Inkubation für 10 min bei RT und anschließend eine Zentrifugation mit 12.000g bei 4°C über 15 min. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und danach mit dem Teil 2 Schritt 3 des Monarch Total RNA Miniprep Kits von New England BioLabs Inc. fortgeföhren. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des Monarch RNA Cleanup Kits von New England BioLabs Inc. gemäß des Herstellerprotokolls aufbereitet, um bessere Reinheitswerte und höhere Konzentrationen zu erhalten. Die Reinheitswerte wurden anhand des A260/280- Quotienten beurteilt, indem die Absorptionsspektren der RNA mit Hilfe des Biospektrometers von eppendorf bestimmt wurden. Reine DNA/ RNA entspricht einem A260/280- Quotienten zwischen 1,8 - 2,0 (Arnemann J. 2019).

### **3.2.5 cDNA-Synthese aus BV2- RNA**

Für die cDNA- Synthese nutzten wir das Standardprotokoll des ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit von New England BioLabs Inc. (E6560S) gemäß der Herstellerangaben.

### **3.2.6 Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT- qPCR)**

Für die RT- qPCR wurde das Luna Universal qPCR Master Mix Protokoll von New England BioLabs Inc. gemäß der Herstellerangaben genutzt. Der Reaktionsmix (siehe Tabelle 15) und die cDNA wurden als Duplikate in eine 96-Well Platte pipettiert und anschließend mit einem Plastikfilm versiegelt. Non-template-controls (NTCs) enthielten Nuklease- freies Wasser anstelle von cDNA. No reverse transcriptase controls (NRTs) enthielten keine reverse Transkriptase und wurden als Negativkontrolle genutzt. Für alle Kontrollen wurde das Housekeeping- Gen GAPDH verwendet. Die Reaktionsschritte wurden folgendermaßen durchgeführt:

**Tab. 15: RT- qPCR Ausführungsprotokoll**

<b>Schritt</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Temperatur</b>
Initiale Denaturierung	60	1x	95°C
Denaturierung	15	50x	95°C
Elongation	30	50x	60°C
Platte wird gelesen und anschließend ab Schritt 2 wiederholt			
finale Denaturierung	10	1x	95°C
Schmelzkurve	10	1x	Anstieg von 65°C auf 95°C um 0,5°C alle 5s

Platte wird gelesen

Ende

**Tab. 16: RT- qPCR Reaktionsmix**

	<b>LILRB4- Mastermix</b>	<b>GAPDH- Mastermix</b>	<b>NTC- Mastermix</b>
Luna Universal Mix	10,0µl	10,0µl	10,0µl
cDNA	2,0µl	2,0µl	-
foward primer	0,5µl	0,5µl	0,5µl
reverse primer	0,5µl	0,5µl	0,5µl
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	auf 20,0µl	auf 20,0µl	9,0µl
Gesamtvolumen	20,0µl	20,0µl	20,0µl

Die Werte wurden als  $2^{-\Delta\Delta CT}$  für das LILRB4- Gen verwendet, gegen das Housekeeping- Gen GAPDH normalisiert und als x-fache Veränderung gegenüber der Kontrolle dargestellt.

### **3.2.7 Durchflusszytometrie mit *in vitro* Mikroglia**

#### **3.2.7.1 Herstellung primärer Mikrogliaulturen aus P0/P1- Mäusen**

Zur Herstellung primärer Mikrogliaulturen wurde eine modifizierte Variante des ursprünglich entwickelten Protokolls von Giulian D, Baker T J (1986) angewandt. Die Präparation der Gehirne erfolgte an 0 bzw. 1 Tage alten Mäusen der NMRI-Zucht. Nach erfolgter Tötung durch Dekapitation wurde der Kopf mit einer Kanüle auf einer Styroporplatte fixiert. Die Gehirne wurden vorsichtig herauspräpariert und in eine HBSS- Lösung überführt. Anschließend wurden Gefäße und Meningealhäute der Gehirnoberfläche unter dem Mikroskop entfernt. Die „gesäuberten“ Gehirne wurden in einem Tube mit HBSS- Pufferlösung gesammelt und 3 mal gewaschen. Anschließend wurde das HBSS bis auf 1 ml entfernt. Nach Zugabe von 1 ml 0,25% Trypsin wurden die Gehirne für 12 min bei 37°C inkubiert. Nach 5 min wurden die Gehirne vorsichtig geschwenkt. Die Trypsinierung wurde durch die Zugabe von 10 ml kaltem DMEM/F12 (10% FCS + GlutaMax + 1% Penicillin/Streptomycin) geblockt. Nach Zugabe von DNase (conc. = 0,05 mg/ml), wurden die Gehirne resuspendiert und es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur bis keine DNase- Fragmente mehr sichtbar waren. Größere Gewebestücke wurden mechanisch zerkleinert durch die Verwendung von Pipetten mit abnehmendem Durchmesser (10 ml bis 5 ml). Das Auf- und Abpipettieren führte man solange durch, bis keine Fragmente mehr sichtbar waren.

Die Gehirnsuspension wurde bei 800 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Nach Zugabe frischen Mediums, erfolgte die Resuspendierung des Pellets. Nach Behandlung der Flaschen mit Poly-L-Lysin für die Zellkultivierung, wurde die Zellsuspension schließlich in die Kulturflaschen transferiert (1 Gehirn/ 25 cm<sup>2</sup> Fläche, 5 ml DMEM/F12 + 10% FCS (Hitze- inaktiviert) + Streptomycin/Penicillin für kleine Flaschen und 15 ml Medium für große Flaschen). Die so hergestellten Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Sättigung inkubiert. Am nächsten Tag und die darauffolgenden Tage erfolgte eine

Waschung der Zellen mit PBS, um tote Zellen zu entfernen. Nach 10 bis 14 Tagen Zellkultur, konnte man die Mikroglia von der am Boden haftenden Astrozytenschicht abschütteln.

### 3.2.7.2 Behandlung der primären Mikrogliaulturen

Für die Versuche mit dem Durchflusszytometer wurden die primären Mikroglia in 25 cm<sup>2</sup> großen Kulturflaschen angezüchtet. Dafür wurde eine Flasche als unbehandelte Kontrolle genutzt und je eine Flasche mit TGF $\beta$ - Inhibitor bzw. LPS behandelt. Da der TGF $\beta$ - Inhibitor DMSO enthält, wurde auch der mit LPS behandelten und der Kontrollflasche die äquivalente Menge an DMSO zugegeben, damit gleiche Versuchsbedingungen gewährleistet werden konnten. Die Behandlungsdauer in den Versuchen erfolgte über eine Zeitlinie von 3d, 5d und 7d im Brutschrank bei 37°C und 5,00 % CO<sub>2</sub>- Sättigung.

**Tab. 17: Behandlung der primären Mikrogliaulturen**

Gruppe	Behandlung	Behandlungsdauer
Kontrolle	2,1 $\mu$ l DMSO	3/5/7 d
TGF $\beta$ - Inhibitor	2,1 $\mu$ l TGF $\beta$ - Inhibitor	3/5/7 d
LPS	5,0 $\mu$ l LPS + 2,1 $\mu$ l DMSO	3/5/7 d

### 3.2.7.3 Isolierung und Färbung der *in vitro* Mikrogliazellen

Zur Isolierung primärer Mikroglia wurde ein modifiziertes Protokoll von Tamashiro T T et al. (2012) genutzt. Die kleinen Kulturflaschen wurden auf der Rüttlerplatte für 5 min bei 80 rpm und einer Temperatur von 37°C geschüttelt. Anschließend wurde unter dem Lichtmikroskop per Zählkammer geprüft, ob sich genügend Mikrogliazellen vom Boden gelöst haben (ca. 15.000 Zellen/ Reaktionsgefäß notwendig). Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und in 15 ml Tubes pipettiert. Die kleinen Kulturflaschen wurden ggf. erneut mit Medium aufgefüllt und im Brutschrank bei 37°C gelagert, damit neue Zellen für eine zweite Ernte wachsen konnten. Die einzelnen Tubes mit Kontrolle und behandelten Gruppen wurden nun in der Zentrifuge bei 4°C für 5 min bei 250 rpm mit einer Akzeleration von 6 und einer Dezeleration von 6 zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen anschließend mit dem Durchflusszytometrie- Puffer resuspendiert. Es wurden je 100  $\mu$ l der Zellsuspension in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß pipettiert.

Zur Färbung wurden die Herstellerprotokolle in modifizierter Form befolgt. Zuerst wurde der Block- Antikörper CD16/CD32 hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu verhindern und die Zellsuspension wurde für 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Mikroglia- und Makrophagen- Marker F4/80 und der jeweilige Fluoreszenzantikörper für LILRB4 und Siglec-H hinzugefügt. Es erfolgte erneut eine Inkubation bei 4°C im Dunkeln für 30 min. Nach der Inkubation wurden die Antikörper ausgewaschen, die nicht an der Zelloberfläche gebunden werden konnten. Dazu wurden 500 µl des Durchflusszytometriepuffers/ Reaktionsgefäß hinzugegeben, erneut für 5 min bei 200 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zum Schluss wurden die Zellen mit dem CytFlex Beckmann Coulter Durchflusszytometer analysiert.

**Tab. 18: Färbung der in vitro Mikrogliazellen**

<b>Reaktionsgefäß</b>	<b>Antikörper (Menge)</b>
Kontrolle: ungefärbt	Block- AK (5,0µl)
Kontrolle: LILRB4, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), LILRB4- AK (2,5µl)
Kontrolle: Siglec-H, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), Siglec-H- AK (3,0 µl)
Inhibitor: ungefärbt	Block- AK (5,0µl)
Inhibitor: LILRB4, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), LILRB4- AK (2,5µl)
Inhibitor: Siglec-H, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), Siglec-H- AK (3,0 µl)
LPS: ungefärbt	Block- AK (5,0µl)
LPS: LILRB4, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), LILRB4- AK (2,5µl)
LPS: Siglec-H, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), Siglec-H- AK (3,0 µl)

### **3.2.8 Durchflusszytometrie mit ex vivo Zellen**

Wir wählten für die ex vivo Versuche mit dem Durchflusszytometer 7 bzw. 8 Tage alte und 30 Tage alte unbehandelte NMRI- Mäuse. Für die Gruppe 7 Tage alter Mäuse wurden Kohorten von weiblichen und männlichen Mäusen untersucht. Ablauftechnisch wurden zuerst Peritonealmakrophagen, danach Mikroglia und zum Schluss Knochenmarksmonozyten isoliert.

### 3.2.8.1 Isolierung der *ex vivo* Peritonealmakrophagen

Zur Isolierung der pMPs wurde ein modifiziertes Protokoll von Koerten H K et al. (1980) genutzt. Mit einer Nadel wurden 3-4 ml PBS in den Peritonealraum infundiert und anschließend der Bauch leicht mit dem Finger beklopft, um Makrophagen aus dem Peritoneum zu lösen. Die Suspension wurde mit der Nadel wieder aufgesaugt und in einen 15 ml Falcon Tube überführt. Danach wurde die gleiche Menge an Durchflusszytometrie- Puffer zugegeben.

### 3.2.8.2 Percoll- Isolierung der *ex vivo* Mikrogliazellen

Zur Isolierung und Färbung wurde eine modifizierte Variante nach Garcia J A et al. (2014) genutzt. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Mäuse mit 15-20 ml kaltem PBS über den linken Ventrikel perfundiert, bis sich die Leber weiß färbte um das Blut heraus zu spülen.

Zur Isolierung der Mikroglia wurde der Kopf abgetrennt und, am Hirnstamm beginnend, das Gehirn entlang der sagittalen Sutur freipräpariert, das danach auf einer Zellkulturplatte mit einer Rasierklinge in kleine Stücke zerkleinert wurde. Das Gewebe wurde in einen Homogenizer mit ca. 2 ml kaltem Dissektions- Puffer überführt. Die Gehirnstücke wurden dabei sehr vorsichtig mit einem Stößel zerkleinert durch sehr langsames Auf- und Abbewegen unter Vermeidung von Blasenbildung. Sobald sich die Lösung trübte, wurde sie durch ein 70 µm Filtersieb in einen 50 ml Falcon Tube überführt und neuer Dissektions- Puffer dem Homogenizer zugegeben. Insgesamt wurden ca. 20 ml Puffer/ Tier benötigt.

Die Zellsuspension für Mikroglia wurde bei 18°C für 12min bei 400g (Akzeleration =5, Dezeleration =3) zentrifugiert. Es wurde eine isotonische Percoll- Stammlösung hergestellt: 90% Percoll und 10% PBS 10X (13,76ml Percoll auf 1,53ml PBS 10X für ein Tier = 100% Percoll). Von der Stammlösung wurden 30%, 37% und 70%- Lösungen hergestellt.

**Tab. 19: Percoll- Lösungen/ Tier**

Percoll- Lösung	Percoll- Stammlösung	PBS 1X
30% Percoll	2,55ml	5,95ml
37% Percoll	3,89ml	6,62ml + GelRed (3 Tropfen)
70% Percoll	7,35ml	3,15ml



Nach der Zentrifugation wurde zur Entfernung myelinierter Zellen der Überstand komplett aspiriert und in ca. 5 ml 37%er Percoll- Lösung resuspendiert. Ca. 4ml einer 30%ige Percoll- Lösung wurde in einem 15 ml Falcon Tube vorbereitet. Die 37%- Percoll- Suspension wurde anschließend sehr langsam und vorsichtig unter die 30%ige Percoll- Lösung mit einer Hohnadel überführt. Danach wurden 4-5 ml einer 70%igen Percoll- Lösung unter die 37%ige Lösung unterlegt.

Es wurde erneut bei 4 °C für 30 min bei 700g zentrifugiert, ohne Akzeleration und Dezeleration. Die obere Schicht an Myelin wurde anschließend entfernt.

Es hat sich durch die Zentrifugation zwischen der rot gefärbten 37%igen und der 70%igen Percoll- Lösung ein feiner Ring gebildet. Dieser Ring (ca. 2 ml) wurde mit einer Pipette vorsichtig aufgesaugt und in die gleiche Menge Durchflusszytometrie- Puffer gegeben.

#### **3.2.8.3 Isolierung von *ex vivo* Knochenmarksmonozyten**

Zur Isolierung der Knochenmarksmonozyten wurde das Protokoll von WagnerM et al. (2014) in modifizierter Form benutzt. Zuerst wurde das Femur der Mäuse freipräpariert. Das Muskelgewebe wurde entfernt und der Knochen mit 96%igem Ethanol desinfiziert. Das Femur wurde auf die Spitze einer feinen Nadel gesetzt und das Knochenmark mit 3-4 ml PBS durchspült. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml Falcon Tube aufgesammelt und die gleiche Menge an Durchflusszytometrie- Puffer zugegeben.

#### **3.2.8.4 Färbung der *ex vivo* Zellen**

Mit den verschiedenen Zellsuspensionen der Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten wurde nun analog der *in vitro* Mikroglia verfahren (s. 3.2.7.3 Isolierung und Färbung der *in vitro* Mikrogliazellen). Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten wurden zusätzlich mit CD11b und CD45 gefärbt.

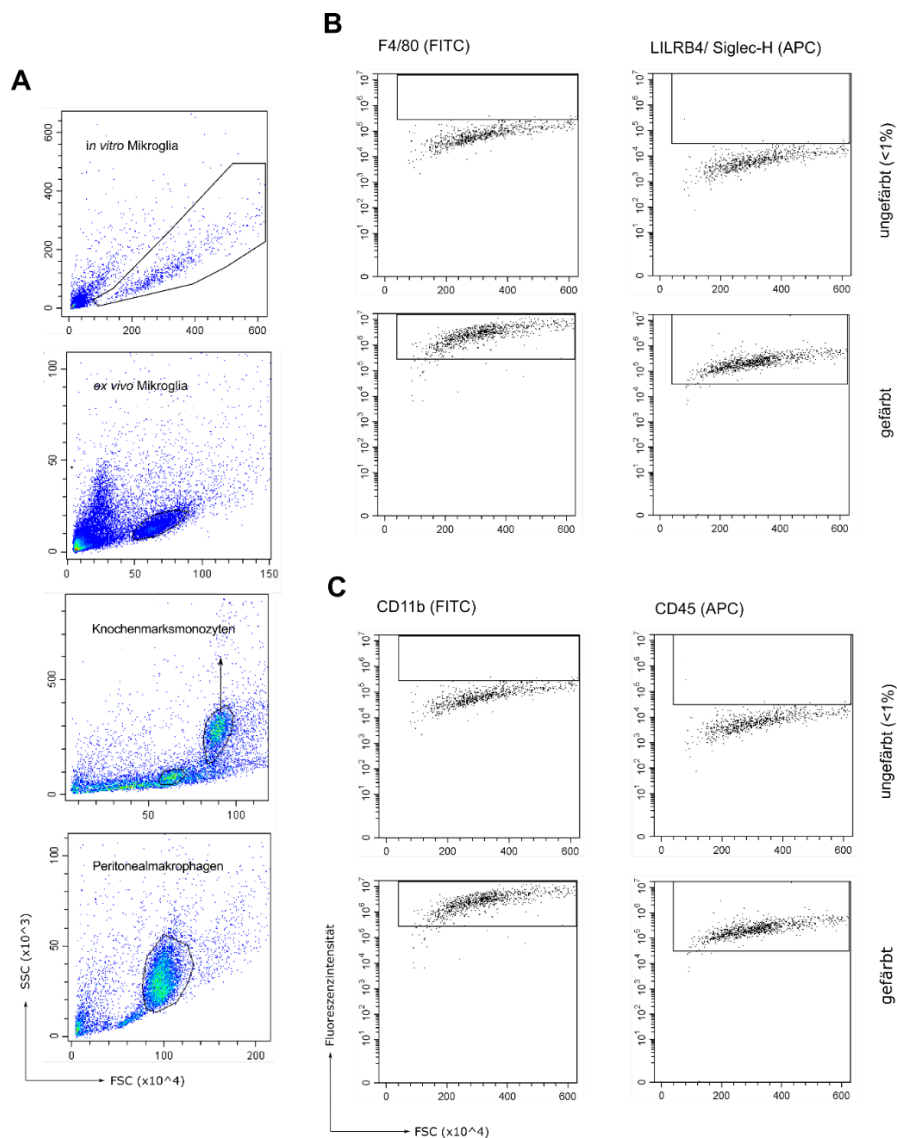
**Tab. 20: Färbung der in vivo Mikroglia (MG), Peritonealmakrophagen (pMP) und Knochenmarksmonozyten (BMMC)**

<b>Reaktionsgefäß</b>	<b>Antikörper (Menge)</b>
MG: ungefärbt	Block- AK (5,0µl)
MG: LILRB4, F4/80	Block -AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), LILRB4- AK (2,5µl)
MG: Siglec-H, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), Siglec-H- AK (3,0 µl)
pMP: ungefärbt	Block- AK (5,0µl)
pMP: LILRB4, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), LILRB4- AK (2,5µl)
pMP: Siglec-H, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), Siglec-H- AK (3,0µl)
pMP: CD11b/CD45	Block- AK (5,0µl), CD11b- AK (2,5µl), CD45- AK (2,5µl)
BMMC: ungefärbt	Block- AK (5,0µl)
BMMC: LILRB4, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), LILRB4- AK (2,5µl)
BMMC: Siglec-H, F4/80	Block- AK (5,0µl), F4/80- AK (2,5µl), Siglec-H- AK (3,0 µl)
BMMC: CD11b/CD45	Block- AK (5,0µl), CD11b- AK (2,5µl), CD45- AK (2,5µl)

### **3.2.9 Gating- Strategie**

Man setzte zuerst ein Fenster (Polygon) um die Wolke im FSC- SSC- Diagramm, in der man aufgrund von Zellgröße (FSC) und -granularität (SSC) die entsprechende Zellart vermutete. Aus dieser Population ließ man sich die F4/80-positiven Zellen im FITC- Fenster anzeigen, da F4/80 einen gut erprobten Monozyten-, Makrophagen- und Mikroglia- spezifischen Marker darstellt, der bereits in vielen Studien verwendet wurde (Austyn J M, Gordon S 1981; Perry V H et al. 1985). Bei den Versuchen mit Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten ließ man sich zusätzlich CD11b- und CD45- positive Zellen im FITC- bzw. APC- Fenster anzeigen. Auch CD11b und CD45 sind für Monozyten, Makrophagen und Mikroglia positive Marker, die schon in vielen Studien verwendet wurden. Monozyten/ Makrophagen zeigen sich eher als F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>hi</sup> und CD45<sup>hi</sup> (Ford A L et al. 1995; Becher B, Antel J P 1996). Mikroglia hingegen zeigen in allen Gehirnregionen ein einheitliches F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>low</sup> Profil (Grabert K et al. 2016). In einem APC- Fenster ließ man sich anschließend die Fluoreszenzintensitäten von LILRB4 und Siglec-H der F4/80<sup>+</sup> Zellen abbilden. Für die Versuche wurde eine maximale Autofluoreszenz von 1% festgelegt. D.h. in jeder Behandlungsgruppe wurde das Fenster der ungefärbten Zellen nach unten so begrenzt, dass sich darin maximal 1% der Zellen befanden. Diese untere Begrenzung wurde auf die gefärbten Zellen

übertragen. Die obere Begrenzung stellte die maximale Rezeptorintensität dar. Für die Auswertung ermittelte man den prozentualen Anteil LILRB4<sup>+</sup>/ Siglec-H<sup>+</sup> Zellen an F4/80<sup>+</sup> Zellen und nutzte den Median der Fluoreszenzintensität (kurz MFI) von LILRB4/ Siglec-H, der durch die CytExpert- Software bestimmt wurde. Der MFI fand bereits in verschiedenen Studien Anwendung und eignete sich in dieser Arbeit besser als der Mittelwert, da er weniger sensitiv auf Ausreißer reagiert (Mittag A, Tárnok A 2009; Maher K J, Fletcher M A 2005). Pro Reaktionsgefäß wurden mindestens 10.000 Ereignisse gemessen.



### Abb. 5: Gating- Strategie mit 2 Farbkanälen für die Durchflusszytometrie- versuche

A) Im FSC-SSC- Diagramm wurden die Wolken der verschiedenen Zellarten ausgewählt (Polygon). B) Alle ausgewählten Zellen wurden in einem neuen Fenster des FSC-Fluoreszenzintensitätsdiagramms für F4/80 dargestellt. Anschließend wurden die F4/80<sup>+</sup> Zellen in einem FSC-Fluoreszenzintensitätsdiagramm für LILRB4 und Siglec-H abgebildet. In einer ungefärbten Gruppe wurde die untere Grenze des Fensters so festgelegt, dass die Autofluoreszenz max. 1% beträgt (obere Reihe). Die, mit einem Fluoreszenzantikörper, gefärbten Gruppen konnten danach analysiert werden (untere Reihe). C) Knochenmarksmonozyten und Peritonealmakrophagen wurden auch für die Marker CD11b und CD45 gefärbt.

### **3.2.10 ICC (Immunzytochemie)**

Zuerst wurden primäre Mikroglia aus Zellkulturflaschen auf Coverslips ausplattiert. Sie wurden 2h mit serumfreiem Medium inkubiert und danach für 24h mit TGF $\beta$  (1 $\mu$ l/ 1ml Medium) und TGF $\beta$ R1- Inhibitor (0,5 $\mu$ l/ 1ml Medium) behandelt. Die Zellen wurden mit 4% PFA in PBS für 15min bei RT fixiert. Nach der Zellblockierung mit PBS (+10% NGS) und 0,1% TritonX-100 für 1h bei RT, wurden die Zellen mit dem primären Antikörper anti-SMAD1/2/3 bei 4°C über Nacht inkubiert (1:200 in der Block- Lösung). IB4 wurde genutzt, um Mikroglia zu markieren und DAPI zur Gegenfärbung der Zellkerne. Die Coverslips wurden ein letztes Mal in PBS gewaschen und auf einem Objektträger mit fluorescent mounting medium befestigt. Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe der Zen Pro- Software von Carl-Zeiss erfasst.

### **3.2.11 Statistik**

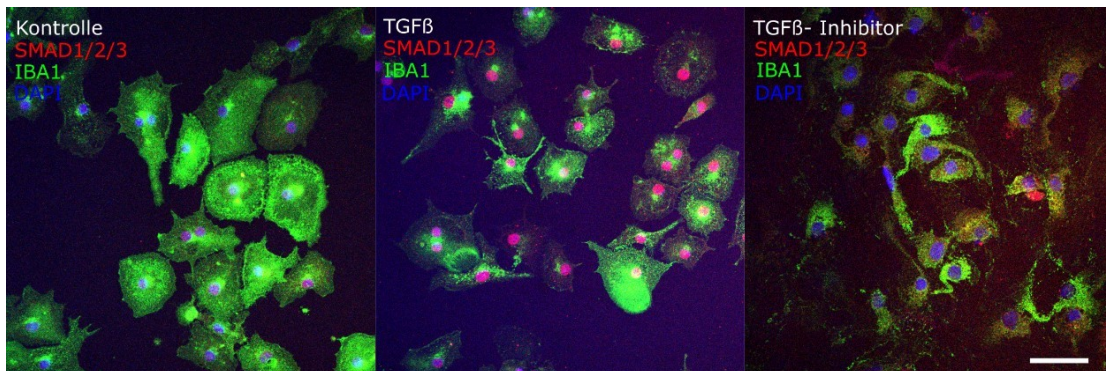
Die statistische Analyse der qPCR wurden mittels repeated- measures one-way- Analysis of Variance (ANOVA) evaluiert, gefolgt vom Tukey's Mehrfachvergleichstest. Es wurde die x- fache Veränderung (fold change) der behandelten Gruppen (TGF $\beta$ , LPS, LPS + TGF $\beta$ ) im Vergleich zu dem hypothetischen Wert 1 der Kontrollgruppe dargestellt.

Die statistische Analyse der Durchflusszytometrie wurde mittels ordinary one-way- ANOVA, repeated- measures one-way-ANOVA, dem mixed- effects model des repeated- measures one-way-ANOVA (wenn fehlende Werte einzelner Behandlungsgruppen in den Experimenten vorlagen) und dem ungepaarten Student's t- Test evaluiert. Post-hoc wurde der Tukey's Mehrfachvergleichstest für die ANOVA und die Bonferroni- Holms- Korrektur für den ungepaarten t- Test durchgeführt.

Die statistische Signifikanz wurde definiert als \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  und \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ . Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mithilfe der GraphPad Prism® V8.02 (USA)- Software durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Nachweis der Wirkung von TGF $\beta$ und TGF $\beta$ - Inhibitor mittels ICC

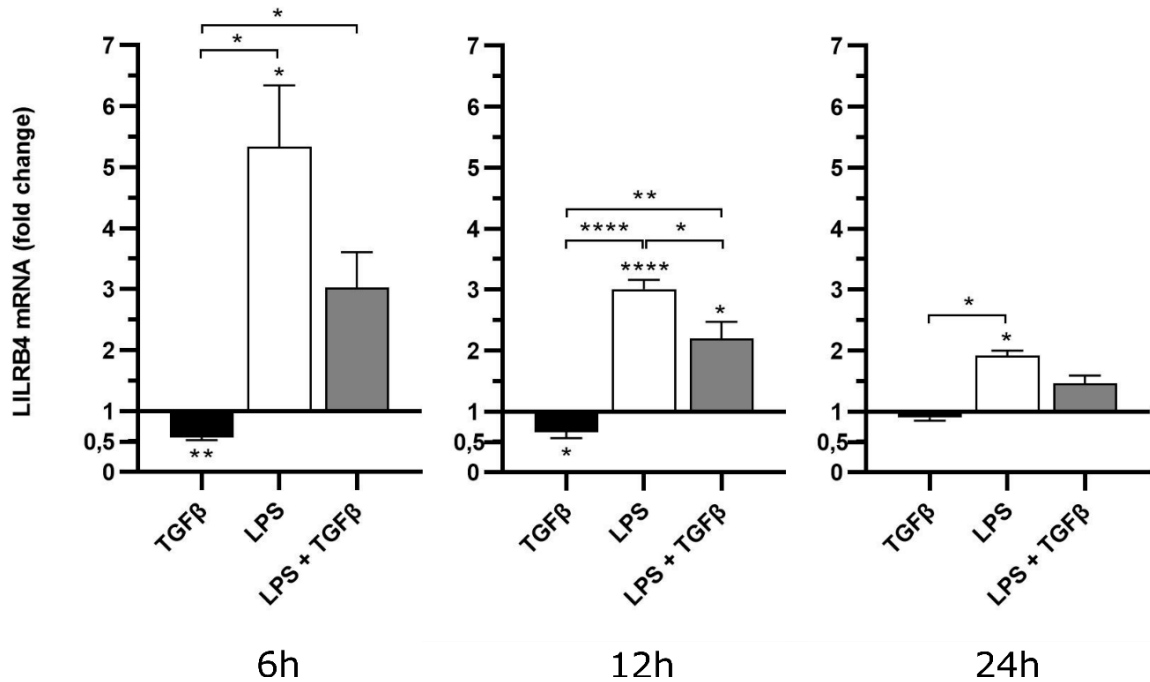


#### Abb. 6: TGF $\beta$ - induzierte SMAD- Translokation in primären Mikroglia

Primäre Mikroglia wurden mit dem Mikroglia- Marker Iba1 (grün), mit DNA färbendem DAPI (blau) und SMAD1/2/3 (rot) gefärbt. Der Maßstabsbalken zeigt 25  $\mu$ m an. Alle Gruppen wurden zuerst 2h serumfrei inkubiert (ohne TGF $\beta$ ). Anschließend erfolgte eine Behandlung über 24h mit TGF $\beta$  und TGF $\beta$ - Inhibitor. Es zeigt sich in der mit TGF $\beta$  behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Rotfärbung des Zellkerns, was die Wirksamkeit von TGF $\beta$  durch die Verlagerung von SMAD1/2/3 vom Zytosol in den Zellkern demonstriert. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der mit TGF $\beta$ - Inhibitor behandelten Gruppe eine Blaufärbung des Zellkerns. Das beweist die Hemmung von TGF $\beta$  und die Blockierung des intranukleären SMAD1/2/3- Signals, da aufgrund der fehlenden Rotfärbung keine intranukleäre SMAD- Translokation stattfand.

### 4.2 RT- qPCR- Ergebnisse: LILRB4- Transkription in BV2- Zellen

Zur Aktivierung der BV2- Zellen nutzten wir LPS und zum Erreichen ihres Ruhzustandes TGF $\beta$ . Um zu testen, inwieweit TGF $\beta$  das LPS- Signal ausschalten kann, wurde eine Versuchsgruppe mit beiden Stimuli behandelt. Als Negativkontrolle verwendeten wir 2h serumfrei inkubierte BV2- Zellen (d.h. TGF $\beta$  frei). Es wurde untersucht, ob durch die Behandlung mit TGF $\beta$ , LPS und der Kombination aus beidem eine veränderte mRNA- Expression von LILRB4 nachweisbar ist. Außerdem wurden unterschiedliche Behandlungsspannen von 6, 12 und 24 Stunden der einzelnen Gruppen untersucht.



**Abb. 7: LILRB4- Genexpression der BV2- Zellen**

BV2- Zellen wurden mit TGFβ, LPS und LPS + TGFβ über 6, 12 und 24h stimuliert und mit Hilfe der RT-qPCR analysiert. Die Werte wurden als Mittelwert ± SEM als x- fache Veränderung (fold change) von der Kontrollgruppe (unbehandelt) aus 5, 7 und 3 individuellen Experimenten dargestellt. Die p- Werte wurden mit Hilfe der „repeated measures one-way ANOVA“ und des post-hoc Tukey’s- Test ermittelt und als \*p<0.05, \*\*p<0.001 und \*\*\*\*p<0.0001 dargestellt.

#### 6 Stunden Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass durch die TGFβ- Behandlung die mRNA- Expression von LILRB4 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abfiel (im Mittelwert auf das  $0,57 \pm 0,09$ -Fache erniedrigt, p- Wert = 0,0025).

Durch die LPS- Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA- Expression (im Mittelwert um das  $5,33 \pm 2,03$ -Fache erhöht, p- Wert = 0,0428).

Durch die gleichzeitige Behandlung von TGFβ und LPS zeigte sich ein Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe (im Mittelwert um das  $3,02 \pm 1,17$ -Fache erhöht), wenn auch nicht signifikant (p- Wert = 0,0825), der im Vergleich zur LPS- Behandlungsgruppe geringer ausfiel.

Die Behandlungsgruppe beider Stimuli zusammen zeigte im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TGFβ einen signifikanten Anstieg (p- Wert = 0,0404), im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS zeigte sich aber keine signifikante Veränderung (p- Wert = 0,1844).

12 Stunden Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass bei allen Behandlungsgruppen eine signifikante Veränderung erreicht werden konnte.

Die mRNA- Expression von LILRB4 fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab durch die TGF $\beta$ - Behandlung (im Mittelwert auf das  $0,66 \pm 0,24$ -Fache erniedrigt, p- Wert = 0,0497).

Durch die LPS- Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA- Expression (im Mittelwert um das  $3,01 \pm 0,37$ -Fache erhöht, p- Wert < 0,0001).

Durch die gleichzeitige Behandlung von TGF $\beta$  und LPS zeigte sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe (im Mittelwert um das  $2,19 \pm 0,68$ -Fache erhöht, p- Wert = 0,0201), der im Vergleich zur LPS- Behandlungsgruppe geringer ausfiel.

Die Behandlungsgruppe beider Stimuli zusammen zeigte im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TGF $\beta$  einen signifikanten Anstieg (p- Wert = 0,0055), und im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS eine signifikante Reduktion der LILRB4 mRNA- Expression (p- Wert = 0,0244).

24 Stunden Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass durch die TGF $\beta$ - Behandlung die mRNA- Expression von LILRB4 im Vergleich zur Kontrollgruppe nur minimal und ohne Signifikanz abfiel (im Mittelwert auf das  $0,90 \pm 0,07$ -Fache erniedrigt, p- Wert = 0,4423).

Durch die LPS- Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA- Expression (im Mittelwert um das  $1,92 \pm 0,12$ -Fache erhöht, p- Wert = 0,0198).

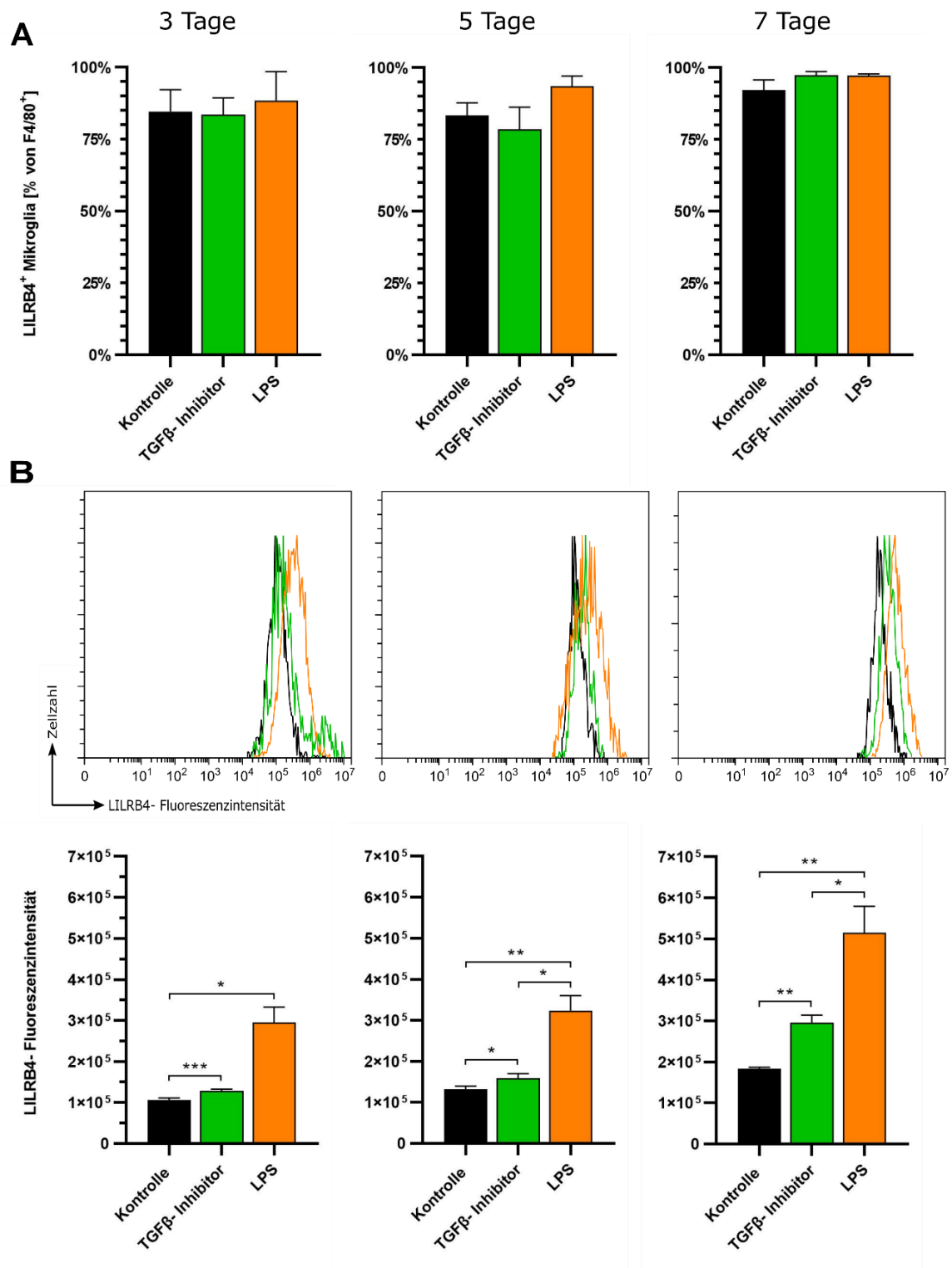
Durch die gleichzeitige Behandlung von TGF $\beta$  und LPS zeigte sich ein moderater und nicht signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe (im Mittelwert um das  $1,46 \pm 0,18$ -Fache erhöht, p- Wert = 0,1687), der im Vergleich zur LPS- Behandlungsgruppe geringer ausfiel.

Die Behandlungsgruppe beider Stimuli zusammen zeigte sowohl im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TGF $\beta$  (p- Wert = 0,1558), als auch im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS keine signifikante Veränderung (p- Wert = 0,1609).

### 4.3 Durchflusszytometrie von *in vitro* Mikroglia

In Durchflusszytometrieanalysen wurde nun die Oberflächenrezeptorausprägung von LILRB4 und Siglec-H auf primären Mikroglia erforscht. Es wurde untersucht, welcher prozentuale Anteil der primären F4/80<sup>+</sup> Mikroglia für LILRB4 und Siglec-H positiv ist und wenn dies der Fall ist, anhand der Fluoreszenzintensität in welcher Ausprägung. Außerdem wurden verschiedene Behandlungsspannen von 3, 5 und 7 Tagen überprüft. Wir definierten bei diesen Versuchen längere Behandlungsspannen als bei den PCR- Analysen, da die Proteinhalbwertszeit größer ist als die der mRNA und Proteine daher über ein längeres Intervall akkumulieren. Allerdings lassen sich pMGs nicht über eine so lange Dauer serumfrei, d.h. ohne TGFβ, inkubieren, ohne zu sterben. Deshalb wurden auch andere Versuchsgruppen verwendet als bei der PCR. Als Kontrollgruppe nutzten wir mit TGFβ- enthaltendem Serum inkubierte homöostatische Mikroglia. In der Versuchsgruppe wurden Mikroglia durch Stimulation mit TGFβ- Inhibitor (als Äquivalent zur serumfreien Behandlung) und LPS aktiviert.





### Abb. 8: LILRB4- Nachweis an der Oberfläche primärer Mikroglia

A) Prozentuale Darstellung LILRB4- positiver *in vitro* Mikroglia, die F4/80 positiv sind. B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (Einheit arbiträr) von LILRB4 auf der Membranoberfläche der *in vitro* Mikroglia. Primäre Mikroglia wurden durch TGFβ- Inhibitor und LPS für 3 Tage (links), 5 Tage (Mitte) und 7 Tage (rechts) stimuliert und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 7, 12 und 6 individuellen Experimenten dargestellt. Die p- Werte wurden mit Hilfe des „mixed- effects models“ der „repeated measures one-way ANOVA“ für die 3- und 5- tägige Behandlungsdauer und mit Hilfe der „repeated measures one-way ANOVA“ für die 7- tägige Behandlungsdauer, jeweils mit dem post-hoc Tukey's- Test, ermittelt und als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  dargestellt.

Alle F4/80<sup>+</sup> Vergleichsgruppen sind in einem Bereich von 78,65% ( $\pm 21,61\%$ ) bis 97,41% ( $\pm 2,89\%$ ) im Mittelwert LILRB4<sup>+</sup> positiv. Zwischen keiner der Gruppen konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden, auch wenn sich in der LPS-Gruppe und bei 7-tägiger Behandlung die Tendenz zeigte, dass mehr Mikroglia LILRB4<sup>+</sup> positiv sind.

### 3-tägige Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit TGF $\beta$ -Inhibitor (Mittelwert = 128.808,24  $\pm$  10.847,01) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert = 104.909,51  $\pm$  13.016,04) ein leichter, aber signifikanter Anstieg der LILRB4-Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war (p-Wert = 0,0007).

Durch die Behandlung mit LPS (Mittelwert = 299.957,40  $\pm$  89.907,22) zeigte sich ein deutlicher und signifikanter Anstieg der Rezeptorintensität (p-Wert = 0,031). Die Behandlungsgruppe mit LPS zeigte zwar einen größeren Anstieg der Intensität, aber keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Behandlungsgruppe mit TGF $\beta$ -Inhibitor (p-Wert = 0,1207).

### 5-tägige Behandlungsdauer

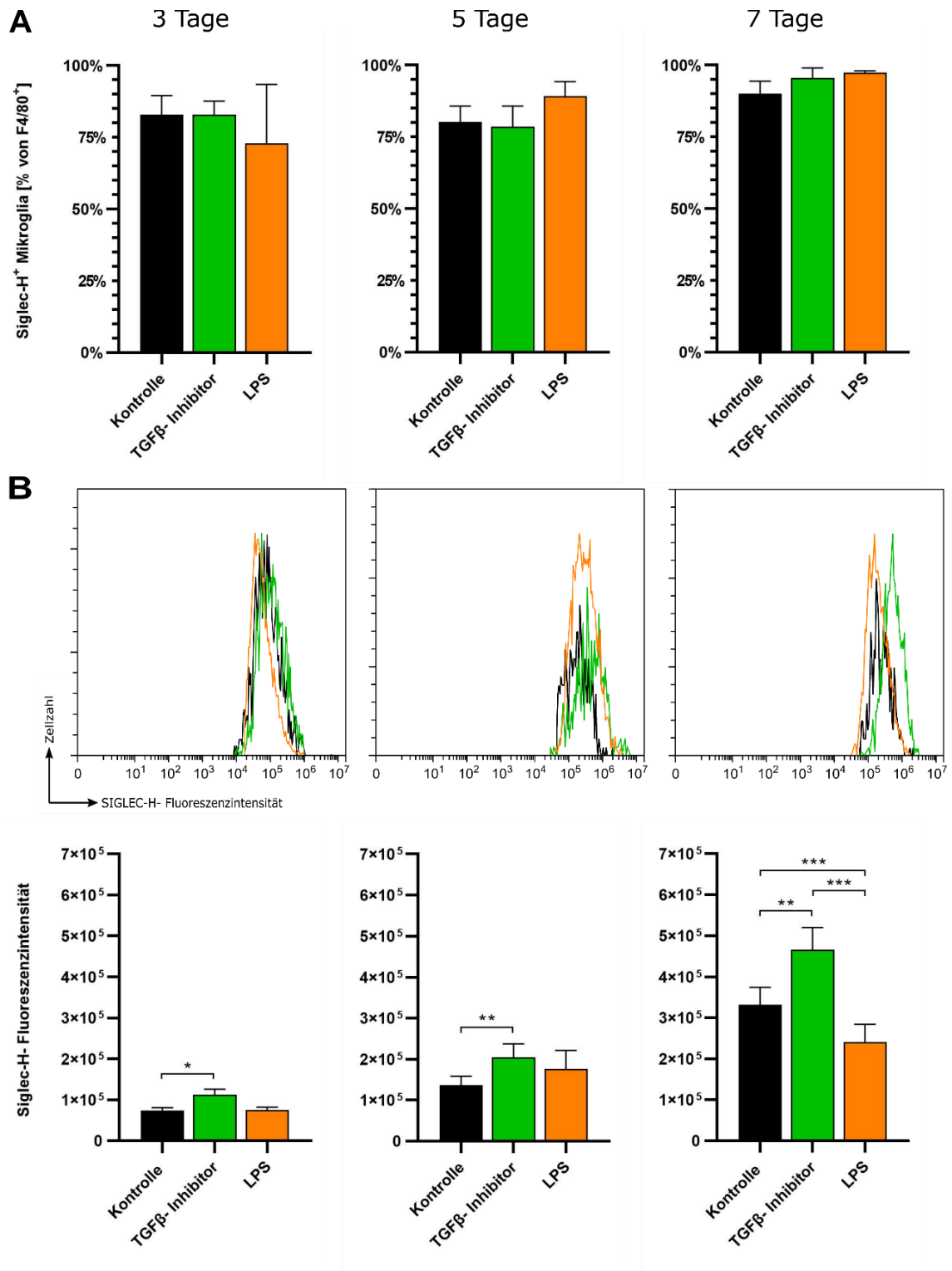
Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit TGF $\beta$ -Inhibitor (Mittelwert = 159147,33  $\pm$  30.989,30) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert = 127.224,14  $\pm$  28.552,40) ein leichter, aber signifikanter Anstieg der LILRB4-Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war (p-Wert = 0,0111).

Durch die Behandlung mit LPS (Mittelwert = 275.313,60  $\pm$  69.122,47) zeigte sich ein deutlicher und signifikanter Anstieg der Rezeptorintensität (p-Wert = 0,0017). Auch zur Behandlungsgruppe mit TGF $\beta$ -Inhibitor zeigte LPS einen deutlichen und signifikanten Anstieg (p-Wert = 0,0278).

### 7-tägige Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass bei allen Behandlungsgruppen eine signifikante Veränderung erreicht werden konnte.

TGF $\beta$ -Inhibitor (Mittelwert = 311.649,13  $\pm$  26.901,11) und LPS (Mittelwert = 541.505,50  $\pm$  112.889,49) zeigten einen deutlichen und signifikanten Anstieg der Rezeptorintensität (p-Wert = 0,0028, p-Wert = 0,0078) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert = 195.318,78  $\pm$  16.323,95), als auch zueinander (p-Wert = 0,0168).



### Abb. 9: Siglec-H- Nachweis an der Oberfläche primärer Mikroglia

A) Prozentuale Darstellung Siglec-H- positiver *in vitro* Mikroglia, die F4/80 positiv sind. B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (Einheit arbiträr) von Siglec-H auf der Membranoberfläche der *in vitro* Mikroglia. Primäre Mikroglia wurden durch TGFβ- Inhibitor und LPS für 3 Tage (links), 5 Tage (Mitte) und 7 Tage (rechts) stimuliert und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 6, 11 und 12 individuellen Experimenten dargestellt. Die p- Werte wurden mit Hilfe des „mixed- effects models“ der „repeated measures one-way ANOVA“ für die 3- und 5- tägige Behandlungsdauer und mit Hilfe der „repeated measures one-way ANOVA“ für die 7- tägige Behandlungsdauer, jeweils mit dem post-hoc Tukey's- Test, ermittelt und als \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  dargestellt.

Alle F4/80<sup>+</sup> Vergleichsgruppen sind in einem Bereich von 72,86% ( $\pm 29,11\%$ ) bis 97,08% ( $\pm 1,44\%$ ) im Mittelwert Siglec-H<sup>+</sup> positiv. Zwischen keiner der Gruppen konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden, auch wenn sich bei 7- tägiger Behandlung die Tendenz zeigte, dass mehr Mikroglia Siglec-H<sup>+</sup> positiv sind.

### 3- tägige Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit TGF $\beta$ - Inhibitor (Mittelwert = 105.778,63  $\pm$  21.130,76) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert = 77.216,17  $\pm$  18.698,11) ein leichter, aber signifikanter Anstieg der Siglec- H- Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war (p- Wert = 0,0332).

Durch die Behandlung mit LPS (Mittelwert = 75.089,47  $\pm$  11.554,70) zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Rezeptorintensität.

### 5- tägige Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit TGF $\beta$ - Inhibitor (Mittelwert = 204.549,50  $\pm$  91.869,84) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert = 137.005,16  $\pm$  67.019,39) ein leichter, aber signifikanter Anstieg der Siglec- H- Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war (p- Wert = 0,024).

Durch die Behandlung mit LPS (Mittelwert = 205.274,33  $\pm$  107.610,48) zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Rezeptorintensität.

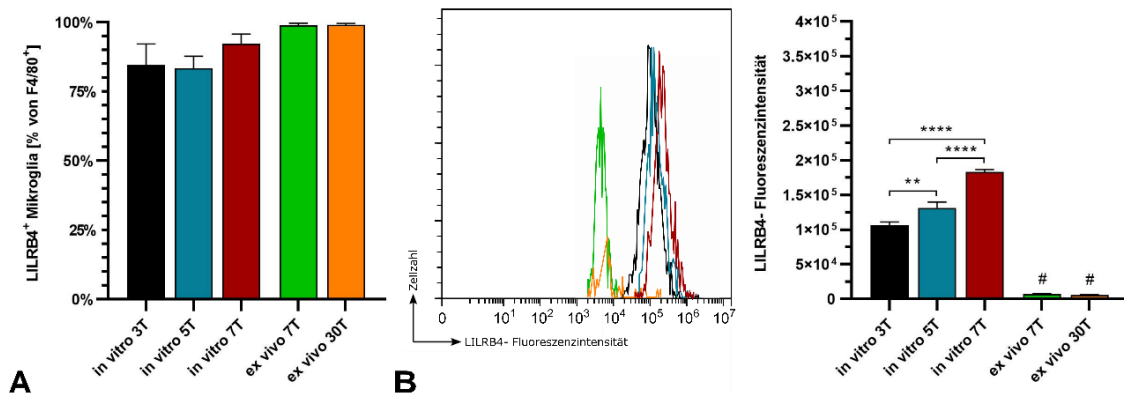
### 7- tägige Behandlungsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass bei allen Behandlungsgruppen eine signifikante Veränderung erreicht werden konnte.

TGF $\beta$ - Inhibitor (Mittelwert = 474.335,26  $\pm$  144.169,95) zeigte einen signifikanten Anstieg der Rezeptorintensität (p- Wert = 0,0073) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert = 345.956,03  $\pm$  16.323,95). Durch LPS kam es hingegen zu einem signifikanten Abfall der Siglec-H- Rezeptorintensität (Mittelwert = 245.234,75  $\pm$  151.848,79, p- Wert = 0,0005). Die Behandlungsgruppen mit TGF $\beta$ - Inhibitor und LPS waren auch zueinander signifikant (p- Wert = 0,0004).

## 4.4 Ex vivo Durchflusszytometrie aus Wildtypmäusen

### 4.4.1 Ex vivo Mikroglia im Vergleich zu in vitro Mikroglia



**Abb. 10: Vergleich LILRB4- positiver in vitro und ex vivo Mikroglia**

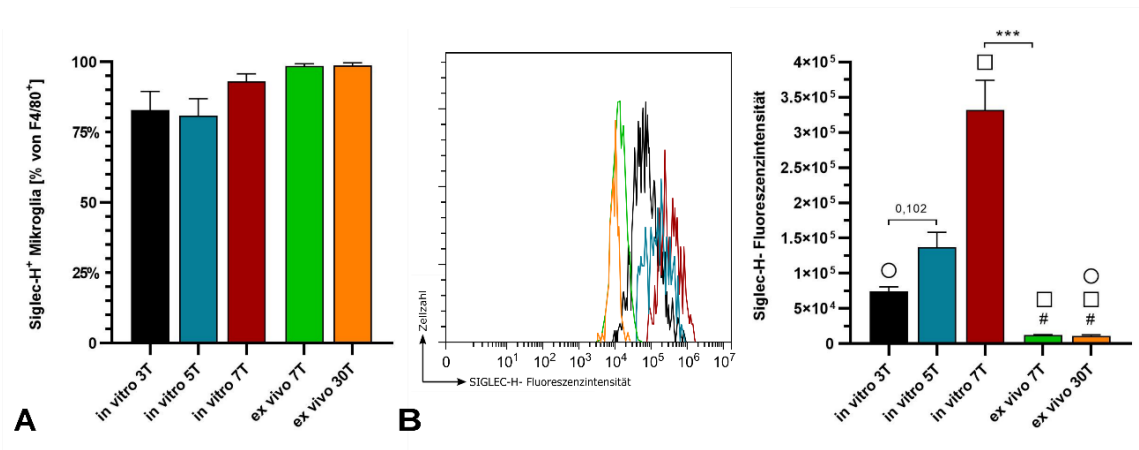
A) Prozentuale Darstellung LILRB4- positiver ex vivo und in vitro Mikroglia, die F4/80 positiv sind. B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (Einheit arbiträr) von LILRB4 auf ihrer Membranoberfläche.

Frisch isolierte ex vivo Mikroglia aus 7 und 30 Tage alten unbehandelten Wildtypmäusen wurden mit den 3, 5 und 7 Tage behandelten Kontrollgruppen der *in vitro* Durchflusszytometrieversuche aus Zellkulturflaschen (siehe 4.2.) verglichen. Die Werte jeder Vergleichsgruppe wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 7, 12, 6, 6 und 5 individuellen Experimenten dargestellt (von links nach rechts, siehe Diagramm). Die p- Werte wurden mit Hilfe der „ordinary one-way ANOVA“ und des post-hoc Tukey's- Test ermittelt. Signifikanzniveaus wurden als \*\* $p < 0.01$  und \*\*\*\* $p < 0.0001$  dargestellt, # entspricht der Signifikanz der entsprechenden ex vivo Mikroglia gegenüber jeder einzelnen *in vitro* Kontrollgruppe mit einem Signifikanzniveau von \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Alle F4/80<sup>+</sup> Vergleichsgruppen sind in einem Bereich von 78,65% ( $\pm 21,61\%$ ) bis 99,98% ( $\pm 0,03\%$ ) im Mittelwert LILRB4<sup>+</sup> positiv. Zwischen keiner der Gruppen konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden, auch wenn sich bei den ex vivo Mikroglia die Tendenz zeigte, dass mehr Zellen LILRB4<sup>+</sup> positiv sind.

Zwischen der Kontrollgruppe der 3- tägigen Behandlung (Mittelwert = 104.909,51  $\pm$  13.016,04) war eine Signifikanz zur Kontrollgruppe der 5- tägigen Behandlung (Mittelwert = 127.224,14  $\pm$  28.552,40) sichtbar (p- Wert = 0,0013), genauso wie zur Kontrollgruppe der 7- tägigen Behandlung (Mittelwert = 195.318,78  $\pm$  16.323,95, p- Wert < 0,0001). Die Kontrollgruppe der 5- tägigen Behandlung war ebenfalls zur Kontrollgruppe der 7- tägigen Behandlung signifikant (p- Wert < 0,0001).

Bei den ex vivo Mikroglia aus 7 Tage alten Mäusen (Mittelwert = 7.261,82  $\pm$  1.790,87) war keine Signifikanz zu den 30 Tage alten Mäusen (Mittelwert = 5777,10  $\pm$  1138,11) erkennbar. Jedoch zeigte sich ein sehr deutlicher, signifikanter Unterschied zu jeder der *in vitro* Kontrollgruppen (p- Wert < 0,0001).



### Abb. 11: Vergleich Siglec-H- positiver *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia

A) Prozentuale Darstellung Siglec-H- positiver *ex vivo* und *in vitro* Mikroglia, die F4/80 positiv sind. B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (Einheit arbiträr) von Siglec-H auf ihrer Membranoberfläche.

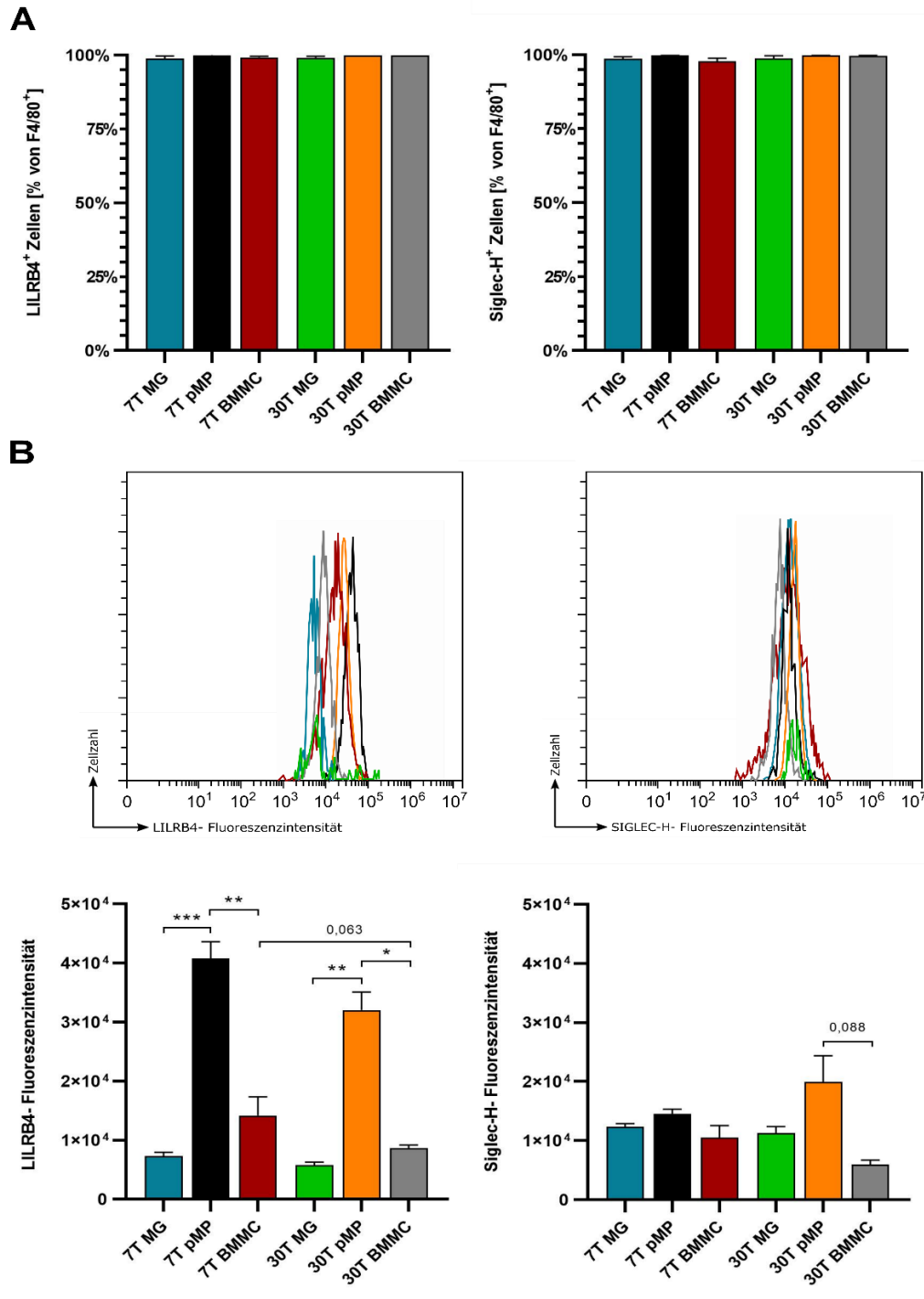
Frisch isolierte *ex vivo* Mikroglia aus 7 und 30 Tage alten unbehandelten Wildtypmäusen wurden mit den 3, 5 und 7 Tage behandelten Kontrollgruppen der *in vitro* Durchflusszytometrieversuche aus Zellkulturflaschen (siehe 4.2.) verglichen. Die Werte der einzelnen Vergleichsgruppen wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 6, 11, 12, 11 bzw. 5 individuellen Experimenten dargestellt (von links nach rechts, siehe Diagramm). Die p- Werte wurden mit Hilfe des ungepaarten Student's t- Test und der post-hoc Bonferroni- Holm Korrektur ermittelt. Signifikanzniveaus wurden als \*\*\* $p < 0.001$  dargestellt, # entspricht der Signifikanz der „*in vitro* 3T“ Gruppe gegenüber so markierten Vergleichsgruppen mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.001$ , □ entspricht der Signifikanz der „*in vitro* 5T“ Gruppe gegenüber so markierten Vergleichsgruppen mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.01$  und ○ entspricht der Signifikanz der „*in vitro* 7T“ Gruppe gegenüber so markierten Vergleichsgruppen mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.01$ .

Alle F4/80<sup>+</sup> Vergleichsgruppen sind in einem Bereich von 72,86% ( $\pm 29,11\%$ ) bis 99,70% ( $\pm 0,12\%$ ) im Mittelwert Siglec-H<sup>+</sup> positiv. Zwischen keiner der Gruppen konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden, auch wenn sich bei den *ex vivo* Mikroglia die Tendenz zeigte, dass mehr Zellen LILRB4<sup>+</sup> positiv sind.

Zwischen der Kontrollgruppe der 3- tägigen Behandlung (Mittelwert = 77.216,17  $\pm$  18.698,11) war keine Signifikanz zur Kontrollgruppe der 5- tägigen Behandlung (Mittelwert = 137.005,16  $\pm$  67.019,39) sichtbar (p- Wert = 0,102), jedoch zur Kontrollgruppe der 7- tägigen Behandlung (Mittelwert = 345.956,03  $\pm$  16.323,95, p- Wert = 0,0042). Die Kontrollgruppe der 5- tägigen Behandlung war ebenfalls zur Kontrollgruppe der 7- tägigen Behandlung signifikant (p- Wert = 0,0042).

Bei den *ex vivo* Mikroglia aus 7 Tage alten Mäusen (Mittelwert = 12.351,05  $\pm$  1.320,06) war keine Signifikanz zu den 30 Tage alten Mäusen (Mittelwert = 11.287,32  $\pm$  2.490,39) erkennbar. Jedoch zeigte sich ein sehr deutlicher, signifikanter Unterschied zu jeder der *in vitro* Kontrollgruppen.

#### 4.4.2 Ex vivo Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmo- nozyten im Vergleich



**Abb. 12: LILRB4- und Siglec-H- Nachweis auf der Oberfläche von ex vivo Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmo-  
nozyten**

A) prozentuale Darstellung LILRB4 (links)- und Siglec-H (rechts)- positiver ex vivo MGs, pMPs und BMMCs, die F4/80 positiv sind. B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (Einheit arbiträr) von LILRB4 und Siglec-H auf ihrer Membranoberfläche.

Frisch isolierte ex vivo MGs, pMPs und BMMCs aus 7 und 30 Tage alten unbehandelten Wildtypmäusen wurden miteinander verglichen. Die Werte der einzelnen Vergleichsgruppen wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 6 (Isolationszeitpunkt bei 7 Tagen) bzw. 7 (Isolationszeitpunkt bei 30 Tagen) individuellen Experimenten dargestellt. Zum Vergleich der verschiedenen Zellpopulationen desselben Isolationszeitpunktes wurden die p- Werte mit Hilfe der „repeated-measures one-way ANOVA“ ermittelt, zum Vergleich identischer Zellpopulationen zu verschiedenen Isolationszeitpunkten wurde die „ordinary one-way ANOVA“, jeweils mit dem post-hoc Tukey's- Test, genutzt. Signifikanzniveaus wurden als \* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  dargestellt.

Alle F4/80<sup>+</sup> Zellpopulationen waren annähernd 100% positiv für LILRB4, als auch für Siglec-H.

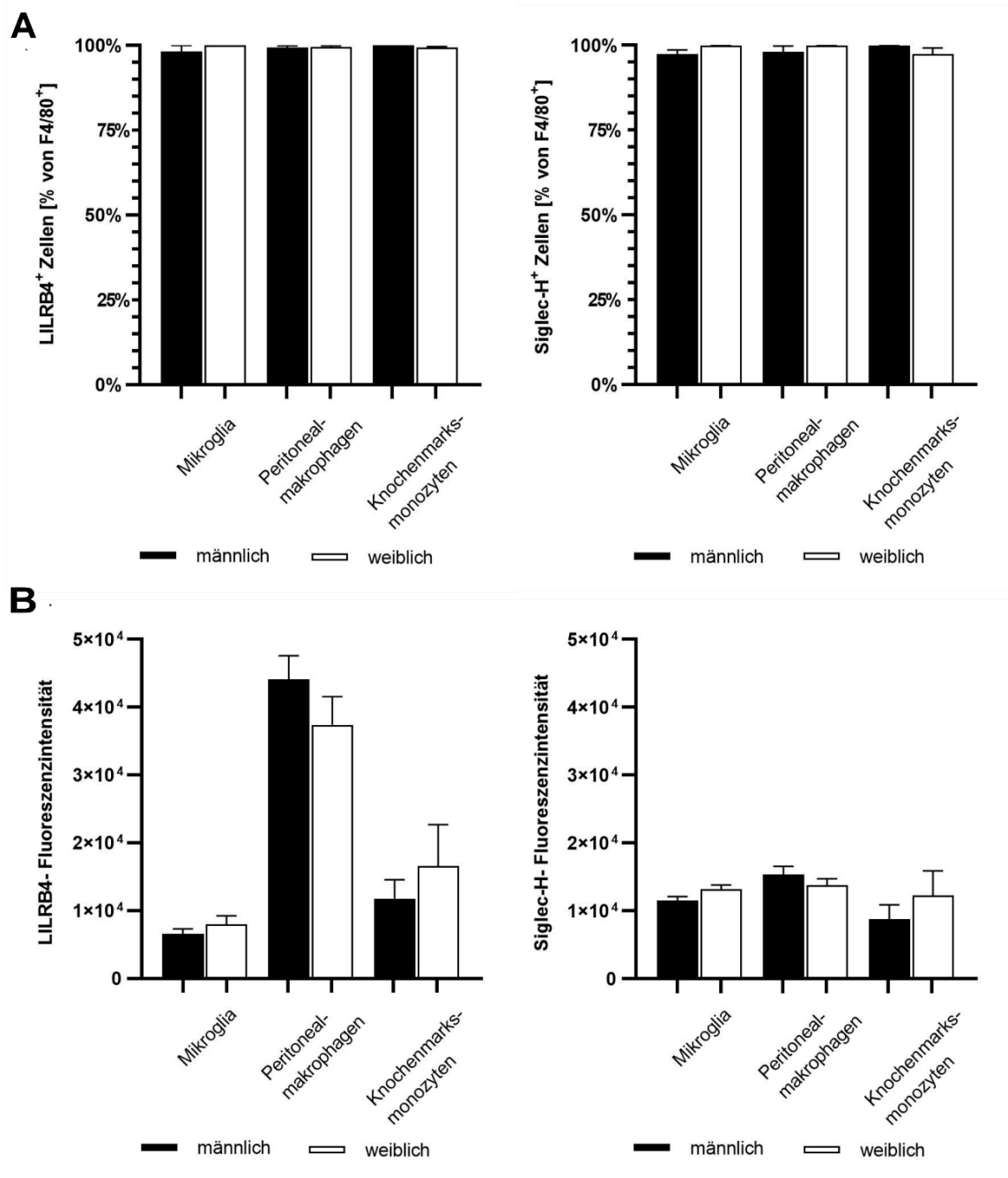
Es konnte gezeigt werden, dass Peritonealmakrophagen aus 7 und 30 Tage alten Mäusen die höchste (Mittelwert 7 Tage = 40.750,98 ± 6384,47; Mittelwert 30 Tage = 32.072,56 ± 7.984,90) und Mikroglia die niedrigste (Mittelwert 7 Tage = 7.261,82 ± 1.790,87; Mittelwert 30 Tage = 5.777,10 ± 1.138,11) LILRB4- Rezeptordichte besitzen. Peritonealmakrophagen wiesen eine Signifikanz sowohl gegen Mikroglia (p-Wert 7 Tage = 0,0002, p- Wert 30 Tage = 0,0061), als auch gegen Knochenmarksmonozyten (p- Wert 7 Tage = 0,0013, p- Wert 30 Tage = 0,0189) auf. Knochenmarksmonozyten besaßen zwar eine höhere Rezeptordichte (Mittelwert 7 Tage = 14.182,12 ± 7.016,66; Mittelwert 30 Tage = 8.652,70 ± 1.053,03) als Mikroglia, die jedoch nicht signifikant war (p- Wert 7 Tage = 0,1123, p- Wert 30 Tage = 0,1469).

Beim Vergleich der beiden Altersgruppen wurde bei allen Zellpopulationen eine nicht signifikante Reduktion der LILRB4- Rezeptordichte bei den älteren Mäusen festgestellt. Nur Knochenmarksmonozyten besaßen eine annähernd signifikante niedrigere Rezeptorintensität als die Vergleichsgruppe aus 7 Tage alten Mäusen (p- Wert = 0,063).

Bei Siglec-H konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, weder in Bezug auf die unterschiedlichen Zellpopulationen, noch in Bezug auf die beiden Altersgruppen. Nur die Peritonealmakrophagen aus 30 Tage alten Mäusen (Mittelwert = 19.933,37 ± 11.774,22) zeigten eine annähernd höhere Rezeptordichte im Vergleich zu Knochenmarksmonozyten (Mittelwert = 5.925,50 ± 1.610,30; p- Wert = 0,088).



#### 4.4.3 Vergleich männlicher und weiblicher 7 Tage alter ex vivo Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten



**Abb. 13: LILRB4- und Siglec-H- Nachweis auf der Oberfläche von männlichen und weiblichen ex vivo Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten**

A) prozentuale Darstellung LILRB4 (links)- und Siglec-H (rechts)- positiver ex vivo MGs, pMPs und BMMCs, die F4/80 positiv sind. B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (Einheit arbiträr) von LILRB4 und Siglec-H auf ihrer Membranoberfläche.

Frisch isolierte ex vivo MGs, pMPs und BMMCs aus 7 alten unbehandelten Wildtypmäusen wurden jeweils auf mögliche Geschlechtsunterschiede verglichen. Die Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM aus jeweils 3 individuellen Experimenten für männliche und weibliche Tiere dargestellt. Zum Vergleich der Zellpopulationen wurden die p- Werte mit Hilfe des ungepaarten Student's t- Test ermittelt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich rezeptorpositiver Zellen oder der Rezeptordichte zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht festgestellt werden, weder bei LILRB4 noch bei Siglec-H bei keiner der Zellarten.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 LILRB4- Transkription der BV2- Zelllinie

Das erste Ziel war die Untersuchung der Transkription, da in Genexpressionsarrays unter TGF $\beta$ - Stimulation eine Runterregulierung des mikroglialen LILRB4-Signals gezeigt werden konnte (unveröffentlichte Untersuchungen der Arbeitsgruppe Spittau). Mehrere frühere Arbeiten, die transkriptomische und Durchflusszytometrie- Analysen nutzten, beschrieben LILRB4 als DAM- assoziierten Rezeptor und zeigten, dass er in gealterten und neurodegenerativen Mikroglia vermehrt exprimiert wird (Holtman I R et al. 2015; Zöller T et al. 2018; Kamphuis W et al. 2016; Krasemann S et al. 2017; Voet S et al. 2018). Außerdem konnte in qPCR- Analysen gezeigt werden, dass LILRB4 auf DCs, Makrophagen (Brown D P et al. 2009) und auf akut aktivierten *ex vivo* (Holtman I R et al. 2015) und primären Mikroglia (Bohlen et al. 2017) durch Behandlung mit LPS hochreguliert wird.

Daher galt es mittels RT- qPCR herauszufinden, inwiefern sich die Synthese von LILRB4- mRNA durch die Behandlung mit TGF $\beta$ , LPS und TGF $\beta$  + LPS verändert und ob sich Unterschiede durch verschiedene Behandlungsspannen ergeben. Die RNA- Isolierung aus pMGs erwies sich materialtechnisch als nicht umsetzbar, da zu viele Tiere zur Zellgewinnung hätten getötet werden müssen. Deshalb wurde die BV2- Zelllinie genutzt, welche bisher aufgrund der einfachen Instandhaltung der Zellen und der großen Verfügbarkeit an Material durch die uneingeschränkte Proliferationsfähigkeit als anwendbares und verbreitetes Modell zur Untersuchung von Mikroglia galt. Als Nachteil haben sich jedoch die Anfälligkeit zur Dedifferenzierung und mögliche Phänotypveränderungen durch die Immortalisierung erwiesen (Timmerman R et al. 2018). Des Weiteren haben neuere Studien darauf hingewiesen, dass BV2- Zellen in ihrer Funktion und genetischen Signatur sowohl von *in vitro* als auch von *ex vivo* Mikroglia abweichen können (Butovsky et al. 2014; Das A et al. 2016; Melief J et al. 2016). Transkriptionelle und funktionelle Analysen offenbarten, dass BV2- Zellen die meisten Immunantworten, wie z.B. auf LPS (über TLR4 und NF- $\kappa$ B), beibehalten (wenn auch leicht abgeschwächt), allerdings ein eingeschränktes TGF $\beta$ - Signal im Vergleich zu

pMGs aufweisen (He Y et al. 2018; Dai X et al. 2015). Außerdem wurde demonstriert, dass unstimulierte BV2- Zellen stärker proinflammatorisch aktiviert sind als pMGs (Sarkar S et al. 2018).

In dieser Arbeit wurde mittels qPCR belegt, dass die LILRB4- Genexpression in homöostatischen BV2- Zellen durch TGF $\beta$ - Stimulation runterreguliert, in aktivierten BV2- Zellen durch LPS- Stimulation hingegen hochreguliert wird. Diese Ergebnisse sind mit den bisherigen Arbeiten von Holtman I R et al. (2015) und Bohlen et al. (2017) kongruent. Dies zeigt, dass LILRB4 in BV2- Zellen auf die gleiche Weise wie in Makrophagen durch LPS hochreguliert wird und ist ein Hinweis darauf, dass LILRB4 in LPS- aktivierten Mikroglia eine ähnliche Funktion erfüllt wie in LPS- aktivierten Makrophagen. Durch die gleichzeitige Behandlung mit beiden Stimuli zeigte sich, dass TGF $\beta$  die LPS- induzierte LILRB4- Genexpression dämpft, diesen Effekt von LPS jedoch nicht komplett neutralisieren kann. Eine mögliche Erklärung dafür wäre das eingeschränkte TGF $\beta$ - Signal der BV2- Zellen als limitierender Faktor. Beim Vergleich der unterschiedlichen Behandlungszeiträume (6 h, 12h und 24h) stellte man fest, dass es durch den kürzesten Behandlungszeitraum von 6h zur größten relativen x- fachen Veränderung (fold change) und durch den längsten Behandlungszeitraum von 24h zur niedrigsten relativen x-fachen Veränderung der LILRB4- Genexpression aller Behandlungsgruppen kam (siehe Abb. 9). Dies lässt vermuten, dass eine längere Behandlung zu einem Anpassungsmechanismus der Genexpression von LILRB4 an TGF $\beta$  und LPS führt.

## **5.2 LILRB4- Oberflächenrezeptorausprägung primärer Mikroglia**

Die mikrogliale LILRB4- Transkription unter LPS- Behandlung wurde bereits in Studien untersucht. Jedoch wurden bisher noch keine Durchflusszytometrie-Analysen durchgeführt und die LILRB4- Translation bleibt diesbezüglich unerforscht. Im nächsten Schritt unserer Arbeit sollte daher festgestellt werden, wie sich die Mikrogliaaktivierung durch die Behandlung mit TGF $\beta$ R1- Inhibitor und LPS auf die Translation der LILRB4- Rezeptorproteine auswirkt und ob sich auch hier Unterschiede durch verschiedene Behandlungsspannen ergeben.

LILRB4 gilt als Oberflächenmembranrezeptor, der, abgesehen von seinen extrazellulären löslichen Isoformen, intrazellulär nicht vorkommt (Suciu-Foca et al. 2007; Des Jones et al. 2009). Wir verzichteten deshalb auf Western- Blots und

nutzten stattdessen die Durchflusszytometrie, da außerdem keine primären Western-Blot-Antikörper für LILRB4 existierten, die bereits in anderen Publikationen ausreichend validiert wurden. Es wurde zum einen der prozentuale Anteil LILRB4-positiver Mikroglia und zum anderen die Rezeptordichte auf den LILRB4-positiven Mikroglia anhand der Fluoreszenzintensität analysiert. BV-2 Zellen waren für diese Versuche nicht geeignet, da sie schwierig von der Zellkulturplatte zu lösen sind. Für die RNA-Isolierung stellte dies kein Problem dar, da die am Untergrund haftenden Zellen abgeschabt und anschließend lysiert werden konnten. Für Analysen mit dem Durchflusszytometer war hingegen eine Suspension lebender Zellen geeigneter, weshalb pMGs verwendet wurden.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass nahezu alle F4/80<sup>+</sup> pMGs sowohl im homöostatischen als auch im aktivierten Zustand LILRB4-Oberflächenrezeptoren besitzen. Darüber hinaus wurde erstmals nachgewiesen, dass es bei aktivierten pMGs durch Stimulation mit TGF $\beta$ R1-Inhibitor und LPS zu einem signifikanten Anstieg der LILRB4-Oberflächenrezeptorausprägung über alle Behandlungszeiträume von 3, 5 und 7 Tagen kommt. Beim Vergleich der beiden Behandlungsgruppen zeigte sich, dass LPS einen signifikant stärkeren Stimulus für die Rezeptorlevel von LILRB4 darstellt als TGF $\beta$ R1-Inhibitor (für die Behandlungsdauer von 5 und 7 Tagen) (s. Abb. 8). Diese Ergebnisse bestätigen, dass LILRB4 zu den Rezeptoren zählt, die mit der Mikrogliaaktivierung assoziiert sind. Mehrere Studien haben eine LILRB4-Defizienz im Kontext mit überschießenden inflammatorischen Immunantworten beschrieben (Gu X et al. 2003; Zhou J S et al. 2005; Katz H R 2007; Jiang Z et al. 2017). Eine LPS-Stimulation führt in aktivierten Neutrophilen, Makrophagen und Mikroglia zu einer LILRB4-Genexpression. Ebenfalls wurde seine Rolle auf Makrophagen durch die Hochregulierung antiinflammatorischer Zytokine zur Limitierung der Immunantwort bei Infektionen (i. V. m. LPS) geschildert (Brown D P et al. 2009). Vor dem Hintergrund lässt sich im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit vermuten, dass die Rezeptorhochregulierung von LILRB4 durch LPS auch auf Mikroglia zur Limitierung der Immunantwort als eine Art protektive Funktion beiträgt, um die homöostatische mikrogliale Signatur wiederherzustellen. Es ist daher wichtig zu betonen, dass nicht alle DAM-assoziierten Rezeptoren eine schädliche, proinflammatorische Wirkung besitzen müssen, sondern genauso eine schützende Funktion ausüben können und dass LILRB4 wahrscheinlich kein proinflammatorischer Rezeptor ist, der Neurodegeneration fördert.

### 5.3 LILRB4- Oberflächenproteinlevel: *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia im Vergleich

Studien, wie die von Butovsky et al. (2014), konnten nicht nur zeigen, dass mikrogliale Zelllinien eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen, sondern auch, dass die molekulare Signatur der pMGs von adulten Mikroglia abweicht. PMGs haben zwar mehr Übereinstimmungen mit adulten Mikroglia als BV2- Zellen, die größte Ähnlichkeit besteht allerdings zwischen neugeborenen (P1) und adulten Mikroglia.

Bisher wurden noch keine Aussagen über die möglichen Unterschiede der LILRB4- Rezeptorlevel zwischen *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia getroffen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden mithilfe der Percoll- Isolierung und anschließender Durchflusszytometrie erstmals pMGs mit frisch isolierten 7 und 30 Tage alten Mikroglia verglichen.

Murine Mikroglia befinden sich bis zur 2. postnatalen Woche in der Reifung und proliferieren aus Vorläuferzellen (Alliot F et al. 1999). Erst danach erlangen sie ihre ausgereifte transkriptomische Signatur (Bennett M L et al. 2016; Matcovitch-Natan et al. 2016). Um mögliche Unterschiede zwischen unreifen und ausdifferenzierten, adulten *ex vivo* Mikroglia zu detektieren, wurden die Isolationszeitpunkte bei 7 und 30 Tage alten NMRI- Wildtypmäusen festgelegt.

In den Versuchen konnten erhebliche Unterschiede zwischen *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia dargelegt werden (eine 14 bis 33-fach höhere LILRB4- Rezeptormenge der pMGs im Vgl. zu frisch isolierten MGs). Beim Vergleich der *ex vivo* Mikroglia untereinander zeigten sich zwischen 7 und 30 Tage alten Mikroglia keine signifikanten Unterschiede. Dies zeigt, dass zwischen unreifen und adulten, reifen Mikroglia keine Unterschiede bzgl. der LILRB4- Rezeptorausprägung bestehen. LILRB4 stellt daher keinen Reifemarker dar. Hingegen traten bei allen *in vitro* Mikroglia der 3, 5 und 7 Tage kultivierten Kontrollgruppen signifikante Unterschiede untereinander auf. 7 Tage kultivierte pMGs wiesen die höchste und 3 Tage kultivierte pMGs die niedrigste Rezeptordichte auf. Dies demonstriert, dass die LILRB4- Rezeptorausprägung bei längerer Kultivierung ohne Mediumwechsel signifikant ansteigt. Diese Daten belegen, dass sich kultivierte Mikroglia in ihrer molekularen Signatur zum Teil deutlich von *ex* und *in vivo* Mikroglia abheben und dass eine längere Kultivierung Mikroglia chronisch aktiviert.

Auch wenn keine Unterschiede unreifer P7- Mikroglia gegenüber adulten P30 Mikroglia aufgezeigt werden konnten, sind dennoch Abweichungen der LILRB4-Rezeptordichte in anderen mikroglialen Vorläufern möglich, wie z.B. in P0- Mäusen oder pränatal, was in zukünftigen Arbeiten weiter erforscht werden könnte.

#### **5.4 Mikrogliale LILRB4- Oberflächenrezeptorlevel im Vergleich zu Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten**

Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass sich die molekulare Signatur der Mikroglia deutlich von Gewebsmakrophagen und von vom Knochenmark abgeleiteten Monozyten unterscheidet (Butovsky et al. 2014; Ransohoff R M 2016). Obwohl die Transkription von LILRB4 bereits auf verschiedenen Immunzellen gezeigt wurde (s. 1.2.6 Expression von LILRB4), konnten bisher noch keine vergleichenden Aussagen über die Rezeptordichte auf deren Zelloberfläche getroffen werden.

Diese Dissertation vergleicht aufgrund dessen erstmals Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten hinsichtlich ihres Anteils LILRB4-positiver F4/80<sup>+</sup> Zellen, ihrer unterschiedlichen Rezeptordichte, ihres Isolationszeitpunkts (P7 und P30) und ihres Geschlechts miteinander. Die verschiedenen Zellarten wurden aus 7 und 30 Tage alten NMRI- Wildtypmäusen isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

F4/80<sup>+</sup> MGs, pMPs und BMMCs sind alle nahezu 100% positiv für LILRB4. Bezüglich ihrer Rezeptorintensität konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden: pMPs besitzen die höchste LILRB4- Rezeptormenge, die im Vgl. zu MGs ca. 4-fach und im Vgl. zu BMMCs ca. 3-fach erhöht ist zu jeweils beiden Isolationszeitpunkten. Mikroglia zeigten von allen Zellarten die niedrigste Rezeptordichte. Weder beim Vergleich der Isolationszeitpunkte, noch beim Vergleich männlicher und weiblicher Zellen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (BMMCs<sub>7 Tage</sub> zeigten eine annähernd signifikant höhere Rezeptordichte als BMMCs<sub>30 Tage</sub>).

Diese Ergebnisse konnten bestätigen, dass LILRB4 keinen Mikroglia-spezifischen Rezeptor darstellt, sondern dass er auf verschiedenen Immunzellen zu nahezu 100% vorhanden ist. Unsere vorherigen Versuche haben bereits gezeigt, dass LILRB4 vermehrt auf aktivierten und weniger auf ruhenden Mikroglia vorhanden ist. Daher weisen die Daten darauf hin, dass Mikroglia von allen drei Zellarten wahrscheinlich am wenigsten aktiviert sind. Diese Annahme erscheint

durchaus sinnvoll, da die Blut- Hirn- Schranke für das ZNS eine wichtige Barriere zur Aufrechterhaltung der Homöostase darstellt, um eine Inflammation und Aktivierung des ZNS- spezifischen Immunsystems zu verhindern. Eine andere Erklärung wäre, dass LILRB4 aufgrund des gewebespezifisch vorherrschenden lokalen Milieus unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Makrophagen entwickeln sich aus ihren Vorläufern, den unreifen Monozyten. Da in unseren Experimenten pMPs eine höhere LILRB4- Rezeptorausprägung besitzen als BMMCs, liegt die Vermutung nahe, dass die LILRB4- Level im Reifungsprozess einer Zelle ansteigen. Außerdem ist bereits bekannt, dass LILRB4 in gealterten Mikroglia vermehrt exprimiert wird (Zöller T et al. 2018). Auf der anderen Seite konnte bei keinem der Zelltypen ein signifikanter Unterschied zwischen 7 und 30 Tage alten Mäusen festgestellt werden, auch nicht zwischen unreifen (P7) und adulten (P30) Mikroglia. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die LILRB4- Rezeptorlevel zwar gewebespezifisch unterschiedlich hoch sind, im homöostatischen Zustand aber konstant bleiben und nur im unphysiologischen Zustand im Rahmen einer Aktivierung, wie bei *geprimten* Mikroglia, ansteigen.

### 5.5 Oberflächenproteinlevel von Siglec-H

Siglecs und LILRs gehören beide zur Immunglobulin- Superfamilie. Die Siglec-Familie besitzt extrazelluläre Ig- Domänen und vermittelt ihr Signal über intrazelluläre ITIMs (Zhang J et al. 2006), genauso wie die LILRBs (Fanger N A et al. 1999). Siglec-H ist zwar eines der wenigen Ausnahmen, das kein intrazelluläres ITIM besitzt, nutzt dafür jedoch ein ITAM via DAP12 zur Signaltransduktion (Blasius A L et al. 2006; Zhang J et al. 2006). Siglec-H, das ein inhibitorisches Signal vermittelt, ist auf homöostatischen Mikroglia vermehrt und auf aktivierten Mikroglia weniger exprimiert (Konishi et al. 2017; Krasemann S et al. 2017). Interessanterweise vermittelt auch LILRB4 ein inhibitorisches Signal durch 3 intrazelluläre ITIMs im peripheren Immunsystem (seine Funktion im ZNS ist noch weitgehend unerforscht). Jedoch wurde beobachtet, dass LILRB4 anders als Siglec-H vermehrt auf aktivierten und weniger auf homöostatischen Mikroglia exprimiert ist (s. 1.2.8 LILRB4- Expression auf Mikroglia). Die Erkenntnisse lassen vermuten, dass zwischen Siglec-H und LILRB4 funktionelle Gemeinsamkeiten bestehen könnten. Siglec-H trägt vermutlich dazu bei, Mikroglia in Homöostase



zu halten und LILRB4 hemmt evtl. die mikrogliale Aktivierung. Vor dem Hintergrund wurde in dieser Dissertation auch die Oberflächenrezeptorausprägung von Siglec-H erforscht und mit LILRB4 verglichen.

### **5.5.1 *In vitro* und *ex vivo* Mikroglia im Vergleich**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde, analog zu LILRB4, der Anteil Siglec-H<sup>+</sup>-positiver F4/80<sup>+</sup>-Zellen und die Siglec-H Oberflächenrezeptorausprägung auf *in vitro* Mikroglia durch die Behandlung mit TGFβ1-Inhibitor und LPS und auf unbehandelten *ex vivo* Mikroglia analysiert.

Konishi et al. konnten zeigen, dass Siglec-H auf mikroglialen Vorläufern, adulten Mikroglia, homöostatischen und aktivierten Mikroglia nahezu 100% exprimiert ist. Die Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden: annähernd alle *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia waren Siglec-H positiv. Das galt sowohl für junge, unreife (P7) und adulte *ex vivo* Mikroglia (P30), als auch für homöostatische und aktivierte *in vitro* Mikroglia.

In qPCR- und Durchflusszytometrieanalysen stellten Kopatz et al. (2013) fest, dass es nur durch die proinflammatorische Stimulation mit IFNγ oder LPS in Kombination mit IFNγ über 24h zu einem signifikanten Anstieg von Siglec-H in primären Mikroglia kam. Eine 24 stündige Behandlung mit LPS allein konnte keinen signifikanten Anstieg der Siglec-H RNA- und Protein-Level auslösen.

In den Durchflusszytometrieversuchen dieser Arbeit konnte auch kein signifikanter Anstieg des Siglec-H Proteinlevels durch 3- und 5- tägige LPS- Stimulation festgestellt werden. Interessanterweise kam es bei 7- tägiger LPS- Stimulation zu einem verminderten Siglec-H- Proteinlevel primärer Mikroglia. Das deutet darauf hin, dass nicht nur die Art der Behandlung, sondern auch die Dauer eine wichtige Einflussgröße für die Regulierung von Siglec-H darstellt und dieser Rezeptor erst bei einer starken, chronischen Aktivierung runterreguliert wird. Die Ergebnisse stimmen mit den *in vivo* Ergebnissen von Krasemann S et al. (2017) überein, bei denen es durch LPS und IFNγ- Stimulation zu einer Suppression verschiedener homöostatischer Gene kam. Auf der anderen Seite ist es unklar, warum durch einen proinflammatorischen Stimulus wie IFNγ das Siglec-H- Rezeptorlevel bereits bei einer kurzen Behandlungsdauer von 24h ansteigt, jedoch durch den ebenfalls proinflammatorischen Stimulus LPS entweder gar nicht oder erst bei längerer Behandlungsdauer sinkt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass

durch verschiedene proinflammatorische Stimuli auch verschiedene mikrogliale Aktivierungszustände mit einer anderen molekularen Signatur induziert werden, die bisher noch nicht eindeutig charakterisiert werden konnten.

Butovsky et al. konnten zeigen, dass die Siglec-H RNA- Level durch die Faktoren M-CSF und TGF $\beta$  in Kombination hochreguliert wurden und dass in TGF $\beta$ 1<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen die Siglec-H Transkription mindestens 5-fach vermindert war. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit angenommen, dass die Siglec-H Proteinlevel durch Behandlung mit TGF $\beta$ R1- Inhibitor ebenfalls sinken.

Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Stattdessen war bei allen Behandlungsspannen über 3, 5, und 7 Tage ein signifikanter Anstieg der Siglec-H Proteinlevel auf der Zelloberfläche sichtbar. Eine denkbare Ursache wäre, dass TGF $\beta$  keinen direkten Einfluss auf Siglec-H hat, sondern indirekt und multifaktoriell auf den Rezeptor wirkt (z.B. über Neurone, die wiederum Botenstoffe freisetzen) und dass diese verschiedenen Faktoren teilweise entgegengesetzte Wirkungen auslösen. Da Siglec-H zur Phagozytose und Endozytose fähig ist (s. 1.1.7 Siglec-H), können zudem Unterschiede zwischen dem intrazellulären Rezeptorlevel und dem der Zelloberfläche bestehen, die durch unsere Durchflusszytometrierversuche nicht erfasst werden konnten. Es wäre daher möglich, dass durch die Behandlung mit TGF $\beta$ R1- Inhibitor die intrazelluläre Siglec-H Proteinmenge sinkt, die der Oberfläche jedoch ansteigt, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Auf der anderen Seite stellt TGF $\beta$ R1- Inhibitor wie IFN $\gamma$  einen proinflammatorischen Stimulus dar. Ein Anstieg der Siglec-H Rezeptorlevel durch TGF $\beta$ R1- Inhibitor erscheint aus der Sicht logisch, da Kopatz et al. (2013) in ihrer Arbeit unter IFN $\gamma$ - Stimulation ebenfalls einen Siglec-H Anstieg detektierten.

Beim Vergleich zwischen *in vitro* und *ex vivo* Mikroglia konnten erhebliche Unterschiede dargelegt werden (6 bis 29-fach höhere Siglec-H- Rezeptormenge der pMGs im Vgl. zu frisch isolierten MGs). *Ex vivo* Mikroglia (P7 und P30) zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede. Die Resultate unterstreichen erneut, wie die von LILRB4, dass kultivierte Mikroglia gegenüber *ex vivo* oder *in vivo* Mikroglia eine andere molekulare Signatur besitzen.

Zusätzlich traten bei den *in vitro* Mikroglia der 3, 5 und 7 Tage kultivierten Kontrollgruppen (ohne Mediumwechsel) signifikante Unterschiede untereinander auf (s. Abb. 10). 7 Tage kultivierte pMG wiesen die höchste und 3 Tage kultivierte

pMG die niedrigste Rezeptordichte auf, ähnlich wie bei LILRB4. Da Siglec-H als homöostatischer Rezeptor gilt, dessen Transkription in aktivierten und gealterten *ex vivo* Mikroglia runterreguliert wird (Krasemann S et al. 2017), wäre eher der gegenteilige Effekt zu erwarten gewesen. Allerdings lässt sich, wie oben schon beschrieben, das Expressionsverhalten kultivierter Mikroglia nicht bedenkenlos auf *ex vivo* Mikroglia übertragen.

### **5.5.2 Siglec-H Proteinlevel von Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten**

Siglec-H wurde bereits auf pDCs, verschiedenen Gewebsmakrophagen und Vorläuferzellen im Knochenmark identifiziert (Blasius A L et al. 2006; Zhang J et al. 2006; Schlitzer A et al. 2015).

In dieser Dissertation wurden unter Nutzung von Durchflusszytometrieanalysen frisch isolierte *ex vivo* MGs, pMPs und BMMCs aus 7 und 30 Tage alten Wildtypmäusen verglichen.

Es konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Siglec-H auch auf Peritonealmakrophagen als Oberflächenprotein vorkommt. MGs, pMPs und BMMCs sind zu annähernd 100% Siglec-H positiv, genau wie LILRB4. Hinsichtlich der Zellart konnten wir erstmalig zeigen, dass im Gegensatz zu LILRB4 keine signifikanten Unterschiede der Rezeptorlevel auf der Zelloberfläche festgestellt werden konnten.

Wir stellten keine Unterschiede bzgl. Geschlecht und Isolationszeitpunkt fest und konnten damit die Ergebnisse von Konishi et al. bestätigen, dass Siglec-H als Reifemarker für Mikroglia untauglich ist.

## 5.6 Ausblick

Weitere Studien sind erforderlich, um die bisher noch unbekanntenen Liganden für LILRB4 und Siglec-H zu identifizieren, die genauere Einblicke in die Funktion der Rezeptoren liefern können.

Eine erhöhte LILRB4- Expression wurde im Zusammenhang mit atherosklerotischen Läsionen auf Makrophagen beschrieben. LILRB4- Defizienz beschleunigt die Plaqueinstabilität (Jiang Z et al. 2017). Auf Mikroglia ist die erhöhte LILRB4- Expression in AD- Mausmodellen ebenfalls bekannt (Kamphuis W et al. 2016). Es ist daher durchaus anzunehmen, dass LILRB4 in den Prozess der Plaquebildung und des A $\beta$  Abbaus bei Alzheimer Demenz beteiligt ist. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, ein Mikroglia- spezifisches Knockout- Modell für LILRB4 zu entwickeln, um die möglichen Auswirkungen auf homöostatische und neurodegenerative Mikroglia zu untersuchen.

Neurodegeneration tritt häufig in krankheitsspezifischen, räumlich begrenzten Gehirnregionen auf. Bestimmte regionsspezifische transkriptionelle Unterschiede wurden bereits enthüllt. Dazu zählt auch die Gruppe der ITAM- und ITIM- assoziierten Rezeptoren, inklusive Siglec-H (Grabert K et al. 2016). LILRB4 als ITIM- ass. Rezeptor wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht und wäre ein spannendes Ziel zukünftiger Studien.

Nicht zuletzt sollte die genaue Funktion von LILRB4 in neurodegenerativen Erkrankungen im Hinblick auf seine vielen Polymorphismen intensiver erforscht werden, deren verschiedene Bedeutungen noch unbekannt sind (Chang C C et al. 2008). Es ist nicht ausgeschlossen, dass bestimmte Polymorphismen von LILRB4 zu einer immunologischen Dysbalance oder zu neurodegenerativen Erkrankungen im ZNS beitragen können.

Verschiedene Autoren (Suciu-Foca et al. 2007; Jiang Z et al. 2017; Deng et al. 2018) haben LILRB4 als sehr erfolgsversprechendes therapeutisches Ziel beschrieben, das bereits bei einigen Tumorerkrankungen Anwendung fand. Sollte seine Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen bestätigt werden, stellt LILRB4 möglicherweise aus den hier aufgezählten Gründen einen erfolgsversprechenden Therapieansatz dar.

## 6 ANHANG

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

+/+	Wildtyp
-/-	homozygot für das Knockout- Allel
°C	Grad Celsius
μ	mikro-
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AML	Akute myeloische Leukämie
Amyloid β	Aβ
APC	Allophycocyanin
APCs	antigen presenting cells (Antigen präsentierende Zellen)
ass.	assoziiert
BDNF	brain- derived neurotrophic factor (vom Gehirn stammender neurotropher Faktor)
BMMC	bonemarrow monocytes (Knochenmarksmonozyten)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bsp.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differencation
cDNA	komplementäre DNA
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CSF	colony stimulating factor (Kolonie- stimulierender Faktor)
d	day (Tag)
d.h.	das heißt
DAMPs	damage associated molecular patterns (Schaden-assoziierte molekulare Muster)
DAP12	DNAX- activation protein 12 (DNAX- Aktivierungsprotein 12)

DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleotid acid (Desoxyribonukleotidsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
FcR	Fc Rezeptor
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	foward scatter
g	Fallbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phospatdehydrogenase
Gdnf	Glial cell-derived neurotrophic factor (von Gliazellen abstam- mender neurotropher Faktor)
ggf.	gegebenenfalls
h	hour (Stunde)
HBSS	Hank`s Balances Salt Solution
HLA	Humane Leukozytenantigene
IB4	Isolektin
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin- like growth factor (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleucin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
i. V. m.	im Vergleich mit
kDa	kiloDalton
ICC	Immuncytochemie
IFN	Interferon
LILR	Leucocyte immunglobulin-like receptor
LPS	Lipopolysaccharid
MAP- Kinase	mitogen-activated protein kinase (mitogen- aktivierte Proteinki- nase)
MG	Mikroglia

MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	minute (Minute)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-RNA)
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
n	nano-
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Nuklearer Faktor 'kappa-leichte-Ketten-Enhancer' von aktivierten B-Zellen)
NGF	nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor)
NGS	normal goat serum (normales Ziegenserum)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	Nod-like receptor (Nod-artiger Rezeptor)
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic (Nicht-fettleibig-diabetisch)/ Severe Combined Immunodeficiency (schwerer kombinierter Immundefekt)
NRT	no reverse transcriptase control
NT	Neurotrophin
NTC	nontemplate control
p.	page (Seite)
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphat buffered saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PLC $\gamma$	Phospholipase C
pMG	primäre Mikroglia
pMP	peritoneale Makrophagen
PRR	pattern recognition receptor (Mustererkennungsrezeptor)
RT qPCR	Real Time quantitative Polymerasekettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	second (Sekunde)
SH2	Src-homology 2

SHIP	SH2- containing inositol polyphosphate 5-phosphatases
SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase
s.	siehe
Siglec	Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
SLP-76	SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa
SNP	single-nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SSC	sideward scatter
Syk	spleen tyrosin kinase (Milz Tyrosin Kinase)
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TGF $\beta$ R	TGF $\beta$ Rezeptor
TH- Zelle	T- Helfer- Zelle
TLR	toll-like receptor (Toll-artiger Rezeptor)
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (Auslösender Rezeptor, der auf myeloiden Zellen exprimiert ist 2)
tw.	teilweise
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Vgl.	Vergleich
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
Zap-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70 (Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase 70)
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 6.2 Literaturverzeichnis

- Abutbul S; Shapiro J; Szaingurten-Solodkin I; Levy N; Carmy Y; Baron R et al. (2012): TGF- $\beta$  signaling through SMAD2/3 induces the quiescent microglial phenotype within the CNS environment. In *Glia* (60). DOI: 10.1002/glia.22343.
- Ajami, Bahareh; Bennett, Jami L.; Krieger, Charles; Tetzlaff, Wolfram; Rossi, Fabio M. V. (2007): Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. In *Nature neuroscience* 10 (12), pp. 1538–1543. DOI: 10.1038/nn2014.
- Allen J M; Seed B (1989): Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. In *Science (New York, N.Y.)* (243), pp. 378–381. DOI: 10.1126/science.2911749.
- Alliot F; Godin I; Pessac B (1999): Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. Edited by Dev. Brain Res. 117.
- Apweiler R (1999): On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (1473), pp. 4–8. DOI: 10.1016/S0304-4165(99)00165-8.
- Arm J P; Nwankwo C; Austen K F (1997): Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49B1 inhibitory receptor. In *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* (159), pp. 2342–2349.
- Arnemann J. (2019): DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In Axel M. Gressner, Torsten Arndt (Eds.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 719.
- Austyn J M; Gordon S (1981): F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. In *European Journal of Immunology* (11), pp. 805–815. DOI: 10.1002/eji.1830111013.
- Becher B; Antel J P (1996): Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. In *Glia* (18), pp. 1–10. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1136(199609)18:1<1::AID-GLIA1>3.0.CO;2-6.
- Bennett M L; Bennett F C; Liddel S A; Ajami B; Zamanian J L; Fernhoff N B et al. (2016): New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (113), E1738-46. DOI: 10.1073/pnas.1525528113.
- Bialas A R; Stevens B (2013): TGF- $\beta$  signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. In *Nature neuroscience*. DOI: 10.1038/nn.3560.
- Biber K; Neumann H; Inoue K; Boddeke H W (2007): Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. In *Trends in neurosciences* (11), pp. 596–602. DOI: 10.1016/j.tins.2007.08.007.
- Billadeau D D; Leibson P J (2002): ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. In *The Journal of clinical investigation* (109), pp. 161–168. DOI: 10.1172/JCI14843.
- Blasi E; Barluzzi R; Bocchini V; Mazzolla R; Bistoni F (1990): Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. In *Journal of Neuroimmunology* (27), pp. 229–237. DOI: 10.1016/0165-5728(90)90073-V.

- Blasius A L; Beutler B (2010): Intracellular toll-like receptors. In *Immunity* (32), pp. 305–315. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.012.
- Blasius A L; Cella M; Maldonado J; Takai T; Colonna M (2006): Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. In *Blood* (107), pp. 2474–2476. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3746.
- Bohlen, Christopher J.; Bennett, F. Chris; Tucker, Andrew F.; Collins, Hannah Y.; Mulinny, Sara B.; Barres, Ben A. (2017): Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. In *Neuron* 94 (4), 759–773.e8. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.04.043.
- Bolland S; Ravetch J V (2000): Spontaneous Autoimmune Disease in FcγRIIB-Deficient Mice Results from Strain-Specific Epistasis. In *Immunity* (13), pp. 277–285. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)00027-3.
- Borges, Luis; Kubin, Marek; Kuhlman, Tracy (2003): LIR9, an immunoglobulin-superfamily-activating receptor, is expressed as a transmembrane and as a secreted molecule. In *Blood* (101), pp. 1484–1486. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1432.
- Borges L; Cosman D (2000): LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. In *Cytokine & Growth Factor Reviews* (11), pp. 209–217. DOI: 10.1016/S1359-6101(00)00007-1.
- Borges L; Hsu M L; Fanger N; Kubin M; Cosman D (1997): A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (159), pp. 5192–5196.
- Brionne T C; Tesseur I; Masliah E; Wyss-Coray T (2003): Loss of TGF-β1 Leads to Increased Neuronal Cell Death and Microgliosis in Mouse Brain. In *Neuron* (40), pp. 1133–1145. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00766-9.
- Brown D; Trowsdale J; Allen R (2004): The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. In *Tissue antigens* (64), pp. 215–225. DOI: 10.1111/j.0001-2815.2004.00290.x.
- Brown D P; Des Jones C; Anderson K J; Lapaque N; Buerki R A; Trowsdale J; Allen R L (2009): The inhibitory receptor LILRB4 (ILT3) modulates antigen presenting cell phenotype and, along with LILRB2 (ILT4), is upregulated in response to Salmonella infection. In *BMC immunology* (10), p. 56. DOI: 10.1186/1471-2172-10-56.
- Buckland M; Jago C B; Fazekasova H; Scott K; Tan P H; George A J T et al. (2006): Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. In *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* (6), pp. 2046–2059. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01450.x.
- Butovsky, Oleg; Jedrychowski, Mark P.; Moore, Craig S.; Cialic, Ron; Lanser, Amanda J.; Gabriely, Galina et al. (2014): Identification of a unique TGF-β-dependent molecular and functional signature in microglia. In *Nature neuroscience* 17 (1), pp. 131–143. DOI: 10.1038/nn.3599.
- Butovsky O; Weiner H L (2018): Microglial signatures and their role in health and disease. In *Nature reviews. Neuroscience* (19), pp. 622–635. DOI: 10.1038/s41583-018-0057-5.
- Buttgereit A; Lelios I; Yu X; Vrohlig M; Krakoski N R; Gautier E L et al. (2016): Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. In *Nature immunology* (17), pp. 1397–1406. DOI: 10.1038/ni.3585.

- Cambier J C (1995a): Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (155), pp. 3281–3285.
- Cambier J C (1995b): New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). In *Immunology Today* (16), p. 110. DOI: 10.1016/0167-5699(95)80105-7.
- Cardona A E; Piro E P; Sasse M E; Kostenko V; Cardona S M; Dijkstra I M et al. (2006): Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. In *Nature neuroscience* (9), pp. 917–924. DOI: 10.1038/nn1715.
- Castells M C; Klickstein L B; Hassani K; Cumplido J A; Lacouture M E; Austen K F; Katz H R (2001): gp49B1-alpha(v)beta3 interaction inhibits antigen-induced mast cell activation. In *Nature immunology* (2), pp. 436–442. DOI: 10.1038/87749.
- Cella M; Döhning C; Samaridis J; Dessing M; Brockhaus M; Lanzavecchia A; Colonna M (1997): A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. In *The Journal of experimental medicine* (185), pp. 1743–1751. DOI: 10.1084/jem.185.10.1743.
- Chang C C; Ciubotariu R; Manavalan J S; Yuan J; Colovai A I; Piazza F et al. (2002): Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. In *Nature immunology* (3), pp. 237–243. DOI: 10.1038/ni760.
- Chang C C; Silvia E A; Ho E K; Vlad G; Suciuc-Foca N; Vasilescu E R (2008): Polymorphism and linkage disequilibrium of immunoglobulin-like transcript 3 gene. In *Human immunology* (69), pp. 284–290. DOI: 10.1016/j.humimm.2008.02.004.
- Cheng, Hao; Mohammed, Fiyaz; Nam, Gol; Chen, Yong; Qi, Jianxun; Garner, Lee I. et al. (2011): Crystal structure of leukocyte Ig-like receptor LILRB4 (ILT3/LIR-5/CD85k): a myeloid inhibitory receptor involved in immune tolerance. In *The Journal of biological chemistry* 286 (20), pp. 18013–18025. DOI: 10.1074/jbc.M111.221028.
- Clynes R; Maizes J S; Guinamard R; Ono M; Takai T; Ravetch J V (1999): Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. In *The Journal of experimental medicine* (189), pp. 179–185. DOI: 10.1084/jem.189.1.179.
- Colonna M; Nakajima H; Navarro F; López-Botet M (1999): A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. In *Journal of leukocyte biology* (66), pp. 375–381. DOI: 10.1002/jlb.66.3.375.
- Colonna M; Navarro F; Bellón T; Llano M; García P; Samaridis J et al. (1997): A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. In *The Journal of experimental medicine* (186), pp. 1809–1818. DOI: 10.1084/jem.186.11.1809.
- Colonna M; Samaridis J; Cella M; Angman L; Allen R L; O'Callaghan C A et al. (1998): Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (160), pp. 3096–3100.
- Colovai A I; Tsao L; Wang S; Lin H; Wang C; Seki T et al. (2007): Expression of inhibitory receptor ILT3 on neoplastic B cells is associated with lymphoid tissue involvement in chronic lymphocytic leukemia. In *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* (72), pp. 354–362. DOI: 10.1002/cyto.b.20164.
- Cortesini R (2007): Pancreas cancer and the role of soluble immunoglobulin-like transcript 3 (ILT3). In *Journal of the pancreas* (8), pp. 697–703.

- Cosman, David; Fanger, Neil; Borges, Luis; Kubin, Marek; Chin, Wilson; Peterson, Lori; Hsu, Mei-Ling (1997): A Novel Immunoglobulin Superfamily Receptor for Cellular and Viral MHC Class I Molecules. In *Immunity* (7), pp. 273–282. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80529-4.
- Daheshia M; Friend D S; Grusby M J; Austen K F Katz H R (2001): Increased severity of local and systemic anaphylactic reactions in gp49B1-deficient mice. In *The Journal of experimental medicine* (194), pp. 227–234. DOI: 10.1084/jem.194.2.227.
- Dai X; Li N; Le Y; Chen Z; Hua R; Qin X; Zhang Y (2015): Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway. In *Cell stress & chaperones* (20), pp. 321–331. DOI: 10.1007/s12192-014-0552-1.
- Damen J E; Ware M D; Kalesnikoff J; Hughes M R; Krystal G (2001): SHIP's C-terminus is essential for its hydrolysis of PIP3 and inhibition of mast cell degranulation. In *Blood* (97), pp. 1343–1351. DOI: 10.1182/blood.v97.5.1343.
- Das A; Kim S H; Arifuzzaman S; Yoon T; Chai J C; Lee Y S et al. (2016): Transcriptome sequencing reveals that LPS-triggered transcriptional responses in established microglia BV2 cell lines are poorly representative of primary microglia. In *Journal of neuroinflammation* (13), p. 182. DOI: 10.1186/s12974-016-0644-1.
- de Goeje P L; Bezemer K; Heuvers M E; Dingemans A M C; Groen H J; Smit E F et al. (2015): Immunoglobulin-like transcript 3 is expressed by myeloid-derived suppressor cells and correlates with survival in patients with non-small cell lung cancer. In *Oncoimmunology* (4), e1014242. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1014242.
- Del Rio-Hortega P (1919): El tercer elemento de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la macroglia.
- Del Rio-Hortega P (1932): Cytology & Cellular Pathology of the Nervous System: Hoeber.
- Deng, Mi; Gui, Xun; Kim, Jaehyup; Xie, Li; Chen, Weina; Li, Zunling et al. (2018): LI-LRB4 signalling in leukaemia cells mediates T cell suppression and tumour infiltration. In *Nature* (562), pp. 605–609. DOI: 10.1038/s41586-018-0615-z.
- Des Jones, C.; Roghanian, Ali; Brown, Damien P.; Chang, Chiwen; Allen, Rachel L.; Trowsdale, John; Young, Neil T. (2009): Alternative mRNA splicing creates transcripts encoding soluble proteins from most LILR genes. In *European Journal of Immunology* 39 (11), pp. 3195–3206. DOI: 10.1002/eji.200839080.
- Dias J M; Alekseenko Z; Applequist J M; Ericson J (2014): Tgf $\beta$  signaling regulates temporal neurogenesis and potency of neural stem cells in the CNS. In *Neuron* (84), pp. 927–939. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.10.033.
- Fanger N A; Borges L; Cosman D (1999): The leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIRs): a new family of immune regulators. In *Journal of leukocyte biology* (66), pp. 231–236. DOI: 10.1002/jlb.66.2.231.
- Fedoric B Krishnan R (2008): Rapamycin downregulates the inhibitory receptors ILT2, ILT3, ILT4 on human dendritic cells and yet induces T cell hyporesponsiveness independent of FoxP3 induction. In *Immunology letters* (120), pp. 49–56. DOI: 10.1016/j.imlet.2008.06.009.
- Ford A L; Goodsall A L; Hickey W F; Sedgwick J D (1995): Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to

- myelin basic protein-reactive CD4<sup>+</sup> T cells compared. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (154), pp. 4309–4321.
- Fourgeaud L; Través P G; Tufail Y; Leal-Bailey H; Lew E D; Burrola P G et al. (2016): TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. In *Nature* (532), pp. 240–244. DOI: 10.1038/nature17630.
- Fütterer K; Wong J; Grucza R A; Chan A C; Waksman G (1998): Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. In *Journal of molecular biology* (281), pp. 523–537. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1964.
- Garcia J A; Cardona S M; Cardona A E (2014): Isolation and analysis of mouse microglial cells. In *Current protocols in immunology* (104), 14.35.1-14.35.15. DOI: 10.1002/0471142735.im1435s104.
- Ginhoux F; Greter M; Leboeuf M; Nandi S; See P; Gokhan S et al. (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. In *Science (New York, N.Y.)* (330), pp. 841–845. DOI: 10.1126/science.1194637.
- Giulian D; Baker T J (1986): Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. In *The Journal of Neuroscience* (8), pp. 2163–2178. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.06-08-02163.1986.
- Gleissner C A; Zastrow A; Klingenberg R; Kluger M S; Konstandin M; Celik S Haemmerling S et al. (2007): IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. In *Eur. J. Immunol.* (37), pp. 177–192. DOI: 10.1002/eji.200636498.
- Gomez-Nicola D; Perry V H (2015): Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. In *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* (22), pp. 169–184. DOI: 10.1177/1073858414530512.
- Grabert K; Michael T; Karavolos M H; Clohisey S; Baillie J K; Stevens M P et al. (2016): Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. In *Nature neuroscience* (19), pp. 504–516. DOI: 10.1038/nn.4222.
- Gu X; Laouar A; Wan J; Daheshia M; Lieberman J; Yokoyama W M et al. (2003): The gp49B1 inhibitory receptor regulates the IFN-gamma responses of T cells and NK cells. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (170), pp. 4095–4101. DOI: 10.4049/jimmunol.170.8.4095.
- Hanisch U K; Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature Publishing Group.
- He Y; Yao X; Taylor N; Bai Y; Lovenberg T; Bhattacharya A (2018): RNA sequencing analysis reveals quiescent microglia isolation methods from postnatal mouse brains and limitations of BV2 cells. In *Journal of neuroinflammation* (15), p. 153. DOI: 10.1186/s12974-018-1195-4.
- Herbomel P; Thisse B; Thisse C (2001): Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. In *Developmental biology* (238), pp. 274–288. DOI: 10.1006/dbio.2001.0393.
- Hoek R M; Ruuls S R; Murphy C A; Wright G J; Goddard R; Zurawski S M et al. (2000): Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). In *Science (New York, N.Y.)*, pp. 1768–1771. DOI: 10.1126/science.290.5497.1768.

- Holtman I R; Raj D D; Miller J A; Schaafsma W; Yin Z; Brouwer N et al. (2015): Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. In *Acta neuropathologica communications* (3), p. 31. DOI: 10.1186/s40478-015-0203-5.
- Hulett M D; Osman N; McKenzie I F; Hogarth P M (1991): Chimeric Fc receptors identify functional domains of the murine high affinity receptor for IgG. In *The Journal of Immunology* (147), p. 1863.
- Isaji T; Sato Y; Zhao Y; Miyoshi E; Wada Y; Taniguchi N; Gu J (2006): N-glycosylation of the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit is essential for alpha5beta1 heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function. In *The Journal of biological chemistry* (281), pp. 33258–33267. DOI: 10.1074/jbc.M607771200.
- Isakov N (1997): ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. In *Immunologic research* (16), pp. 85–100. DOI: 10.1007/BF02786325.
- Jiang Z; Qin J J; Zhang Y; Cheng W L; Ji Y X; Gong F H et al. (2017): LILRB4 deficiency aggravates the development of atherosclerosis and plaque instability by increasing the macrophage inflammatory response via NF- $\kappa$ B signaling. In *Clinical science (London, England)* (131), pp. 2275–2288. DOI: 10.1042/CS20170198.
- Ju X S; Hacker C; Scherer B; Redecke V; Berger T; Schuler G et al. (2004): Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. In *Gene* (331), pp. 159–164. DOI: 10.1016/j.gene.2004.02.018.
- Kamphuis W; Kooijman L; Schetters S; Orre M; Hol E M (2016): Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease. In *Biochimica et biophysica acta* (1862), pp. 1847–1860. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.07.007.
- Kang, Xunlei; Kim, Jaehyup; Deng, Mi; John, Samuel; Chen, Heyu; Wu, Guojin et al. (2016): Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. In *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* (15), pp. 25–40. DOI: 10.1080/15384101.2015.1121324.
- Katz H R (2007): Inhibition of pathologic inflammation by leukocyte Ig-like receptor B4 and related inhibitory receptors. In *Immunol Rev* (217), :222-230.
- Kawabata M (1998): Signal transduction by bone morphogenetic proteins. In *Cytokine & Growth Factor Reviews* (9), pp. 49–61. DOI: 10.1016/S1359-6101(97)00036-1.
- Kawai T; Akira S (2011): Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. In *Immunity* (34), pp. 637–650. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
- Kelly A; Houston S A; Sherwood E; Casulli J; Travis M A (2017): Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF $\beta$ . In *Advances in immunology* (134), pp. 137–233. DOI: 10.1016/bs.ai.2017.01.001.
- Keren-Shaul H; Spinrad A; Weiner A; Matcovitch-Natan O; Dvir-Szternfeld R; Ulland T K et al. (2017): A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. In *Cell* (169), 1276-1290.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.018.
- Kettenmann H; Hanisch U K; Noda M; Verkhratsky A (2011): Physiology of Microglia. In *Physiological reviews* 91 (2), pp. 461–553. DOI: 10.1152/physrev.00011.2010.

Kiefer, Reinhard; Streit, Wolfgang J.; Toyka, Klaus V.; Kreutzberg, Georg W.; Hartung, Hans-Peter (1995): Transforming growth factor- $\beta$ 1: A lesion-associated cytokine of the nervous system. In *International Journal of Developmental Neuroscience* 13 (3-4), pp. 331–339. DOI: 10.1016/0736-5748(94)00074-D.

Kierdorf, Katrin; Erny, Daniel; Goldmann, Tobias; Sander, Victor; Schulz, Christian; Perdiguero, Elisa Gomez et al. (2013): Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. In *Nature neuroscience* 16 (3), pp. 273–280. DOI: 10.1038/nn.3318.

Kim S S; Kong P J; Kim B S; Sheen D H; Nam S Y; Chun W (2004): Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. In *Archives of pharmacal research* (27), pp. 314–318. DOI: 10.1007/bf02980066.

Kim-Schulze S; Seki T; Vlad G; Scotto L; Fan J; Colombo P C et al. (2006): Regulation of ILT3 gene expression by processing of precursor transcripts in human endothelial cells. In *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* (6), pp. 76–82. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2005.01162.x.

Koch S; Goedde R; Nigmatova V; Epplen J T; Müller N; de Seze J et al. (2005): Association of multiple sclerosis with ILT6 deficiency. In *Genes and immunity* (6), pp. 445–447. DOI: 10.1038/sj.gene.6364187.

Koerten H K; Ploem J S; Daems W Th (1980): Ingestion of latex beads by filopodia of adherent mouse peritoneal macrophages. A scanning electron microscopical and reflection contrast microscopical study. In *Experimental Cell Research* (128), pp. 470–475. DOI: 10.1016/0014-4827(80)90084-1.

Konishi, Hiroyuki; Kobayashi, Masaaki; Kunisawa, Taikan; Imai, Kenta; Sayo, Akira; Malissen, Bernard et al. (2017): Siglec-H is a microglia-specific marker that discriminates microglia from CNS-associated macrophages and CNS-infiltrating monocytes. In *Glia* 65 (12), pp. 1927–1943. DOI: 10.1002/glia.23204.

Konishi H; Kiyama H (2018): Microglial TREM2/DAP12 Signaling: A Double-Edged Sword in Neural Diseases. In *Frontiers in cellular neuroscience* (12), p. 206. DOI: 10.3389/fncel.2018.00206.

Kopatz, Jens; Beutner, Clara; Welle, Kristian; Bodea, Liviu G.; Reinhardt, Julia; Claude, Janine et al. (2013): Siglec-h on activated microglia for recognition and engulfment of glioma cells. In *Glia* 61 (7), pp. 1122–1133. DOI: 10.1002/glia.22501.

Krasemann S; Madore C; Cialic R; Baufeld C; Calcagno N; El Fatimy R et al. (2017): The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. In *Immunity* (47), 566-581.e9. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.

Kulkarni A B; Karlsson S (1993): Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. In *The American Journal of Pathology* (143).

Laurenzi M A; Arcuri C; Rossi R; Marconi P; Bocchini V (2001): Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. In *Neurochemical research* (26), pp. 1209–1216. DOI: 10.1023/a:1013911205494.

Lawson L J; Perry V H; Dri P; Gordon S (1990): Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Edited by Neuroscience.

Linnartz, Bettina; Wang, Yiner; Neumann, Harald (2010): Microglial immunoreceptor tyrosine-based activation and inhibition motif signaling in neuroinflammation. In *International journal of Alzheimer's disease* 2010. DOI: 10.4061/2010/587463.

Linnartz B; Neumann H (2013): Microglial activatory (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)- and inhibitory (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)-signaling receptors for recognition of the neuronal glycocalyx. In *Glia* (61). DOI: 10.1002/glia.22359.

Lu H K (2011): Mechanism of the Inhibitory Effects of Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor B4 (LILRB4) on Monocytes.

Lu H K; Rentero C; Raftery M J; Borges L; Bryant K; Tedla N (2009): Leukocyte Ig-like receptor B4 (LILRB4) is a potent inhibitor of FcγRI-mediated monocyte activation via dephosphorylation of multiple kinases. In *The Journal of biological chemistry* (284), pp. 34839–34848. DOI: 10.1074/jbc.M109.035683.

Macauley M S; Crocker P R; Paulson J C (2014): Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. In *Nature reviews. Immunology* (14), pp. 653–666. DOI: 10.1038/nri3737.

Maher K J; Fletcher M A (2005): Quantitative flow cytometry in the clinical laboratory. In *Clinical and Applied Immunology Reviews* (5), pp. 353–372. DOI: 10.1016/j.cair.2005.10.001.

Mamegano K; Kuroki K; Miyashita R; Kusaoi M; Kobayashi S; Matsuta K et al. (2008): Association of LILRA2 (ILT1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. In *Genes and immunity* (9), pp. 214–223. DOI: 10.1038/gene.2008.5.

Manavalan J S; Kim-Schulze S; Scotto L; Naiyer A J; Vlad G; Colombo P C et al. (2004): Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. In *International immunology* (16), pp. 1055–1068. DOI: 10.1093/intimm/dxh107.

Martin A M; Kulski J K; Witt C; Pontarotti P; Christiansen F T (2002): Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. In *Trends in immunology* (23), pp. 81–88. DOI: 10.1016/S1471-4906(01)02155-X.

Massagué J; Wotton D (2000): Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. In *The EMBO journal* (19). DOI: 10.1093/emboj/19.8.1745.

Matcovitch-Natan, Orit; Winter, Deborah R.; Giladi, Amir; Vargas Aguilar, Stephanie; Spinrad, Amit; Sarrazin, Sandrine et al. (2016): Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. In *Science (New York, N.Y.)* (353), aad8670. DOI: 10.1126/science.aad8670.

Melief J; Sneeboer M A; Litjens M; Ormel P R; Palmén S J; Huitinga I et al. (2016): Characterizing primary human microglia: A comparative study with myeloid subsets and culture models. In *Glia* (64), pp. 1857–1868. DOI: 10.1002/glia.23023.

Mittag A; Tárnok A (2009): Basics of standardization and calibration in cytometry--a review. In *Journal of biophotonics* (2), pp. 470–481. DOI: 10.1002/jbio.200910033.

Mott R T; Ait-Ghezala G; Town T; Mori T; Vendrame M; Zeng J et al. (2004): Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. In *Glia* 46 (4), pp. 369–379. DOI: 10.1002/glia.20009.

Nakamura Y (2002): Regulating factors for microglial activation. In *Biological & pharmaceutical bulletin* (8), pp. 945–953. DOI: 10.1248/bpb.25.945.



- Nimmerjahn A; Kirchhoff F; Helmchen F (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Edited by Science 308.
- Nissl F (1899): Über einige Beziehungen zu Nervenzellerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. Edited by 656-676 Arch Psychiatrie 32.
- O'Keefe T L; Williams G T; Batista F D; Neuberger M S (1999): Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. In *The Journal of experimental medicine* (189), pp. 1307–1313. DOI: 10.1084/jem.189.8.1307.
- Olson J K; Miller S D (2004): Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. In *Journal of immunology* (173), pp. 3916–3924. DOI: 10.4049/jimmunol.173.6.3916.
- Ordóñez D; Sánchez A J; Martínez-Rodríguez J E; Cisneros E; Ramil E; Romo N et al. (2009): Multiple sclerosis associates with LILRA3 deletion in Spanish patients. In *Genes and immunity* (10), pp. 579–585. DOI: 10.1038/gene.2009.34.
- Palazuelos J; Klingener M; Aguirre A (2014): TGF $\beta$  signaling regulates the timing of CNS myelination by modulating oligodendrocyte progenitor cell cycle exit through SMAD3/4/FoxO1/Sp1. In *The Journal of Neuroscience* (34), pp. 7917–7930. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0363-14.2014.
- Paolicelli R C; Bolasco G; Pagani F; Maggi L; Scianni M; Panzanelli P et al. (2011): Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. In *Science (New York, N.Y.)* 333 (6048), pp. 1456–1458. DOI: 10.1126/science.1202529.
- Park M (2016): Regulation of monocyte/ macrophage activation by Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor 4 (LILRB4), 54 (78).
- Penna G; Roncari A; Amuchastegui S; Daniel K C; Berti E; Colonna M; Adorini L (2005): Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. In *Blood* (106), pp. 3490–3497. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2044.
- Perry V H; Hume D A; Gordon S (1985): Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. In *Neuroscience* (15), pp. 313–326. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90215-5.
- Perry V H; Teeling J (2013): Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. In *Seminars in immunopathology* (35), pp. 601–612. DOI: 10.1007/s00281-013-0382-8.
- Pitcher L A; van Oers N S C (2003): T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? In *Trends in immunology* (2410), pp. 554–560. DOI: 10.1016/j.it.2003.08.003.
- Ransohoff R M (2016): A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? In *Nature neuroscience* (19), pp. 987–991. DOI: 10.1038/nn.4338.
- Ransohoff R M; Cardona A E (2010): The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. In *Nature* (468), pp. 253–262. DOI: 10.1038/nature09615.
- Ravetch J V; Bolland S (2001): IgG Fc receptors. In *Annual review of immunology* (19), pp. 275–290. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275.
- Ravetch J V; Lanier L L (2000): Immune inhibitory receptors. In *Science (New York, N.Y.)* (290), pp. 84–89. DOI: 10.1126/science.290.5489.84.
- Rea D; van Kooten C; van Meijgaarden K E; Ottenhoff T H; Melief C J; Offringa R (2000): Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative

- activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. In *Blood* (95), pp. 3162–3167.
- Réu P; Khosravi A; Bernard S; Mold J E; Salehpour M; Alkass K et al. (2017): The Life-span and Turnover of Microglia in the Human Brain. In *Cell reports* (20), pp. 779–784. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.004.
- Rietschel E T; Brade H (1992): Bacterial endotoxins. In *Scientific American* (267), pp. 54–61. DOI: 10.1038/scientificamerican0892-54.
- Rivest S; Lacroix S; Vallières L; Nadeau S; Zhang J; Laflamme N (2000): How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* (223), pp. 22–38. DOI: 10.1046/j.1525-1373.2000.22304.x.
- Robertson W (1899): On a new method of obtaining a black reaction in certain tissue elements of the central nervous system. Edited by Scottish Med Surg J 4, 23.
- Sada K; Takano T; Yanagi S; Yamamura H (2001): Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. In *J Biochem* (130), pp. 177–186. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002970.
- Saijo K; Glass C K (2011): Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. In *Nature reviews. Immunology* (11), pp. 775–787. DOI: 10.1038/nri3086.
- Samelson L E (2002): Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. In *Annual review of immunology* (20), pp. 371–394. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.092601.111357.
- Sarkar S; Malovic E; Sarda D; Lawana V; Rokad D; Jin H et al. (2018): Characterization and comparative analysis of a new mouse microglial cell model for studying neuro-inflammatory mechanisms during neurotoxic insults. In *Neurotoxicology* (67), pp. 129–140. DOI: 10.1016/j.neuro.2018.05.002.
- Schafer D P; Stevens B (2013): Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. In *Current opinion in neurobiology* (23), pp. 1034–1040. DOI: 10.1016/j.conb.2013.09.012.
- Schlitzer A; Sivakamasundari V; Chen J; Sumatoh H R B; Schreuder J; Lum J et al. (2015): Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. In *Nature immunology* (16), pp. 718–728. DOI: 10.1038/ni.3200.
- Schmitt H; Sell S; Koch J; Seefried M; Sonnewald S; Daniel C et al. (2016): Siglec-H protects from virus-triggered severe systemic autoimmunity. In *The Journal of experimental medicine* (213), pp. 1627–1644. DOI: 10.1084/jem.20160189.
- Schulz C; Gomez Perdiguero E; Chorro L; Szabo-Rogers H; Cagnard N; Kierdorf K et al. (2012): A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. In *Science (New York, N.Y.)* (336), pp. 86–90. DOI: 10.1126/science.1219179.
- Shi S H; Jan L Y; Jan Y N (2003): Hippocampal Neuronal Polarity Specified by Spatially Localized mPar3/mPar6 and PI 3-Kinase Activity. In *Cell* (112), pp. 63–75. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01249-7.
- Shull M M; Ormsby I; Kier A B; Pawlowski S; Diebold R J; Yin M et al. (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. In *Nature* (359), pp. 693–699. DOI: 10.1038/359693a0.

- Sierra A; Encinas J M; Deudero J J P; Chancey J H; Enikolopov G; Overstreet-Wadiche L S et al. (2010): Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. In *Cell stem cell* (7), pp. 483–495. DOI: 10.1016/j.stem.2010.08.014.
- Spittau, Björn; Wullkopf, Lena; Zhou, Xiaolai; Rilka, Jennifer; Pfeifer, Dietmar; Kriegstein, Kerstin (2013): Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro. In *Glia* 61 (2), pp. 287–300. DOI: 10.1002/glia.22435.
- Stipursky J; Francis D; Dezonne R S; Bérnago de Araújo A P; Souza L; Moraes C A; Alcántara G, Flávia C. (2014): TGF- $\beta$ 1 promotes cerebral cortex radial glia-astrocyte differentiation in vivo. In *Frontiers in cellular neuroscience* (8), p. 393. DOI: 10.3389/fncel.2014.00393.
- Suciu-Foca, Nicole; Feirt, Nikki; Zhang, Qing-Yin; Vlad, George; Liu, Zhuoru; Lin, Hana et al. (2007): Soluble Ig-like transcript 3 inhibits tumor allograft rejection in humanized SCID mice and T cell responses in cancer patients. In *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* (178), pp. 7432–7441. DOI: 10.4049/jimmunol.178.11.7432.
- Takagi H; Fukaya T; Eizumi K; Sato Y; Sato K; Shibasaki A et al. (2011): Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity in vivo. In *Immunity* (35), pp. 958–971. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.10.014.
- Takahashi M; Kuroki Y; Ohtsubo K; Taniguchi N (2009): Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. In *Carbohydrate research* (344), pp. 1387–1390. DOI: 10.1016/j.carres.2009.04.031.
- Tamashiro T T; Dalgard C L; Byrnes K R (2012): Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue. In *Journal of visualized experiments* (66), e3814. DOI: 10.3791/3814.
- Tedla N; Lee C W; Borges L; Geczy C L; Arm J P (2008): Differential expression of leukocyte immunoglobulin-like receptors on cord-blood-derived human mast cell progenitors and mature mast cells. In *Journal of leukocyte biology* (83), pp. 334–343. DOI: 10.1189/jlb.0507314.
- Timmerman R; Burm S M; Bajramovic J J (2018): An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. In *Frontiers in cellular neuroscience* (12), p. 242. DOI: 10.3389/fncel.2018.00242.
- Travis M A; Sheppard D (2014): TGF- $\beta$  activation and function in immunity. In *Annual review of immunology* (32), pp. 51–82. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120257.
- van der Touw W; Chen H M; Pan P Y; Chen S H (2017): LILRB receptor-mediated regulation of myeloid cell maturation and function. In *Cancer immunology, immunotherapy: CII* (66), pp. 1079–1087. DOI: 10.1007/s00262-017-2023-x.
- Virchow R (1846): Über das granulirte Ansehen der Wanderung der Gehirnvventrikel. In *Zeitschrift für Psychiatrie* (2), p. 242.
- Vivier E; Daëron M (1997): Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. In *Immunology Today* (18), pp. 286–291. DOI: 10.1016/S0167-5699(97)80025-4.
- Vlad G; D'Agati V D; Zhang Q Y; Liu Z; Ho E K; Mohanakumar T et al. (2008): Immunoglobulin-like transcript 3-Fc suppresses T-cell responses to allogeneic human islet transplants in hu-NOD/SCID mice. In *Diabetes* (57), pp. 1878–1886. DOI: 10.2337/db08-0054.

- Vlad G; Liu Z; Zhang Q Y; Cortesini R; Suciú-Foca N (2006): Immunosuppressive activity of recombinant ILT3. In *International Immunopharmacology* (6), pp. 1889–1894. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.07.017.
- Voet S; Mc Guire C; Hagemeyer N; Martens A; Schroeder A; Wieghofer P et al. (2018): A20 critically controls microglia activation and inhibits inflammasome-dependent neuroinflammation. In *Nature communications* (9), p. 2036. DOI: 10.1038/s41467-018-04376-5.
- Wagner M; Koester H; Deffge C; Weinert S; Lauf J; Francke A et al. (2014): Isolation and intravenous injection of murine bone marrow derived monocytes. In *Journal of visualized experiments* (94). DOI: 10.3791/52347.
- Wake H; Moorhouse A J; Jinno S; Kohsaka S; Nabekura J (2009): Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. In *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009 (13), pp. 3974–3980. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009.
- Wakselman S; Béchade C; Roumier A; Bernard D; Triller A; Bessis A (2008): Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. In *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* (28), pp. 8138–8143. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1006-08.2008.
- Wang L L; Chu D T; Dokun A O; Yokoyama W M (2000): Inducible expression of the gp49B inhibitory receptor on NK cells. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (164), pp. 5215–5220. DOI: 10.4049/jimmunol.164.10.5215.
- Y Cajal R (1913): Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. In *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid 11: 255-315*.
- Yawata M; Yawata N; Draghi M; Little A M; Partheniou F; Parham P (2006): Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. In *The Journal of experimental medicine* (203), pp. 633–645. DOI: 10.1084/jem.20051884.
- Zhang F; Zheng J; Kang X; Deng M; Lu Z; Kim J; Zhang C (2015): Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in cancer development. In *Science China. Life sciences* (58), pp. 1216–1225. DOI: 10.1007/s11427-015-4925-1.
- Zhang J; Raper A; Sugita N; Hingorani R; Salio M; Palmowski M J et al. (2006): Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. In *Blood* (107), pp. 3600–3608. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3842.
- Zhao Y; Sato Y; Isaji T; Fukuda T; Matsumoto A; Miyoshi E et al. (2008): Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. In *The FEBS journal* (275), pp. 1939–1948. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06346.x.
- Zhou J S; Friend D S; Feldweg A M; Daheshia M; Li L; Austen K F; Katz H R (2003): Prevention of lipopolysaccharide-induced microangiopathy by gp49B1: evidence for an important role for gp49B1 expression on neutrophils. In *The Journal of experimental medicine* (198), pp. 1243–1251. DOI: 10.1084/jem.20030906.
- Zhou J S; Friend D S; Lee D M; Li L; Austen K F; Katz H R (2005): gp49B1 deficiency is associated with increases in cytokine and chemokine production and severity of proliferative synovitis induced by anti-type II collagen mAb. In *Eur. J. Immunol.* (35), pp. 1530–1538. DOI: 10.1002/eji.200425895.

Zöller T; Attaai A; Potru P S; Ruß T; Spittau B (2018): Aged Mouse Cortical Microglia Display an Activation Profile Suggesting Immunotolerogenic Functions. In *International journal of molecular sciences* (19). DOI: 10.3390/ijms19030706.

Zusso M; Methot L; Lo R; Greenhalgh A D; David S; Stifani S (2012): Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. In *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (33), pp. 11285–11298. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6182-11.2012.

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mögliche Darstellung der Mikroglia-Phänotypen .....	9
Abb. 2: Maus- spezifisches Singlepass- Transmembranprotein Siglec-H.....	12
Abb. 3: LILRB4- vermittelte Hemmung der Monozytenaktivierung (Park M 2016).....	15
Abb. 4: Die extrazelluläre Domäne der LILRB- Rezeptorfamilie (Lu H K 2011) .....	17
Abb. 5: Gating- Strategie mit 2 Farbkanälen für die Durchflusszytometrieversuche ..	35
Abb. 6: TGFβ- induzierte SMAD- Translokation in primären Mikroglia .....	37
Abb. 7: LILRB4- Genexpression der BV2- Zellen.....	38
Abb. 8: LILRB4- Nachweis an der Oberfläche primärer Mikroglia.....	41
Abb. 9: Siglec-H- Nachweis an der Oberfläche primärer Mikroglia .....	43
Abb. 10: Vergleich LILRB4- positiver in vitro und ex vivo Mikroglia .....	45
Abb. 11: Vergleich Siglec-H- positiver in vitro und ex vivo Mikroglia .....	46
Abb. 12: LILRB4- und Siglec-H- Nachweis auf der Oberfläche von ex vivo Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten.....	47
Abb. 13: LILRB4- und Siglec-H- Nachweis auf der Oberfläche von männlichen und weiblichen ex vivo Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmonozyten .....	49

## 6.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien .....	23
Tab. 2: Proteine und Zytokine.....	23
Tab. 3: Inhibitoren und Enzyme.....	23
Tab. 4: Primäre Antikörper .....	23
Tab. 5: Sekundäre Antikörper.....	23
Tab. 6: Andere Färbereagenzien.....	24
Tab. 7: Durchflusszytometrie Antikörper.....	24
Tab. 8: qPCR Primer.....	24
Tab. 9: Kits.....	24
Tab. 10: Geräte.....	24
Tab. 11: Verbrauchsmaterialien.....	25
Tab. 12: Lösungen, Puffer und Medien.....	25
Tab. 13: Software.....	26
Tab. 14: Behandlung der BV2- Zellkulturen .....	27
Tab. 15: RT-qPCR Ausführungsprotokoll.....	28
Tab. 16: RT-qPCR Reaktionsmix .....	28
Tab. 17: Behandlung der primären Mikroglia kulturen.....	30
Tab. 18: Färbung der invitro Mikrogliazellen .....	31
Tab. 19: Percoll-Lösungen/ Tier .....	32
Tab. 20: Färbung der in vivo Mikroglia (MG), Peritonealmakrophagen (pMP) und Knochenmarksmonozyten (BMDC).....	34

## 6.5 Veröffentlichungen

Kretzschmar F; Piecha R; Jahn J; Potru P S; Spittau B (2021): Characterisation of the Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor B4 (*Lilrb4*) Expression in Microglia. In *Biology*, 10(12) 1300. DOI: 10.3390/biology10121300.



## 6.6 Danksagung

Die Arbeit an dieser medizinischen Dissertation war eine große Bereicherung und Erfahrung für mich in vielerlei Hinsicht.

Sie wäre ohne das Mitwirken vieler Personen nicht zustande gekommen. Ich möchte mich daher herzlichst bei den Menschen bedanken, die mich auf dem Weg bis zur Vollendung unterstützt und angeleitet haben.

Ich möchte mich zuerst bei meinem Betreuer und Erstgutachter **Prof. Dr. Björn Spittau** bedanken. Ich danke ihm dafür, dass er mich in meiner Forschung und dem wissenschaftlichen Arbeiten ermutigt hat und mir bei Fragen immer zur Seite stand.

Ebenso geht ein großer Dank an alle Mitarbeiter des Labors im Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock, insbesondere an **Tamara Ruß, Phani Potru und Robin Piecha**, die mir stets mit ihrem Fachwissen zur Seite gestanden haben.

Zuletzt möchte ich **meiner Familie** und auch **Pauline** für ihre großartige Unterstützung danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

## 6.7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Jan Felix Kretzschmar  
 Geburtsdatum: 25.11.1995  
 Geburtsort: Chemnitz  
 Anschrift: Friedrich-Silcher-Straße 2, Rostock

### Schulische Ausbildung

09/2002 – 05/2006: Pablo-Neruda-Grundschule, Chemnitz  
 09/2006 – 09/2012: Johannes-Kepler-Gymnasium, Chemnitz  
 09/2012 – 09/2014: Dr.-Wilhelm-André-Gymnasium, Chemnitz

### Universitäre Ausbildung

10/2014 – 05/2021: Humanmedizin, Universität Rostock  
 2016: 1. Staatsexamen  
 2019: 2. Staatsexamen  
 2020/2021: PJ  
 Innere Medizin- Spital Männedorf/ CH  
 Dermatologie - Uniklinikum Rostock/ Uniklinikum Leipzig  
 Chirurgie - Südstadtklinikum Rostock  
 2021: 3. Staatsexamen

### Dissertation/Promotion

2017 -2020: Promotion im Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock

Titel: „Charakterisierung der *Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptor B4 (LILRB4)*- Expression in Mikroglia“

Publikationen: Kretzschmar F, Piecha R, Jahn J, Potru PS, Spittau B. Characterization of the Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor B4 (Lilrb4) Expression in Microglia. *Biology (Basel)*. 2021;10(12):1300. Published 2021 Dec 9. doi:10.3390/biology10121300