

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Expression von MyD88 auf die Struktur des
murinen Gehirns

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patricia Beatrix Schroeder

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.11.2022

Vorwort

Gemäß den Grundsätzen guter wissenschaftlicher Praxis weise ich darauf hin, dass wesentliche Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit bereits veröffentlicht wurden in: **Schroeder, P.**, Rivalan, M., Zaqout, S., Krüger, C., Schüler, J., Long, M., Meisel, A., Winter, Y., Kaindl, A. M., Lehnardt, S. (2020). Abnormal brain structure and behavior in MyD88-deficient mice. *Brain, Behav Immun.*, 91:181-193.

Inhalt

Vorwort	1
Inhalt.....	2
Tabellenverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis	5
Abstract	8
Zusammenfassung.....	9
1. Einleitung.....	11
1.1. Die Funktion von <i>Toll</i> und dMyD88 bei der Taufliege <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.2. TLR als Toll-Homologe im Säugetier	14
1.3. Die Rolle von TLRs und MyD88 bei der zerebralen Entwicklung des Gehirns	17
1.4. Die Rolle von TLRs und MyD88 bei Inflammation, Immundefekten, neurologischen Entwicklungsstörungen und neurodegenerativen Erkrankungen	19
1.5. TLR-Signalkaskade und phänotypische Veränderungen	21
1.6. Fragestellung/ Zielsetzung.....	22
2. Materialien und Methoden.....	23
2.1. Materialien.....	23
2.2. Mäuse	31
2.3. Methoden.....	32
2.3.1. Volumetrie von Kortex und Gesamthirn	32
2.3.1.1. Paraffinschnittherstellung.....	33
2.3.1.2. Nissl-Färbung	33
2.3.1.3. Analyse mittels ImageJ Software	34
2.3.2. Immunhistochemie und quantitative Analyse zerebraler Zellpopulationen	34
2.3.2.1. Perfusion, Hirnentnahme und Kryokonservierung.....	35
2.3.2.2. Gefrierschnittherstellung	35
2.3.2.3. Immunhistochemie und quantitative Analyse	35
2.3.3. Golgifärbung und morphologische Analyse kortikaler Neurone.....	38
2.3.4. Proteinanalyse mittels Western Blot.....	41
2.3.5. Verhaltensstudien	44
2.3.5.1. SHIRPA.....	45
2.3.5.2. Barnes Maze	46
2.3.5.3. Open Field Test	49
2.3.5.4. Home Cage Scan	50
2.3.5.5. Social Activity Monitoring.....	51
2.4. Statistische Analyse.....	51
3. Ergebnisse	53

3.1.	Analyse der Kortexhöhe und Quantifizierung kortikaler Zellpopulationen in neonatalen MyD88-defizienten Mäusen.....	53
3.2.	Kortikale und neuronale Veränderungen im adulten MyD88-defizienten Tier.....	56
3.2.1.	Erhöhte Anzahl kortikaler und hippocampaler Neurone im adulten MyD88-defizienten Tier	57
3.2.2.	Verstärkte NeuN-Expression im Kortex adulter MyD88-defizienter Tiere	59
3.2.3.	Reduzierte Arborisierung kortikaler Neurone in adulten MyD88-defizienten Mäusen	61
3.2.4.	Erhöhte Mikrogliaanzahl und verstärkte Myelinisierung im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse	62
3.2.5.	Erhöhte Anzahl proliferierender Zellen in der subventrikulären Zone adulter MyD88-defizienter Mäuse	64
3.2.6.	Volumen von Gesamthirn und Neokortex in adulten MyD88-defizienten und WT Tieren nicht signifikant verändert	65
3.3.	Verhaltenstests zeigen spezifischen MyD88-defizienten Phänotyp.....	66
3.3.1.	Adulte MyD88-defiziente Mäuse lernen langsamer und zeigen eine vergleichbare räumliche Kurz- und Langzeitgedächtnisleistung	69
3.3.2.	Adulte MyD88-defiziente Mäuse weisen ein reduziertes exploratives Verhalten und erhöhte Ängstlichkeitslevel auf	71
3.3.3.	MyD88-defiziente Mäuse zeigen vergleichbare Spontanaktivität und Sozialverhalten	72
4.	Diskussion.....	75
4.1.	Diskussion der Hauptergebnisse im Kontext der Literatur	75
4.1.1.	MyD88- und TLR-Defizienz im Kontext muriner Hirnentwicklung	76
4.1.2.	Einfluss der MyD88-Defizienz auf spezifisches Verhalten.....	78
4.2.	Schlussfolgerungen und Ausblick	80
	Literaturverzeichnis	83
	Eidesstattliche Versicherung	92
	Anteilsklärung an erfolgten Publikationen.....	93
	Lebenslauf	94
	Publikationen.....	95
	Danksagung.....	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und sonstiges	24
Tabelle 3: Puffer, Medium und Lösungen	26
Tabelle 4: Antikörper Immunhistochemie	28
Tabelle 5: Antikörper Western Blot	29
Tabelle 6: Geräte und Software.....	30
Tabelle 7: Protokoll Sammel- und Trenngel für Westernblot.....	42
Tabelle 8: SHIRPA-Protokoll – Erhobene Parameter.....	45
Tabelle 9: Home Cage Scan – Verhaltensweisen.....	51
Tabelle 10: Extended SHIRPA-Protokoll modifiziert nach Riken und Irwin.....	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Experimentelles Design der Verhaltensstudien im zeitlichen Überblick...	44
Abbildung 2: Aufbau Barnes Maze.....	47
Abbildung 3: Testaufbau Open Field.....	50
Abbildung 4: Analyse der Kortexhöhe neonataler <i>Myd88</i> ^{-/-} Mäuse.....	54
Abbildung 5: Quantifizierung kortikaler Neurone in neonatalen <i>Myd88</i> ^{-/-} Mäusen.....	54
Abbildung 6: Quantitative Analyse von Gliazellen im neonatalen Kortex von <i>Myd88</i> ^{-/-} Mäusen.....	55
Abbildung 7: Quantifizierung proliferierender Zellen im neonatalen Kortex von <i>Myd88</i> ^{-/-} Mäusen	56
Abbildung 8: Quantifizierung von NeuN ⁺ und DAPI ⁺ Zellen im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse.....	57
Abbildung 9: Quantifizierung von Neuronen im Hippocampus adulter MyD88-defizienter Mäuse.....	59
Abbildung 10: Expressionsanalyse von Neuronen im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse.....	60
Abbildung 11: Expressionsanalyse von Mikroglia und Astrozyten im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse	60
Abbildung 12: Arborisierung kortikaler Neurone in adulten MyD88-defizienten Mäusen.....	61
Abbildung 13: Quantifizierung kortikaler Mikroglia im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse.....	62
Abbildung 14: Analyse kortikaler Myelinisierung adulter MyD88-defizienter Mäuse....	64
Abbildung 15: Quantifizierung proliferierender Zellen in SVZ und SGZ adulter MyD88-defizienter Mäuse.....	65
Abbildung 16: Volumetrie von murinem Kortex und Gesamthirn.....	66
Abbildung 17: Lern- und Gedächtnisleistung MyD88-defizienter Mäuse.....	70
Abbildung 18: Exploratives Verhalten und Angstlevel MyD88-defizienter Mäuse.....	72
Abbildung 19: Spontanaktivität MyD88-defizienter Mäuse	73
Abbildung 20: Aktivität von MyD88-defizienten Mäusen in natürlicher Umgebung.....	74
Abbildung 21: Analyse spezifischer Verhaltensweisen MyD88-defizienter Mäuse in natürlicher Umgebung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

AD	Morbus Alzheimer (Alzheimer's disease)
AOCF	Einrichtung für tierische Verhaltensstudien (Animal outcome core facility)
A β	β -Amyloid
d	Tage (days)
DAMPs	Gefahren-assoziierte-molekulare-Muster (Danger associated molecular patterns)
h	Stunden (hours)
HCS	Home Cage Scan
HSP	Hitzeschockprotein (heat shock protein)
Iba1	Ionisiertes kalziumbindendes Molekül 1 (Ionized calcium adaptor binding molecule 1)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
kDa	kilo Dalton
MBP	Basisches Myelinprotein (Myelin Basic Protein)
min	Minuten
miRNA	mikro-RNA
MyD88	Primäres Antwortgen der myeloiden Differenzierung 88 (Myeloid differentiation primary response 88)
NeuN	neuronale Nuklei
NF- κ B	Nukleärer Faktor Kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells)
NGS	Normales Ziegenserum (Normal goat serum)

NPC	neuronal Vorläuferzellen
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PDVF	Polyvinylidenfluorid
PRR	Muster-erkennende Rezeptoren (Pattern-recognition-receptor)
Rb	Kaninchen (rabbit)
RNA	Ribonukleinsäure
Rt	Ratte (rat)
SAM	Social Activity Monitoring
SEM	Standardfehler (standard error of mean)
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR(s)	Toll-like Rezeptor(en)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing interferon-beta
Tris	Trisaminomethane
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Abstract

In *Drosophila melanogaster* the Toll protein plays a key role in host defense and developmental processes. The role of Toll-like receptors (TLRs) – the mammalian orthologs of Toll – in mammalian brain development, function and structure remains elusive so far. Myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) is an essential adaptor protein for downstream signaling of TLRs. This study systematically analyzes the effects of MyD88-deficiency on murine brain structure, development, and behavior.

To this end, *Myd88*^{-/-} mice at the age of postnatal day 4 (P4, neonatal) and at 8-10 weeks (adult) were compared to wild-type animals (WT). Performing immunohistochemistry on brain sections, cortical cell populations including neurons and glia cells were quantified. Neuronal arborization in the cerebral cortex was analyzed by Golgi staining. To investigate the impact of MyD88 expression on a functional level, behavior tests focusing on cognition and social behavior were performed.

In neonatal *Myd88*^{-/-} mice neocortical thickness was reduced, while the number of cortical neurons was increased compared to WT mice. In contrast, numbers of microglia, oligodendrocytes, astrocytes, and proliferating cells were unchanged. In adult *Myd88*^{-/-} mice the neocortical thickness was unaltered, but the number of neurons was increased in both neocortex and hippocampus compared to WT mice. Neuronal arborization was less pronounced in adult *Myd88*^{-/-} mice. Furthermore, numbers of microglia and proliferating cells were increased, and myelination was enhanced in the adult neocortex. In contrast, the number of both astrocytes and oligodendrocytes was unaltered in both genotypes. These changes in cell numbers and structure were accompanied by specific behavioral traits: *Myd88*^{-/-} mice showed decreased locomotor activity and increased anxiety-like behavior, while day/light activity was normal. Also, these mice exhibited satisfactory learning, as well as sufficient short- and long-term spatial memory.

Taken together, MyD88 deficiency results in structural changes of the mouse brain, as well as in altered specific and natural behavioral traits. These findings indicate a pathophysiological significance of MyD88 expression for mammalian brain structure, development, and function.

Zusammenfassung

In der Taufliege *Drosophila melanogaster* spielt das Toll-Protein eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und bei Entwicklungsprozessen. Die Funktion der Toll-Orthologe Toll-like-Rezeptoren (TLRs) bei der Hirnentwicklung und -struktur ist hingegen kaum verstanden. Myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) fungiert als zentrales Adapterprotein der TLR-Signalkaskade. Um die Rolle von TLRs und deren Signalkaskade bei der Hirnentwicklung und -struktur zu analysieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit systematisch untersucht, ob die Expression von MyD88 die murine Hirnstruktur während der Entwicklung und das Verhalten von Mäusen beeinflusst.

Es wurden MyD88-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) sowohl im neonatalen Alter (P4) als auch im adulten Alter von 8-10 Wochen untersucht. Mit Hilfe von Immunhistochemie wurden Hirnschnitte hinsichtlich der unterschiedlichen Zelltypen quantitativ analysiert. Im zerebralen Kortex wurden Neurone, Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten quantifiziert. Anhand von Golgifärbungen erfolgte die Analyse der Arborisierung kortikaler Neurone. Um zu untersuchen, ob die Expression von MyD88 einen Einfluss auf das murine Verhalten hat, wurden verschiedene Verhaltenstests mit Fokus auf Kognition und soziales Verhalten durchgeführt.

Neonatale MyD88-defiziente Mäuse wiesen im Vergleich zum WT eine Reduktion der neokortikalen Dicke auf, die Anzahl der kortikalen Neurone war hingegen erhöht. Die Zahl von Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und proliferierenden Zellen war in MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren unverändert. In adulten MyD88-defizienten Mäusen zeigte sich die neokortikale Dicke ebenfalls nicht signifikant verändert. Die Anzahl kortikaler und hippocampaler Neurone adulter MyD88-defizienter Mäuse war erhöht. Die Arborisierung kortikaler Neurone erwies sich im adulten MyD88-defizienten Tier im Vergleich zum WT als reduziert. Es zeigte sich eine quantitative Zunahme von Mikroglia und proliferierenden Zellen in adulten MyD88-defizienten Tieren. Diese wiesen auch eine verstärkte Myelinisierung auf. Die Anzahl von Astrozyten und Oligodendrozyten im adulten MyD88-defizienten Neokortex zeigte sich unverändert. Diese strukturellen Veränderungen waren mit spezifischen Verhaltensweisen assoziiert. So zeigten Open Field, Barnes Maze, Home Cage Scan und Social Activity Monitoring Tests bei MyD88-defizienten Mäusen eine reduzierte Lokomotion und erhöhte Angstlevel bei normaler Tag/Nacht-Aktivität und suffizienter räumlicher Lern- und Gedächtnisleistung.

Zusammenfassend resultiert MyD88-Defizienz in strukturellen Veränderungen des murinen Gehirns sowie in veränderten natürlichen und spezifischen Verhaltensweisen. Damit weist die vorliegende Arbeit auf eine wichtige Rolle der MyD88-Expression für die Gehirnstruktur, Entwicklung und Funktion von Säugetieren hin.

1. Einleitung

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind membranständige Rezeptoren, die eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem einnehmen. Sie gehören zu den sogenannten Mustererkennenden-Rezeptoren (PRRs), die sowohl Pathogen-assoziierte Muster (PAMPs), als auch wirtseigene Gefahrensignale (DAMPs) wie Hitzeschockprotein 60 und Fibrinogen erkennen können (Leulier und Lemaitre, 2008; Lehmann et al., 2012a; Lehmann et al., 2012b; Rosenberger et al. 2014). Aktuell sind 13 TLRs bekannt, wobei die Anzahl je nach Spezies variiert. So sind 10 humane und 12 murine TLRs beschrieben. Insbesondere TLRs 1-9 sind aber über verschiedene Spezies hinweg verbreitet und weisen eine evolutionär hoch konservierte Aminosäuresequenz auf (Takeda und Akira, 2015).

Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Homo- oder Heterodimerisierung des jeweiligen TLR, und durch die Interaktion der zytosolischen Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne mit Adapterproteinen wird eine Signalkaskade initiiert. Ein zentrales Adapterprotein der TLR-Signalkaskade ist das myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88). Über diverse Kinasen kommt es zuletzt zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) (Kawai und Akira, 2006).

Im zentralen Nervensystem (ZNS) werden sowohl TLRs als auch MyD88 exprimiert (Shmueli et al., 2018). Während Mikroglia alle bekannten TLRs und MyD88 exprimieren, werden spezifische Subgruppen von TLRs auch von Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen exprimiert (Hanke und Kielian, 2014).

Das Toll-Protein in *Drosophila melanogaster* reguliert sowohl die Immunabwehr als auch embryonale Entwicklungsprozesse. Dabei rekrutiert Toll einen Adapterproteinkomplex aus dMyD88, Tube und Pelle. Die nachfolgende Signalkaskade resultiert in einem Gradienten des nukleären Faktors Dorsal in der ventralen Embryohälfte und determiniert so die Ausbildung des Neuroektoderm (Anderson et al., 1985a; Sun et al., 2002; Sun et al., 2004). Ein komplementärer Gradient ermöglicht schließlich die Ausbildung des ZNS-Nervenstranges (Stathopoulos und Levine, 2002; Sun et al., 2002).

In Säugetieren fungiert MyD88 als zentrales Adaptermolekül für alle TLRs mit Ausnahme von TLR3. Dieser induziert als einziger TLR ausschließlich eine MyD88-unabhängige Signalkaskade. TLR4 wiederum induziert als einziger TLR eine MyD88-abhängige und unabhängige Signalkaskade (Akira et al., 2004). MyD88 rekrutiert als Orthologe zu Tube und Pelle die Kinasen IRAK4 und IRAK1. Dies führt letztendlich zu einer nukleären NF- κ B-Translokation. Über die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors kommt es zu einer Expression unterschiedlicher Gene, welche insbesondere bei immunologischen, aber auch in entwicklungsrelevanten Prozessen wichtig sind (Leulier und Lemaître, 2008). Für einzelne TLRs und deren TLR-assoziierten Signalmoleküle wird zudem eine Rolle bei der ZNS-Entwicklung von Säugetieren und neuronaler Plastizität vermutet (Barak et al., 2014). TLR3 inhibiert beispielsweise die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im Telencephalon muriner Embryonen und reguliert axonales Wachstum (Cameron et al., 2007; Lathia et al., 2008). Rolls et al. zeigten zudem den Einfluss von TLR2 und TLR4 auf die Neurogenese im adulten Hippocampus (Rolls et al., 2007). TLR8 hingegen beeinflusst dendritisches Wachstum bei der neuronalen Entwicklung (Ma et al., 2006). Hung et al. untersuchten den Einfluss von TLR3, TLR7 und TLR8 auf neuronale Morphologie. So kommt es MyD88-abhängig zu einer Eliminierung von Dendriten (Hung et al., 2018). Die oben beschriebenen Effekte von TLR2 und TLR4 bei der Neurogenese im adulten Hippocampus sind ebenfalls MyD88-abhängig (Rolls et al., 2007).

Bezüglich phänotypischer Besonderheiten sind sowohl für TLRs als auch MyD88 pleiotrope Effekte auf das murine Verhalten beschrieben. So zeigten bisherige Arbeiten unter anderem Veränderungen bezüglich motorischer Fähigkeiten, Ängstlichkeit, Hippocampus-abhängiger Lern- und Gedächtnisleistung sowie postoperative kognitive Einschränkungen (Filali et al., 2012; Lim et al., 2011b; Lynch, 2002; Okun et al., 2011; Terrando et al., 2010).

Insgesamt ist die funktionelle Rolle der TLR-Signalkaskade und des zentralen Adapterproteins MyD88 in Bezug auf Hirnentwicklung und -struktur im Säugetier, insbesondere auch im physiologischen Kontext, d.h. abseits experimentell-induzierter Pathologien, nur spärlich untersucht. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Expression von MyD88 auf die Hirnstruktur neonataler und adulter Mäuse sowie auf spezifische spontane murine Verhaltensweisen analysiert.

1.1. Die Funktion von *Toll* und dMyD88 bei der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Die Forschungen um das *Toll*-Gen in der *Drosophila melanogaster* wurden zweimal mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie gewürdigt. Im Jahr 1995 erhielt Christiane Nüsslein-Volhard zusammen mit E.F. Wieschaus und E. B. Lewis den Preis für ihre Arbeiten und Erkenntnisse zur Rolle von *Toll* bei der korrekten Determinierung der Körperachse und axonaler Polarität bei der frühen Embryonalentwicklung der *Drosophila*¹.

2011 wurden Beutler, Hoffmann und Steinman für ihre Arbeiten zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems und zur Rolle dendritischer Zellen bei der erworbenen Immunität geehrt². Der Grundstein für diese Arbeiten wurde bereits 1996 durch Lemaitre et al. gelegt, die die Rolle von *Toll* bei der angeborenen Immunantwort von *Drosophila melanogaster* identifiziert und beschrieben hatten. Deren Studien zeigten, dass Defekte im *Toll*-Signalweg zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Pilzinfektionen führen (Lemaitre et al., 1996).

Bereits in den 1980ern erkannte Nüsslein-Volhard die Rolle von *Toll* und dessen Adapterprotein dMyD88 für die Entwicklung der Drosophilalarve (Anderson et al., 1985a; Anderson et al., 1985b). Im Rahmen der Fertilisation wird der *Toll*-Ligand Spätzle freigesetzt. Dieser aktiviert *Toll* und führt damit zur Rekrutierung eines Adapterkomplexes aus dMyD88 und Tube. Nachfolgend wird die Kinase Pelle rekrutiert und dadurch der IκB-like Inhibitor Cactus abgebaut. Cactus bindet normalerweise Dorsal und blockiert so eine nukleare Translokation. Wird Cactus degradiert, kann das Protein Dorsal wirken und einen nuklearen Gradienten ausbilden. Über NF-κB-Transkriptionsfaktoren bildet sich so die dorsoventrale Achse aus, ein entscheidender Schritt bei der physiologischen Entwicklung des Drosophilaembryos (Sun et al., 2004; Belvin et al., 1996; Wasserman, 2000; Drier und Steward, 1997).

Anschließende Studien zeigten weitere Funktionen der *Toll*-Signalkaskade bei Entwicklungsprozessen der *Drosophila* auf: Neben der korrekten Körperausrichtung hat *Toll* in der *Drosophila* beispielsweise eine wichtige Rolle für die Funktion und Ausbildung von Motoneuronen und Muskelzellen inne (Halfon et al., 1995; Halfon und

¹Vgl. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1995/summary/>, abgerufen am 19.09.2020

² Vgl. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2011/summary/>, abgerufen am 19.09.2020

Keshishian, 1998). Zudem sind *Toll* und seine neun Paraloge an Prozessen wie Zelldifferenzierung und -determinierung, Zell-Zell-Interaktion und struktureller Plastizität des Nervensystems beteiligt (Anthony et al., 2018).

Neben der oben beschriebenen Rolle bei Entwicklungsprozessen spielt *Toll* (Toll-1) eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunabwehr adulter *Drosophila melanogaster*. Lemaitre et al. zeigten 1996, dass die Expression des antimykotischen Peptids Drosomycin ebenfalls über den Toll-Signalweg kontrolliert wird und Mutationen innerhalb des Signalweges zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Pilzinfektionen führt (Lemaitre et al., 1996). Dabei können Pathogene nicht direkt mit *Toll* interagieren. Pathogene aktivieren zunächst eine Reihe von Serinproteasen. Diese ermöglichen eine Prozessierung von pro-Spätzle zu Spätzle. Spätzle aktiviert als wirtseigener spezifischer Ligand anschließend den Toll-Signalweg, welcher zu einer Expression antimykotischer Peptide führt (Roh et al., 2009).

1.2. TLR als Toll-Homologe im Säugetier

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Toll-Homologe im Säugetier und wurden Ende der 1990er erstmals beschrieben. Medzhitov und Kollegen identifizierten im Jahr 1997 mit hToll (später TLR4 genannt) den ersten TLR in Säugetieren (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Speziespezifisch ist eine unterschiedliche Anzahl von TLRs bekannt. Prinzipiell handelt sich bei ihnen um Klasse 1-Transmembranrezeptoren, die auf der Zelloberfläche oder endosomal (TLR3, 7-9) lokalisiert sind. Die extrazelluläre N-terminale Bindungsdomäne besteht aus Leucin-reichen Wiederholungen und Cystein-reichen Domänen. Die intrazelluläre C-terminale Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne ist evolutionär hochkonserviert (Leulier und Lemaitre, 2008; Gay und Gangloff 2007). Charakteristisch für TLRs ist eine hohe Zahl verschiedener Liganden, die gebunden werden können und über eine Homo- oder Heterodimerisierung zur Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade führen. Über Todesdomänen kommt es zur Interaktion mit spezifischen Adapterproteinen, von denen bisher fünf identifiziert wurden: MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), Mal/TIRAP (MyD88 adaptor-like/TIR domain-containing adaptor molecule), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-beta) und SARM (Sterile alpha and armadillo motif) (Gay und Gangloff, 2007; O'Neill

et al., 2005; Medzhitov et al., 1998; Yamamoto et al., 2003). Dabei ist MyD88 das Homolog zu dMyD88. MyD88 besitzt eine C-terminale TIR-Domäne und eine N-terminale Todesdomäne. Über Dimerisierung dieser Domänen kommt es zur Interaktion mit verschiedenen Up- und Downstreamproteinen (Wesche et al., 1997; Burns et al., 1998; Akira et al., 2004).

Alle TLRs mit Ausnahme von TLR3 signalisieren MyD88-abhängig, wobei TLR5 und TLR7-9 exklusiv MyD88 verwenden. TLR1, TLR2 und TLR6 benötigen hingegen neben MyD88 auch Mal/TIRAP. TLR4 kann sowohl einen MyD88-abhängigen (Mal/TIRAP und MyD88) als auch einen MyD88-unabhängigen Weg induzieren (TRAM und TRIF) (Vogel et al., 2003; Fitzgerald et al., 2003; Akira et al., 2004; Lim et al., 2013; Kawai und Akira, 2006; Kawai und Akira, 2010).

Downstream von TLRs und Adapterproteinen kommt es unter anderem über Phosphorylierung zur Aktivierung von IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK4, IRAK1) sowie TRAF6 (Tumornekrosefaktorrezeptor-assoziiierter Faktor 6) und schließlich zur Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK), sodass NF- κ B freigesetzt wird und in den Nukleus translozieren kann (Takeda und Akira, 2015). Dies führt unter anderem zur Produktion inflammatorischer Chemo- und Zytokine, beispielsweise IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF α . Daneben gibt es im Rahmen einer antiviralen Abwehr einen zweiten Signalweg. Dieser führt über eine Dimerisierung von IRF-3 (Interferon responsivem Faktor 3) und IRF-7 zur Produktion von Interferonen, Chemokinen und antiinflammatorischen Zytokinen. Über eine direkte Interaktion von MyD88 mit dem Transkriptionsfaktor IRF-7 (über jeweilige Todesdomänen) kommt es zur vermehrten Expression pro-inflammatorischer Zytokine (Gay und Gangloff, 2007; Kawai et al., 2010; Lim et al., 2013).

Neben diesem „klassischen“ Signalweg gibt es weitere Wege, beispielsweise die Induktion von IFN α und IFN β über TLR4 und die endosomalen TLRs (3,7-9) oder sogar direkte Zell-Zell-Interaktion nach Aktivierung von Toll/TLR (Ku, 2005). Dabei sind mögliche Querverbindungen zwischen einzelnen Signalwegen noch nicht im Detail verstanden bzw. identifiziert. Als wichtiges Grundprinzip wird davon ausgegangen, dass die jeweils ablaufende Signalkaskade Zelltyp-, Zeit- und Kontext-abhängig ist (Anthony et al., 2018).

Wie oben beschrieben, wurde initial insbesondere die Rolle von TLR im Säugetier bei der angeborenen Immunabwehr untersucht. Es sind unterschiedlichste Liganden bekannt, welche sowohl Pathogene (PAMPs) als auch wirtseigene Gefahrensignale (DAMPs) sein können. DAMPs werden unter anderem von apoptotischen Zellen sowie bei Stress-induziertem Zelltod und Gewebeschaden freigesetzt. Zu ihnen gehören beispielsweise mRNA, miRNA und DNA (Chen et al., 2019; Liu et al., 2015). Folgende weitere Liganden wurden unter anderem identifiziert (Takeda und Akira, 2015; Satoh und Akira, 2016; Akira et al., 2006):

TLR1 erkennt Lipoproteine von Mykobakterien und *Borrelia burgdorferi*. TLR2 wird durch Peptidoglykan und Lipoproteine (Bestandteile bakterieller Zellwände), Lipoteichonsäure (kommt in Zellwänden grampositiver Bakterien vor), Zymosan (Bestandteil von Hefen), GPI-Anker und Phenol-löslichem Modulin aktiviert. Doppelsträngige RNA (dsRNA), welche während der Replikation von RNA-Viren in der Wirtszelle gebildet wird, kann TLR3 aktivieren. TLR4 erkennt Lipopolysaccharide (LPS, äußere Zellwand gramnegativer Bakterien), Taxol, endogene Liganden wie Hitzeschockproteine (HSP60, HSP70), Fibronectin und Hyaluronsäure. Diese endogenen Liganden zählen zu den wirtseigenen Gefahrensignalen (DAMPs) (Takeda und Akira, 2015; Satoh und Akira, 2016). TLR5 und TLR11 erkennen Flagellin begeißelter Bakterien. TLR6 wird durch diacetylierte Lipopeptide von Mykobakterien aktiviert. Die endosomalen TLR7 und TLR8 erkennen ssRNA und Imidazoquinolin, TLR7 zudem auch miRNAs. TLR9 wird aktiviert durch unmethylierte CpG-Motive von DNA. Für TLR10 sind bisher keine Liganden bekannt. Profilin ist ein Ligand von TLR11 und TLR12. Bakterielle 23S ribosomale RNA kann TLR13 aktivieren (Takeda und Akira, 2015).

Murine Knockout-Modelle einzelner TLRs, aber auch für MyD88 als zentrales Adapterprotein, wurden im Verlauf der immunologischen Forschung etabliert und zeigen die Bedeutung des TLR-Signalweges bei der Immunabwehr (Adachi et al., 1998). MyD88-defiziente Mäuse zeigen im Kontext experimenteller Infektionen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber den unterschiedlichen Pathogenen, darunter nicht nur Pilze wie ursprünglich in der *Drosophila* beschrieben, sondern insbesondere Bakterien, aber auch Viren und Protozoen (von Bernuth et al., 2012; Hanke und Kielian, 2014).

1.3. Die Rolle von TLRs und MyD88 bei der zerebralen Entwicklung des Gehirns

Mittlerweile ist bekannt, dass TLRs im ZNS exprimiert werden, wobei die Anzahl unterschiedlicher TLRs und auch die jeweiligen Adapterproteine je nach Zelltyp variieren (Bsibsi et al., 2002; Rosenberger et al., 2014).

Mikroglia sind Makrophagen-ähnliche ZNS-Zellen, die als primäre Immunzellen des Gehirns gelten. Murine und humane Mikroglia exprimieren mRNA der TLR1-9. Eine Aktivierung von TLR2, 4, 7 und 9 führt über den klassischen MyD88-abhängigen Signalweg zur Produktion inflammatorischer Moleküle (Bsibsi et al., 2002; Olson et al., 2004; Lehmann et al., 2012a; Lehmann et al., 2012b). *In vitro* konnten zudem für eine simultane Stimulation zweier TLRs (beispielsweise TLR4 und 9) sowohl synergistische als auch supprimierende Effekte bezüglich einer inflammatorischen Reaktion gezeigt werden (Rosenberger et al., 2014).

Astrozyten (murine) exprimieren vor allem TLR3, in geringerem Maße auch TLR1-6 und TLR9. TLR7 und TLR8 sind hingegen bisher nicht nachgewiesen (Jack et al., 2005; Carpentier et al., 2005). Damit kommt Astrozyten ebenfalls eine direkte immunologische Funktion über die Produktion proinflammatorischer Moleküle wie IL-6 und TNF α zu. Zudem erhöhen diese Moleküle die Permeabilität der Bluthirnschranke, was das Einwandern peripherer Leukozyten in das ZNS ermöglicht (Carpentier et al., 2005).

Das TLR-Repertoire von Oligodendrozyten ist im Vergleich zu Mikroglia und Astrozyten deutlich reduziert. Oligodendrozyten exprimieren lediglich TLR2 und TLR3 (Bsibsi et al., 2012; Hanke und Kielian, 2014). Die genaue Funktion von TLRs in Oligodendrozyten ist unklar. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle bei zerebralen Reparaturmechanismen spielen. So weisen TLR2- und TLR4-defiziente Mäuse nach Rückenmarksverletzungen in Folge gestörter Regenerationsprozesse eine reduzierte Myelinisierung auf (Kigerl et al., 2007).

Neurone exprimieren TLR2-4, sowie TLR7 und TLR9 (Hanke und Kielian, 2014; Dzamko et al., 2017). Mittlerweile ist auf mRNA-Ebene die neuronale Expression von TLR1-9 nachgewiesen (Kumar, 2019). Eine TLR-Aktivierung in Neuronen scheint einen negativen Effekt auf die neuronale Struktur zu haben. So zeigten Ma et al., dass TLR8 das Aussprossen von Neuriten unterdrückt und neuronale Apoptose induzieren kann (Ma et al., 2007). Des Weiteren führt die Aktivierung von TLR7 in Neuronen zu deren Apoptose. Diese Signale werden sowohl MyD88-abhängig (Lehmann et al., 2012a; Lehmann et al.,

2012b) als auch MyD88-unabhängig über das Adaptermolekül SARM1 vermittelt (Kim et al., 2007; Dembny et al., 2020; Mukherjee et al., 2015).

Shmueli et al. analysierten im Kortex adulter Mäuse die mRNA-Expression der fünf TLR-Adapterproteine. Sie konnten eine zellspezifische Expression der jeweiligen TLR-Adapterproteine zeigen. Mikroglia exprimieren insbesondere MyD88, TRAM1 und TICAM1. Astrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen exprimieren hingegen vornehmlich TRAM1. In reifen (myelinisierten) Oligodendrozyten ist wiederum nur Mal nachweisbar. Neurone exprimieren insbesondere SARM1, sowie zu einem geringen Maße auch TRAM1 und MyD88 (Shmueli et al., 2018; Lehmann et al., 2012a; Lehmann et al., 2012b).

Bisher wurden TLR und assoziierte Signalwege vor allem im Rahmen mikrobiologischer Infektionen, aber auch im Kontext von Neuroinflammation, Schlaganfall, neurodegenerativen Erkrankungen und Multipler Sklerose untersucht (Rosenberger et al., 2015; Hanke und Kielian, 2014). Die Rolle des TLR-Signalweges bei physiologischen Entwicklungsprozessen gelangte hingegen erst in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus TLR-bezogener Forschung.

Kaul et al. analysierten systematisch die Expression von TLR1-9 und der Adaptermoleküle MyD88 und TRIF im sich entwickelnden murinen Gehirn. Insbesondere die Expressionslevel von TLR7 und TLR9 auf mRNA-Ebene variieren stark im Zeitverlauf. TLR7 und TLR9 werden vor allem von neokortikalen und hippocampalen Neuronen exprimiert (Kaul et al., 2012).

Für einzelne TLR konnten zudem spezifische Effekte im Rahmen von Entwicklungsprozessen gezeigt werden. Die Aktivierung von TLR2 führt in murinen Embryonen zu einer Hemmung der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (NPC). Dieser Effekt scheint MyD88-abhängig zu sein, da MyD88-Defizienz zu einer verstärkten Proliferation von NPC in der subgranulären Zone des Hippocampus führt (Okun et al., 2011; Okun et al., 2010b). TLR2-Aktivierung führt zu einer verstärkten neuronalen Differenzierung von NPC, während TLR4 hingegen einen gegenteiligen Effekt vermittelt. TLR2-defiziente Mäuse weisen eine reduzierte hippocampale Neurogenese in vivo auf. TLR4-Defizienz führt zu einer verstärkten neuronalen Differenzierung und Erneuerung von NPC (Rolls et al., 2007).

Ähnlich wie TLR2 inhibiert TLR3 die NPC-Proliferation im Telencephalon muriner Embryonen (Lathia et al., 2008) und reguliert axonales Wachstum (Cameron et al., 2007). Bei TLR3-defizienten Mäusen konnte zudem eine verstärkte hippocampale Neurogenese

und vergrößerte Volumina der CA1-Region des Hippocampus gezeigt werden (Okun et al., 2010a).

Die Aktivierung von TLR4 hat einen negativen regulatorischen Effekt auf retinale Vorläuferzellen (Shechter et al., 2008).

TLR7 hat einen negativ-regulatorischen Effekt auf das Wachstum neuronaler Dendriten. Dieser Effekt ist MyD88-vermittelt und IL-6 abhängig (Liu et al., 2013). Auch endogene Liganden wie miRNA kontrollieren TLR7-vermittelt neuronales Wachstum (Liu et al., 2015).

Ma et al. zeigten zudem sowohl für TLR3 als auch TLR8 einen negativ modulierenden Effekt auf das Wachstum von Neuriten (Ma et al., 2006). Neure Studien weisen diesen Effekt auch für TLR7-Aktivierung nach (Hung et al., 2018; Chen et al., 2019).

Zusammengefasst spielen TLRs nicht nur eine Rolle bei immunologischen Prozessen, sondern auch eine regulatorische Rolle bei der zentralnervösen Entwicklung, wobei die Identifizierung einzelner Mechanismen und assoziierter Signalkaskaden weiter Gegenstand der aktuellen Forschung sind.

1.4. Die Rolle von TLRs und MyD88 bei Inflammation, Immundefekten, neurologischen Entwicklungsstörungen und neurodegenerativen Erkrankungen

Die Rolle von TLRs und MyD88-Defizienz bei Inflammation, Immundefekten, neurologischen Entwicklungsstörungen und neurodegenerativen Erkrankungen und damit ein klinischer Bezug lässt sich an zwei Arten von Studien bzw. Experimenten zeigen.

Zum einen gibt es diverse Kohortenstudien und Fallberichte von Menschen mit Mutationen und Gendefekten im Bereich der TLR-Signalkaskade. Im Jahr 2005 berichteten Ku et al. über insgesamt zehn PatientInnen mit nachgewiesener IRAK4-Defizienz, sowie drei mit vermuteter Mutation (Ku et al., 2005). Da IRAK4 eine der zentralen Downstream-Kinasen im TLR/IL-1R-Signalweg ist (Akira et al., 2004), sind Blutzellen IRAK4-defizienter PatientInnen nach Stimulation mit TLR-Agonisten nicht mehr in der Lage, inflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-12 oder TNF α zu produzieren. Klinisch besteht eine hohe Vulnerabilität gegenüber pyogenen bakteriellen Infektionen, vor allem gegenüber Infektionen durch gram-positive Bakterien. Dies führt insbesondere in der Kindheit zu lebensbedrohlichen schweren Infektionen (fünf der dreizehn PatientInnen

verstarben), die hinsichtlich Schwere und Frequenz mit zunehmendem Alter abnahmen. Es wird eine Kompensation des Defektes im Bereich der angeborenen Immunantwort durch das adaptive Immunsystem angenommen (Ku et al., 2005). Insgesamt ist IRAK4-Defizienz eine seltene Erkrankung; allerdings werden fortlaufend weitere Mutationen mit zum Teil fatalen klinischen Verläufen beschrieben (von Bernuth et al., 2012; Graziolo et al., 2016).

MyD88-defiziente PatientInnen zeigen – ähnlich wie IRAK4-defiziente – eine Prädisposition bezüglich schwerer invasiver bakterieller Infektionen, insbesondere gegenüber *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die Anfälligkeit nimmt nach dem Erreichen des Erwachsenenalters deutlich ab, kann aber in der Kindheit häufig zum Tode führen. Anders als im Tiermodell konnte keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber anderen Pathogenen nachgewiesen werden (von Bernuth et al., 2008).

Zum anderen ist der Zusammenhang zwischen Inflammation *in utero* beziehungsweise maternaler Immunaktivierung und dem gehäuften Auftreten neurologischer Entwicklungsstörungen bei Nachkommen beschrieben. Diese Effekte sind unter anderem IL-6- und IL-17a-vermittelt und können unter den Nachkommen zu einem gehäuften Auftreten von Autismus-Spektrum-Störungen führen (Wu et al., 2017; Choi et al., 2016; Smith et al., 2007).

Darüber hinaus konnten diverse Studien eine Rolle des TLR-Signalweges bei neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer (AD) zeigen. AD gehört zu den klassischen neurodegenerativen Erkrankungen. Dabei kommt es zu einer verstärkten Ablagerung des Proteins β -Amyloid ($A\beta$) im Gehirn. Dies gilt als ursächlich für die progrediente Verschlechterung der kognitiven Funktion (Hardy und Selkoe, 2002; Lim et al., 2011b). Im murinen Alzheimermodell konnte gezeigt werden, dass MyD88-Defizienz zu einer reduzierten Akkumulation von $A\beta$ führt. Im Umkehrschluss weist dies auf eine MyD88-abhängige Verstärkung der β -Amyloidose durch chronische Inflammation hin (Lim et al., 2011a).

Auch für die Pathogenese der Multiplen Sklerose kommt TLRs eine wichtige Rolle zu. Multiple Sklerose zählt zu den chronisch-entzündlichen Erkrankungen des ZNS. Im Rahmen einer perivaskulären Infiltration von Immunzellen kommt es zur Demyelinisierung, zu axonalem Schaden und neuronalem Zelltod. Bildgebend zeigen sich typische herdförmige Läsionen im ZNS. Eine zentrale Rolle spielen die inflammatorischen

Zytokine IFN γ und IL-17, sowie die regulatorischen Zytokine IL-10 und Typ 1 IFN (Miranda-Hernandez und Baxter, 2013). Dabei kommt TLRs eine regulierende Rolle bei der Sekretion einzelner Zyto- und Chemokine zu (Fujiwara et al., 2018). So wird beispielsweise TLR2- und TLR4-vermittelt IL-17 ausgeschüttet. Via TLR3, TLR7 und TLR9 kommt es über IFN β hingegen zu einer Unterdrückung der IL-17 Sekretion (Miranda-Hernandez und Baxter, 2013).

1.5. TLR-Signalkaskade und phänotypische Veränderungen

Bis auf eine erhöhte Vulnerabilität im Rahmen experimenteller Infektionen ist wenig über mögliche phänotypische Veränderungen TLR- und / oder MyD88-defizienter Mäuse bekannt. Generell zeigen MyD88-defiziente Tiere ein dem WT vergleichbares Verhalten im Rahmen der Tierzucht und -haltung (Janssens und Beyaert, 2002).

Erste Studien konnten jedoch für einzelne murine TLR-defiziente-Linien phänotypische Veränderungen nachweisen. Okun et al. zeigten, dass TLR3-defiziente Mäuse in Tests, welche Hippocampus-abhängige Arbeitsgedächtnisleistung überprüfen, signifikant besser abschnitten (Okun et al., 2010a). Andererseits wurden durch die gleiche Arbeitsgruppe für TLR3-defiziente Mäuse unter anderem kognitive Defizite bei räumlicher Wahrnehmung beschrieben (Okun et al., 2010a). TLR7-defiziente Mäuse im Alter von 2 Wochen zeigten beim Open Field Test ein reduziertes exploratives Verhalten (Liu et al., 2013).

Neben Untersuchungen an TLR-defizienten Mäusen gibt es auch erste Studien zu TLR-Adapterproteinen wie MyD88 bzw. mit MyD88-defizienten Mäusen. Allerdings ist auch hier die Studienlage bisher gering und heterogen. So konnte in 10 Monate alten Mäuse eine verbesserte räumliche Lernleistung beobachtet werden (Lim et al., 2011b). Drouin-Ouellet et al. zeigten hingegen eine reduzierte räumliche Lernfähigkeit bei Tieren im Alter von 2-4 Monaten. Ob diese gegensätzlichen Ergebnisse nur dem unterschiedlichen Alter geschuldet sind, bleibt unklar. Die Testkohorte von Drouin-Ouellet et al. schien mit einem Alter von 2-4 Monaten und Gruppengrößen von $n = 9-19$ insgesamt sehr heterogen (Drouin-Ouellet et al., 2012). Inwiefern, beziehungsweise welche Rolle, MyD88 bei Verhalten und kognitiven Fähigkeiten wie räumlicher Lernfähigkeit spielt, ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.6. Fragestellung/ Zielsetzung

Wie oben ausgeführt, konzentrierte sich die bisherige Forschungsarbeit zunächst auf die Expression und Funktion von TLRs im ZNS, dabei vor allem auf immunologische Aspekte. Neuere Arbeiten untersuchten zunehmend die Rolle von TLR bei Neuroinflammation und ZNS-Erkrankungen wie Multiple Sklerose und Morbus Alzheimer. Des Weiteren rückte die Identifizierung und Funktion wirtseigener Liganden für TLRs in den Vordergrund.

Wenig ist allerdings nach wie vor über die Bedeutung von TLRs für Homöostase und physiologische Entwicklungsprozesse im ZNS, das heißt in Abwesenheit von Krankheit oder experimentell induzierten Verletzungen, im Säugetier bekannt. Es stellt sich die Frage, ob, in Analogie zu *toll* in der Taufliege, TLRs und assoziierte Signalkaskaden eine Rolle bei der Entwicklung und Funktion des ZNS in Abwesenheit von Pathogenen beziehungsweise unter physiologischen Bedingungen spielen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde systematisch der Einfluss der Expression von MyD88 auf die murine Hirnstruktur und das Verhalten analysiert. Es wurden sowohl Gehirne von Mäusen postnatalen Alters als auch adulten Alters analysiert. Dabei wurden MyD88-defiziente Tiere mit Wildtyp-Tieren (WT) verglichen.

Konkret sollten im Mausmodell folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- (1) Gibt es quantitative und / oder strukturelle Unterschiede zwischen MyD88-defizienten Mäusen und WT Tieren im Neokortex und / oder Hippocampus? Hierzu wurden Tiere beider Genotypen im Alter von postnatal Tag 4 (P4) und adulte Tiere im Alter von 8-10 Wochen untersucht.
- (2) Gibt es einen MyD88-defizienten spezifischen Phänotypen in der Maus hinsichtlich ihres Verhaltens?

2. Materialien und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Chemikalien mit analytischem Reinheitsgrad verwendet. Die Verhaltensstudien wurden unter standardisierten Bedingungen in den Versuchsräumen der Animal Outcome Core Facility (AOCF) am Charité Campus Mitte durchgeführt. Im Folgenden werden alle verwendeten Materialien tabellarisch aufgelistet und die angewandten Methoden im Detail beschrieben.

2.1. Materialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Hersteller
Deckgläser 24x60 mm Glasdicke 0,13-0,16 mm # 45-9451-00	Medite GmbH Burgsdorf, Deutschland
Filterpapier 240 mm Durchmesser # 10311651	Whatman plc, Buckinghamshire, UK
Immun-Blot® PVDF-Membran # 1620177	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Mehrzweckbehälter mit Deckel # 203170	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Mikroobjektträger # 2406/1	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Objektträger für Golgifärbung # 2406/1	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Peel-A-Way® Einweeinbettform # 18646A	Polysciences Inc., PA, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Rotilabo® Einbettkassetten # K114.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Superfrost® Plus Objektträger 25x75x1 mm # 03-0060	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik Emmendingen, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und sonstiges

Bezeichnung	Hersteller
2-Methylbutan C ₅ H ₁₂ , #3926.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniak NH ₃ .H ₂ O, #6774.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidin- 2-phenylindoldihydrochlorid)	Sigma-Aldrich, jetzt Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, #X987.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat wasserfrei Na ₂ HPO ₄ , #P030.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan® Neu, #107961	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure C ₂ H ₄ O ₂ , #4341.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol C ₂ H ₆ O, #K928.4	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglykol C ₂ H ₆ O ₂ , #E-9129	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Eukitt® Quick-hardening mounting medium for microscopy, #03989	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gelatin from porcine skin (Type A), #G2500	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchromat, #HN33.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdichromat K ₂ Cr ₂ O ₇ , #1.04862	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ketamin-Actavis 50 mg/ml	Actavis, Hafnarfjörður, Island
Kresylviolett, #C5042	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Low melting point Agarose, #V2111	Promega, Madison WI, USA
Milchpulver für Blockmilch, fettarm, #T145.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat NaCH ₃ COO, #X891.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid NaCl, #9265.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, #K300.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Hydrogen-Phosphat-Monohydrat NaH ₂ P04 ·H ₂ O, #T878.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O, #2781895	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normal goat Serum (NGS) # VEC-1-1000	Vector Laboratories Inc., CA, USA
Paraformaldehyd (CH ₂ O) _n – Flp 70°, #0335.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (Ch ₂ O) _n , #0335.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered Saline, 10x), #L1835	Dulbecco, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit, #23225	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrat, #32106	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polyvinylpyrrolidon, PVP40	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Cat # 161-0394	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland

Quecksilberchlorid HgCl ₂ , #KK04.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Retrieval-Lösung (Antigen unmasking solution), #H-3300	Vector Laboratories Inc., CA, USA
Rompun® 2%	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Saccharose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , #1.07687	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Shandon™ Immu-Mount™, #9990402	Thermo Scientific Thermo Shandon Limited, Cheshire, UK
Triton® X-100, 107K0065 #SL07502	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland,
Xylol C ₈ H ₁₀ , #9713.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Puffer, Medium und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung
0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4	43,42 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 5,24 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O ad 1 l H ₂ O
1% Kresylviolettlösung	1 g Kresylviolett in 100 ml Acetatpuffer
10x PBS, pH 7,4	2 g KCl, 2g KH ₂ PO ₄ , 80g NaCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, ad 1 l H ₂ O
4% PFA	40 g Paraformaldehyd ad 500 ml H ₂ O, 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer, bei ca. 57°C lösen, anschließend filtrieren
Acetat Puffer	2 Teile Lösung A + 3 Teile Lösung B, pH 4,45
AK-Trägerlösung IHC in Kryo	PBS + 2% NGS + 0,2% TritonX-100
APS (Ammoniumpersulfat)	10% APS in H ₂ O
Blockpuffer IHC Kryo	PBS + 5% NGS + 0,2% TritonX-100
Blockpuffer IHC Paraffin	500 ml Aqua dest + 2 g Gelatine + 500 ml PBS + 2,5 ml TritonX-100
Blockpuffer Western Blot	5% Milchpulver in TBST

Elektrophoresepuffer 10x Western Blot	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS; pH 8,3
Ladepuffer 4x Western Blot	0,1 M Tris (pH 6,8), 10% Glycerin, 4% SDS 4% beta-Mercaptoethanol, Bromphenolblau in Aqua dest
Lösung A (0,2 M Na-Acetat-Lösung)	16,41 g Na-Acetat ad 1 l Aqua bidest
Lösung B (0,2 M Essigsäure)	11,6 ml Essigsäure ad 1 l Aqua bidest
Narkoselösung	Pro kg KG 100 mg Ketamin und 16 mg Xylazin in 0,9% NaCl
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Sammelgelpuffer Western Blot	0,5 M Tris in Aqua dest. (pH 6,8)
SDS-Lysepuffer	20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 1 mM Na ₃ VO ₄ , 1 µg/ml Leupeptin; 3 µg/ml Aprotinin, 1 mM Glycerolphosphat, 1% SDS in Aqua dest
Strippingpuffer Western Blot	100 mM Natriumcitrat (tri-Natriumcitrat-dihydrat in Aqua dest., pH 2,2)
Saccharoselösung	10%, 20% oder 30% D- Saccharose in 0,1 M PB
TBS (Tris buffered saline) 10x	0,5 M Tris, 1,5 M NaCl ₂ , pH 7,4
TBST	100 ml TBS 10x und 1 ml Tween 20 ad 900 ml MilliQ-Wasser
Transferpuffer 10x Western Blot (pH 9,2)	29,3 g Glycin und 58,1 g Tris ad 800 ml dddH ₂ O
Transferpuffer 1x Western Blot	20 ml Transferpuffer 10x in 800 ml MilliQ-Wasser + 200 ml Methanol
Trenngelpuffer Western Blot	1,5 M Tris in Aqua dest. (pH 8,8), dafür: 118,2 g Tris-HCl ad 500 ml ddH ₂ O

Tabelle 4: Antikörper Immunhistochemie

Antikörper	Antigen / Zur Quantifizierung von	Klon	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor® 488; 568	Fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper		ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA	1:500
Ms-anti- APC	Oligodendrozyten	OP80	Calbiochem® Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:250
Ms-anti- GFAP	Astrozyten	MAB360	Chemicon®, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:400
Ms-anti- NeuN	Neuronale Nuklei / Neurone	MAB377	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:500
Rb-anti- Cux1 (CDP)	Kortikale Neurone Level 2-4	MBS822452	MyBioSource, CA, USA	1:200 (Paraffin)
Rb-anti- Iba1	Mikroglia	019-19741	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland	1:500
Rb-anti- Ki67	Proliferierende Zellen	RBK027	Zytomed systems GmbH,	1:300

			Berlin, Deutschland	
Rb-anti- NeuN	Neuronale Nuklei / Neurone	ABN78	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:500
Rt-anti- Ctip2	Kortikale Neurone Level 5-6	Ab28465	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:200 (Paraffin)
Rt-anti- MBP	Myelinscheiden	LV 1505487	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:1000 (Kryo)

Tabelle 5: Antikörper Western Blot

Antikörper	Zur Quantifi- zierung von	Klon	Hersteller	Verdünnung	Erwartete Banden- höhe
Ms-anti- GFAP	Astrozyten	MAB360	Chemicon®, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:1000	51 kDa
Rb-anti- Iba1	Mikroglia	019- 19741	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland	1:1000	16 kDa
Rb-anti- NeuN	Neuron	ABN78	Merck Millipore,	1:5000	42/48 kDa

			Darmstadt, Deutschland		
--	--	--	---------------------------	--	--

Tabelle 6: Geräte und Software

Beschreibung	Hersteller
Analytische Waage CP225D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
GraphPad PRISM 7	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Hamilton™ Spritze 50µl 80565	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Heizblock PHMT	Grant-bio, Cambridgeshire, England
HomeCageScan	CleverSys Inc., Reston, VA, USA
Horizontalschüttler	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
Kryostat CM1900	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel 2013	Microsoft, Redmond, USA
Mikroskop Olympus BX51, Magnafire software (Optronics)	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Olympus BX60 mit AxioCam MRcZeiss Kamera und Axiovision 4.8 Software (Zeiss, Göttingen, Deutschland)	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Olympus IX81 mit F View II (sw) Kamera (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland)	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikrotom RM2255	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Paraffineinbettungsmaschine	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Peristaltische Pumpe BVP ISM444B	Ismatec® IDEX Health and Science GmbH, Wertheim, Deutschland

Photoshop CS6	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Ireland
RStudio v0.97	RStudio Inc., Boston, MA, USA
Sonifier Sonoplus GM70 with SH70G probe	Bandelin Electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultra-Turrax® T25 basic Dispergiergerät	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Vibratom HM650V	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Viewer	Biobserve GmbH, Bonn, Deutschland
Wärmeschrank	Servoprax GmbH, Wesel, Deutschland
Wasserbad rund	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ImageJ Version 1.46	Public domain, entwickelt durch Wayne Rasband
Milli-Q® IQ 7003/05/10/15 Ultrapure & Pure Water Purification System	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

2.2. Mäuse

Myd88^{-/-} Mäuse wurden großzügigerweise durch Dr. S. Akira (Osaka University, Department of Host Defense, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt (Adachi et al., 1998). C57BL/6 (Wildtyp, WT) Mäuse wurden von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin Berlin (FEM) der Charité bereitgestellt. Für die Verhaltensstudien wurden zudem Tiere von Charles River, Massachusetts, USA bezogen.

Nach Bereitstellung der Tiere durch die FEM beziehungsweise Charles River erfolgte die Haltung der Tiere im Tierstall der FEM beziehungsweise in den Räumen der Animal outcome core facility (AOCF) nach aktuellen Richtlinien und im Einverständnis mit dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo). Dazu wurden die Tiere in Gruppen von vier bis fünf Tieren in angereicherter Umgebung gehalten, mit Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* und einem 12h/12h-Hell-Dunkel-Zyklus. Alle Experimente erfolgten gemäß interner Richtlinien und wurden durch das zuständige LaGeSo genehmigt (Tötungs-Nr. T0298/12; Organentnahme-Nr. O0299/12; Tierantrags-Nr. AOCF

G0222/14). Wenn nicht anders angegeben, handelte es sich bei den jeweiligen Mäusen um adulte männliche Tiere im Alter von 8-10 Wochen beziehungsweise männliche Jungtiere im Alter P4 (postnataler Tag 4).

2.3. Methoden

Im Folgenden werden die einzelnen im Laufe dieser Arbeit verwendeten Methoden erklärt und im Detail beschrieben. Die verwendeten Materialien sind in Kapitel 2.1 aufgeführt.

2.3.1. Volumetrie von Kortex und Gesamthirn

Zur Volumenbestimmung von Kortex und Gesamthirn wurden männliche adulte Tiere im Alter von 8-10 Wochen dekapitiert und die Hirne im Ganzen entnommen. Anschließend wurden diese in Paraffin eingebettet und koronare Hirnschnitte in serieller Aufnahmetechnik am Mikrotom hergestellt, wobei pro Objektträger drei Schnitte aufgenommen wurden.

Die eigentliche Volumenbestimmung erfolgte rechnerisch über die Flächenausmessung von Kortex beziehungsweise Gesamthirn. Dazu wurde jeder fünfte Objektträger pro Tier nach Nissl gefärbt und anschließend jeder erste Hirnschnitt mikroskopisch fotografiert und manuell mit Hilfe von Image J über die Flächenausmessung von Kortex und Gesamthirn das jeweilige Volumen berechnet.

2.3.1.1. Paraffineinbettung

Nach Dekapitation und Entnahme der Hirne *in toto* wurden diese über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert. Anschließend erfolgte eine Entwässerung mittels in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur (50% EtOH 30 min; 70% EtOH über Nacht bei 4°C; 80% EtOH 60 min; 90% EtOH 60 min; 95% EtOH 60 min; 95% EtOH 60 min; 100% EtOH 60 min; 100% EtOH 30 min). Nach Inkubation in Xylol als Intermediärmedium wurden die Hirne einzeln in heißes Paraffin transferiert. In drei Schritten (Paraffin I 60 min; Paraffin II über Nacht und Paraffin III zur endgültigen Einbettung) erfolgte die finale Paraffineinbettung in Form von quadratischen

Paraffinblöcken. Nach 24 h bei 4°C waren die einzeln in Paraffinblöcke eingebetteten Hirne für die Schnittherstellung bereit.

2.3.1.2. Paraffinschnittherstellung

Die einzeln in Paraffinblöcke eingebetteten Hirne wurden folgendermaßen geschnitten: Es erfolgte von rostral beginnend die serielle Aufnahme koronarer Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm. Die Sicherstellung der richtigen Schnittebene erfolgte mit Hilfe des Allen Brain Atlas³ und „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“ (Franklin und Paxinos, 2008).

Zum Strecken wurden die einzelnen Schnitte in ein 37°C warmes Wasserbad transferiert und anschließend je drei Schnitte auf einen Superfrost Plus® Objektträger aufgenommen. Nach Fixierung bei 37°C im Inkubator über Nacht können die Schnitte bis zur weiteren Verwendung (Färbung) bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.3.1.3. Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, durch welche insbesondere Nervengewebe gut angefärbt wird. Als Farbstoff dient Kresylviolett (basisch = kationisch), dieser geht mit Phosphatgruppen der Nucleinsäuren eine Ionenbeziehung ein, das heißt saure Bestandteile von DNA und RNA werden angefärbt. Dabei entstehen zytoplasmatisch gefärbte Komplexe (Nissl-Schollen) (Kádár et al., 2009).

Reagenzien:

- Acetatpuffer (pH 4,45) aus 2 Teilen Lösung A und 3 Teilen Lösung B
- Lösung A (0,2 M Na-Acetat-Lösung), Molekulargewicht 82,04 g/mol, dafür 16,41 g Na-Acetat (wasserfrei) in 1 l Aqua dest. lösen.
- Lösung B (0,2 M Acetatsäure), Molekulargewicht 60,05 g/mol, dafür 11,6 ml Acetatsäure in 1 l Aqua dest. geben.
- 1% Kresylviolettlösung, dafür 1 g Kresylviolett in 100 ml Acetatpuffer lösen, mittels Filterpapier filtern und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahren.

³ <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>, abgerufen am 25.06.2018.

Zur Färbung der Paraffinschnitte ist zunächst eine sogenannte Entparaffinierung mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe notwendig, im Anschluss kann die eigentliche Färbung erfolgen.

A) Entparaffinierung:

1. 3x 15 min Xylol
2. 1x 5 min Xylol/EtOH (1:1)
3. 2x 2 min 100% EtOH
4. 2x 2 min 95% EtOH
5. 2x 2 min 70% EtOH
6. 2x 2 min ddH₂O

B) Färbung:

1. 5 min 1% Kresylviolettlösung (in Acetatpuffer)

Abschließend wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt.

2.3.1.4. Analyse mittels ImageJ Software

Als Grundlage der quantitativen Analyse dienten Hellfeldaufnahmen am BX60-Mikroskop mit 2er Objektiv. Mehrere sich überlappende Einzelaufnahmen wurden anschließend mit Hilfe von Photoshop CS6 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Ireland) zu einer Gesamtaufnahme pro Schnitt zusammengefügt (*Photomerge* Funktion). Anhand dieser Gesamtaufnahme wurden in Image J die Flächen von Kortexareal beziehungsweise Gesamthirn ausgemessen. Dazu wurde per *free hand tool* Funktion das jeweilige Areal markiert und die Fläche bestimmt (Skalierung 2er Objektiv 309 Pixel = 1000 µm beziehungsweise 62 Pixel = 200 µm), wobei von nasal (rostral) beginnend jeder erste Schnitt auf jedem fünften Objektträger analysiert und nachfolgend das Volumen berechnet wurde. Die korrekte Auswahl des Kortex erfolgte mit Hilfe des Allen Brain Atlas⁴ und „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“ (Franklin und Paxinos, 2008).

2.3.2. Immunhistochemie und quantitative Analyse zerebraler Zellpopulationen

Alle Färbungen, Bildaufnahmen am Mikroskop und Quantifizierungen von Schnitten erfolgten nach vorheriger Verblindung.

⁴ <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>, abgerufen am 25.06.2018.

2.3.2.1. Perfusion, Hirnentnahme und Kryokonservierung

8-10 Wochen alte Tiere wurden mittels intraperitonealer Applikation von Ketamin und Xylazin anästhesiert und transkardial nach medianer Laparotomie und Eröffnung des Thorax mit ca. 50 ml 0,9 % NaCl zum Auswaschen des Blutes und nachfolgend mit 50 ml 4% PFA (Fixation) perfundiert. Dazu wurde die Kanüle (26G) des Perfusionssystems in den linken Ventrikel eingebracht und der rechte Vorhof eröffnet, um den Abfluss der Perfusionslösung zu gewährleisten. Nach Dekapitation und Freipräparation konnten die Gehirne im Ganzen entnommen, über Nacht in 4% PFA nachfixiert und anschließend in einer aufsteigenden Reihe von 10%, 20% und 30% Saccharose für je 24 h bei 4°C kryoprotectiert werden. Nach Entfernung überschüssiger Saccharose erfolgte das Schockgefrieren der Hirne in 2-Methylbutan auf Trockeneis. Bis zur Schnittherstellung wurden die Hirne bei -80°C gelagert.

Neonatale Tiere im Alter P4 (postnataler Tag 4) wurden dekapitiert, die Gehirne freipräpariert und über Nacht in 4% PFA fixiert. Kryoprotektion und Schockfrieren erfolgte analog zum Vorgehen bei adulten Tieren (siehe oben).

2.3.2.2. Gefrierschnittherstellung

Zur Schnittherstellung erfolgte eine Einbettung der tiefgefrorenen Gehirne in Tissue Freezing Medium®. Anschließend wurden die tiefgefrorenen Hirne am Kryostaten bei -20°C in koronarer Ausrichtung mit einer Schnittdicke von 14 µm geschnitten. Dabei wurden jeweils fünf definierte Ebenen (Level 1-5, Level 1: interaural 6,60 mm; Level 2: 5,34 mm; Level 3: 3,94 mm; Level 4: 1,86 mm; level 5: -0,08 mm) auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgenommen (Vgl. Rosenberger et al., 2014). Bis zur weiteren Verwendung im Sinne immunhistochemischer Färbungen wurden die Kryoschnitte bei -80°C gelagert.

2.3.2.3. Immunhistochemie und quantitative Analyse

Für die weitere immunhistochemische Färbung wurden die Gefrierschnitte initial bei Raumtemperatur für 15 min mit 4% PFA fixiert, anschließend in einer Küvette mit PBS 3 x 5 min gewaschen und 1 h mit Blockpuffer präinkubiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit Erstantikörper über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde erneut mit PBS 3

x 5 min gewaschen und für 1 h mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper inkubiert. Die jeweiligen Verdünnungen der Erst- und Zweitantikörper sind in Tabelle 4 angegeben. Ab Zugabe des Zweitantikörpers war ein sorgfältiges, lichtgeschütztes Arbeiten indiziert. Nuklei wurden durch Inkubation mit DAPI für 1 min bei Raumtemperatur (RT) gefärbt. Nach erneutem Waschen mit PBS (3 x 5 min) wurden die Objektträger mit ImmoMount eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Paraffinschnitte wurde zunächst nach dem gleichen Entparaffinierungs-Protokoll wie im Rahmen der Nissl-Färbung vorbereitet (siehe Kapitel 2.3.1.3). Anschließend erfolgte zur Antigendemaskierung eine Behandlung mit Retrieval-Lösung unter Hitzeanwendung (Mikrowelle, 3 min bei Siedetemperatur). Nach Abkühlen auf 50°C erfolgte ein erneutes Erhitzen für 3 min. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Waschen der Objektträger mit PBS für 2 x 2 min wurde folgendes Immunfluoreszenzfärbeprotokoll durchgeführt:

1. Waschen in PBS für 10 min
2. Waschen in Blockpuffer für 2 x 10 min
3. Präinkubation mit 20 µl Normales Ziegen Serum + 10 µl Blockpuffer je Objektträger für 1 h in Feuchtkammer bei Raumtemperatur
4. Inkubation mit Erstantikörper über Nacht in Feuchtkammer
5. Waschen mit PBS für 2 x 10 min
6. Waschen mit Blockpuffer 1 x 10 min
7. Inkubation mit Zweitantikörper für 2 h in Feuchtkammer bei Raumtemperatur
8. Waschen mit PBS 3 x 10 min
9. Eindeckeln mit Entellan.

Die quantitative Analyse der jeweils angefärbten Strukturen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und manueller Auszählung am Mikroskop (BX51, Magnafire™ software) beziehungsweise mit Photoshop CS6 Software anhand von Schnittaufnahmen (BX51, Magnafire™ software).

Folgende Zielstrukturen wurden angefärbt: Neurone mittels anti-NeuN (ABN78, Merck Millipore, Deutschland), Mikroglia mittels anti-Iba1 (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland), Astrozyten mittels anti-GFAP (MAB360, Chemicon®, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland), Oligodendrozyten mittels anti-APC (OP80, Calbiochem®, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland), Myelin mittels anti-MBP (LV 1505487, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und proliferierende Zellen mittels anti-ki67

Antikörper (RBK027, Zytomed systems GmbH, Berlin, Deutschland), sowie Nuklei mit DAPI (4',6-Diaminidin-2`phenylindoldihydrochlorid, Sigma-Aldrich, jetzt Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Die Quantifizierung von Neuronen, Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten erfolgte im neonatalen Neokortex in einem repräsentativem Sichtfeld je Hemisphäre in Ebene 4. Dafür wurden mittels BX51 Mikroskop (MagnaFire™ Kamera und Software, Olympus, USA) Aufnahmen repräsentativer neokortikaler Felder im Bereich von primärem motorischem und sensorischem Kortex in 40x Vergrößerung gemacht und angefärbte Zielstrukturen manuell mit Photoshop CS6 Software ausgezählt. Der Mittelwert pro Tier beziehungsweise Genotyp wurde nachfolgend berechnet.

Im adulten Tier wurden Neuronen, Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten im Neokortex in einem repräsentativem Feld im Bereich des primären sensorischen und motorischen Kortexes (über die gesamte Kortexhöhe) je Hemisphäre in Ebene 4 quantifiziert. Als Referenz bezüglich Ebene und exakten Arealen diente der Bildatlas von Franklin und Paxinos (Franklin und Paxinos, 2008). Mittels BX51 Mikroskop (MagnaFire™ Kamera und Software, Olympus, USA) wurden mehrere sich überlappende Aufnahmen in 20x Vergrößerung angefertigt, diese anschließend mit Adobe Photoshop C6 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) mittels Photomerge-Funktion zu einem Bild zusammengefügt und angefärbte Zielstrukturen manuell ausgezählt. Der Mittelwert pro Tier beziehungsweise Genotyp wurde nachfolgend berechnet.

Im Hippocampus (CA1-Region) adulter Tiere wurden NeuN⁺ und DAPI⁺ Zellen pro repräsentativem Feld je Hemisphäre in Ebene 4 anhand von Aufnahmen in 100x Vergrößerung mittels BX51 Mikroskop quantifiziert.

Myelinhaltige Strukturen wurden mittels MBP angefärbt und je Hemisphäre ein repräsentatives Sichtfeld im Bereich des Neokortex in 60x Vergrößerung mittels BX51 Mikroskop fotografiert. Unter Verwendung von ImageJ Software (Version 1.41o, Java 1.6.0_10, Wayne Rasband, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) wurde die MBP⁺ Fläche berechnet und die Mittelwerte je Genotyp miteinander verglichen.

Proliferierende Zellen wurden mit ki67-Antikörper angefärbt und im adulten Tier im Bereich bekannter Stammzellnischen, das heißt der subventrikulären Zone sowie der subgranulären Zone (Hippocampus), je Hemisphäre ki67⁺-Zellen direkt am Mikroskop manuell mittels Zellzähler quantifiziert.

Als Layermarker dienten Cux1 (Layer II-IV) und Ctip2 (Layer V-VI). Die Quantifizierung im Neokortex adulter Tiere erfolgte analog zum Vorgehen der Quantifizierung von Neuronen.

2.3.3. Golgifärbung und morphologische Analyse kortikaler Neurone

Eine Golgifärbung ermöglicht die Analyse neuronaler Morphologie *in vivo*. Da nur ein Bruchteil der Neurone (ca. 1-3%) angefärbt wird (Spacek et al., 1989), ist eine detaillierte Analyse axonaler und dendritischer Arborisierung möglich.

Die Ursprünge dieser Färbemethode reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück, als der italienische Naturwissenschaftler Camillo Golgi die nach ihm benannte Golgi-Methode auf Basis von Kaliumdichromat und Silbernitrat entwickelte. Anschließend kam es zu einer entscheidenden Modifizierung durch den spanischen Neuroanatomen Ramón y Cajal unter dem Namen Rapid Golgi Method (Ramón y Cajal, 1972). Die Reichweite dieser Färbemethode wird deutlich, als im Jahr 1906 die beiden genannten den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie für ihre Arbeit und Erkenntnisse über die Funktion neuronaler Netzwerke erhielten. Bis heute ist die Färbemethode ein wichtiges Werkzeug bei der Analyse neuronaler Morphologie, obwohl es sich um eine zeitaufwendige, komplexe und fehleranfällige Färbemethode handelt. Daher streben neuere Protokolle eine Vereinfachung und Verkürzung der Methode an. Bereits seit 2002 sind kommerzielle Kits (FD Rapid GolgiStain™ Kit, FD Neuro-Technologies, Columbia, USA) auf dem Markt. Prinzipiell werden drei Klassen der Golgi-Methode unterschieden, Rapid Golgi, Golgi-Kopsch und Golgi-Cox (Koyama, 2013). Allen gemeinsam ist die Verwendung von Dichromsäure. Jede der drei Variationen hat spezifische Vor- und Nachteile, sodass die Wahl der Methoden insbesondere vom Alter der zu untersuchenden Hirne und den zu untersuchenden Strukturen abhängig ist. Rapid Golgi eignet sich insbesondere für ältere Tiere und ist daher bei embryonalen Hirnen oder postnatalen Tieren nicht Mittel der Wahl. Golgi-Kopsch hingegen eignet sich unabhängig von Alter und Hirnregion. Golgi-Cox wiederum zeichnet sich durch eine besonders hintergrundarme Färbung aus und ist

insbesondere für die Analyse des dendritischen Baumes kortikaler Neurone am besten geeignet (Koyama, 2013).

Da im Rahmen der morphologischen Analyse kortikaler Neurone der Fokus auf deren Arborisierung gelegt wurde, kam eine Methode nach Golgi-Cox zur Anwendung. Gefärbt wurde jeweils die rechte Hemisphäre acht Wochen alter adulter Tiere. Dabei kam folgendes Protokoll, welches durch Mitarbeiter der kooperierenden Arbeitsgruppe Kaindl, namentlich Sami Zaout, etabliert und veröffentlicht wurde (Zaout und Kaindl, 2016), zur Anwendung.

Zunächst wurden vorbereitend die notwendigen Lösungen (drei Basislösungen, Golgi-Cox-Lösung, Gewebeprotektionslösung und Entwicklungslösung) hergestellt.

Drei Basislösungen (werden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert):

1. 15 g Kaliumdichromat in 300 ml dd-H₂O
2. 15 g Quecksilberchlorid in 300 ml dd-H₂O
3. 15 g Kaliumchromat in 300 ml dd-H₂O

Anschließende Herstellung der Golgi-Cox-Lösung mittels der drei Basislösungen:

1. 50 ml Kaliumdichromatlösung mit 50 ml Quecksilberchloridlösung mischen
2. 40 ml Kaliumchromatlösung hinzufügen
3. 100 ml dd-H₂O hinzugeben

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln und für mindestens 48 h vor der weiteren Verwendung, damit es zur Fällung kommen kann.

Gewebeprotektionslösung:

1. 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) herstellen durch Lösen von 1,59 g Natrium-Hydrogen-Phosphat-Monohydrat, 5,47 g Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat wasserfrei und 9,0 g Natriumchlorid in 500 ml dd-H₂O
2. Zu 500 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) 300 g Saccharose, 10 g Polyvinylpyrrolidon und 300 ml Ethylenglykol hinzugeben und auf 1000 ml ddH₂O auffüllen.

Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Dunkeln. Die Gewebeprotektionslösung wurde zudem auch zum Befüllen der Schneidekammer am Vibratom im Rahmen der späteren Schnittherstellung verwendet.

Entwicklungslösungen (Lagerung bei Raumtemperatur):

1. 50, 70, 95, und 100% Ethanolreihe
2. Xylol
3. 3:1 Ammoniak : dd-H₂O
4. 5% Natriumthiosulfat (15 g Natriumthiosulfat in 300 ml dd-H₂O), anschließend Lagerung im Dunkeln

Herstellung von Gelatine-beschichteten Objektträgern:

Die Objektträger wurden zunächst mit dd-H₂O gewaschen und bei Raumtemperatur staubfrei getrocknet. Anschließend erfolgte die Beschichtung der Objektträger in einem Objektträgerhalter mit 3%-iger Gelatine (Eintauchen für 10 min) und staubfreies Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur.

Imprägnierung:

Adulte Mäuse im Alter von 8-10 Wochen wurden mittels Genickbruch getötet und das Gehirn herauspräpariert. Anschließend wurde das Gehirn sagittal halbiert und die rechte Hemisphäre jeweils mit 10 ml Golgi-Cox-Lösung imprägniert. Dabei ist ein vorsichtiges Pipettieren der Lösung notwendig, um die am Boden entstandenen Präzipitate nicht zu transferieren. Nach 24 h Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Golgi-Cox-Lösung erneuert und die Hemisphären für weitere 7-10 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur imprägniert.

Gewebeprotektion:

Nach Abschluss der Imprägnierung wurde jede Hemisphäre mit dd-H₂O gewaschen, in 10 ml Gewebeprotektionslösung gegeben und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Nach 24 h wurde die Lösung erneuert und die Gewebeprobe für weitere mindestens 72 h (bis max. eine Woche) belassen.

Schneiden von Gehirngewebe am Vibratom:

Zunächst wurden die Gewebeproben mittels 4% Agarose (2 g low melting point agarose in 50 ml dd-H₂O bei 47°C vollständig lösen) in Blöcke eingebettet (disposable plastic embedding molds (18646A, Polysciences Inc., PA, USA)) und bei 4°C ausgehärtet. Am Vibratom (Microm; HM_650V, Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland) wurden sagittale Schnitte von 200 µm Dicke hergestellt (Frequenz 60 Hz, Geschwindigkeit 15 mm/s), von vorbereiteten Gelatine-beschichteten Objektträgern

aufgenommen und im Dunkeln für 2-3 Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Im Rahmen des Entwicklungsprozesses wurden die Objektträger zunächst 2 x 5 min in Aqua dest. gewaschen und anschließend 5 min in 50% Ethanol gestellt. Nach Transfer in 3:1 Ammoniaklösung und Inkubation hierin für 8 min erfolgte erneutes Waschen mit Aqua dest. für 2 x 5 min. Ab der Inkubation in 5% Natriumthiosulfat für 10 min war ein lichtgeschütztes Vorgehen notwendig. Vor dem Eindeckeln mit Eukitt erfolgte nochmaliges Waschen der Objektträger mit Aqua dest. für 2 x 1 min, der Transfer in eine aufsteigende Alkoholreihe von 70, 95 und 100% Ethanol für je 6 min und zum Schluss 6 min in Xylol. Nach dem blasenfreien Eindeckeln wurden die Ränder der Deckgläschen mit konventionellem Nagellack versiegelt und die Objektträger bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Morphologische Analyse der Arborisierung kortikaler Neurone:

Ziel der morphologischen Analyse war die Quantifizierung der Arborisierung kortikaler Neurone. Diese erfolgte verblindet anhand von Z-Stack-Aufnahmen, aufgenommen am Olympus IX81 Mikroskop mit 1 µm Abständen (Hellfeld, 10x, F View II (sw) Kamera (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland)) mittels Adobe Photoshop CS6 Software und ImageJ Software (inkl. Concentric Circles Plug-In). Im Sinne einer modifizierten Sholl-Analyse (Sholl, 1953) wurden um die Somata kortikaler Neurone 30 konzentrische Kreise gelegt (Abstand jeweils 10 µm) und manuell anhand der 3D-Rekonstruktion dieser Neurone Kreuzungsstellen von Dendriten und Kreisen quantifiziert. Als Parameter wurden die absolute Zahl von Kreuzungsstellen, sowie die Anzahl der Kreuzungsstellen in Abhängigkeit zur Distanz vom Soma ausgewertet.

2.3.4. Proteinanalyse mittels Western Blot

Für die Proteinbestimmung mittels Western Blot wurden Zelllysate aus den rechtshemisphärischen Kortizes von Tieren im Alter von 8-10 Wochen hergestellt. Dazu wurden die Tiere per Genickbruch getötet, das Gehirn entnommen und sagittal in linke und rechte Hemisphäre geteilt. Anschließend wurde der rechtshemisphärische Kortex mikroskopisch präpariert, in 500 µl Lysepuffer (PMSF/SDS-Lysepuffer 1:10) gegeben und nach folgendem Protokoll Proteinlysate hergestellt.

Protokoll Lysatherstellung:

1. Gewebe 5-10 sec mittels Ultra-Turrax® dispergieren (Stufe 4, 17500 rpm)
2. 3-5 sec sonifizieren (Geräteeinstellung 70)
3. 30 min auf Eis kühlen
4. 20 min bei 4° C und 12000 rpm zentrifugieren
5. Überstand (Lysat) abnehmen und in neuem Eppendorfgesäß bei -20°C bis zur weiteren Verwendung lagern

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysate erfolgte mittels BCA Protein Assay Reagent Kit. Der BCA-Assay (Bicinchoninsäure) basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} ; letzteres bildet mit BCA Farbkomplexe aus. Diese können fotometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen und dadurch die Proteinkonzentration berechnet werden (Smith et al., 1985; Olsen und Markwell, 2007). Die Lysate wurden als Duplikate in einer Verdünnung von 1:10 quantifiziert.

Die Probenauftrennung erfolgte mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), wobei eine Kombination aus Sammel- und Trenngel verwendet wurde. Als Trenngel wurden je nach Proteingröße solche mit 10% bzw. 12% Acrylamid verwendet. Jede Geltasche wurde mittels Hamiltonspritze mit 10 µg Protein beladen (20 µl des folgenden Ansatzes: 19 µl Probenvolumen in Aqua dest mit 6 µl Ladepuffer; dieser Ansatz wurde zuvor 5 min bei 95°C erhitzt und das Kondensat herunterzentrifugiert), sowie separat 5-8 µl des Markers aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde im Sammelgel eine Spannung von 70 mV angelegt, im Trenngel ca. 140 mV. Damit ergab sich eine Laufzeit von ca. 1 h.

Tabelle 7: Protokoll Sammel- und Trenngel für Western Blot

	Sammelgel	Trenngel	
		10%	12%
H ₂ O	4,5 ml	7,7 ml	6,9 ml
Trenngelpuffer	----	4,1 ml	4,0 ml
Sammelgelpuffer	1,9 ml	----	----
40% Acrylamid	810 µl	4,0ml	4,8 ml
10% SDS	75 µl	160 µl	160 µl
APS	57 µl	80 µl	80 µl
TEMED	19 µl	32 µl	32 µl
Σ		2x 3,9 ml/Gel	2x 3,9 ml/Gel

Anschließend wurde im Semi-dry-Verfahren geblottet und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) übertragen. Dazu wurde das Gel für 15 min im Transferpuffer equilibriert und die PVDF-Membran in Methanol für 15 sec aktiviert, in Aqua dest für 2 min gewaschen und bis zur weiteren Verwendung im Transferpuffer belassen. Das Filterpapier wurde mit Transferpuffer befeuchtet. Der Proteintransfer erfolgte über eine 1 h bei einer konstanten Spannung von 15 V (Blotaufbau von unten nach oben: Anode, Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier, Kathode).

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran 2x in TBST gewaschen und bei Raumtemperatur für 1 h in 10 ml Blockpuffer (5% Milch) blockiert. Die Inkubation mit Erstantikörper (verdünnt in 10 ml Blockpuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach erneutem Waschen mit TBST für 3 x 10 min wurde zur Inkubation mit dem Zweitantikörper (Horseradish-Peroxidase-gekoppelt) dieser in 10 ml Blockpuffer (1:5000) gegeben und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Entwicklung erfolgte ein erneutes Waschen mit TBST (3 x 10 min). Alle Wasch-, Blockierungs- und Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler (50 rpm) durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und Konzentrationen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Die Entwicklung wurde mittels ECL Western Blotting Detection Reagent durchgeführt (Protokoll nach Herstellerangaben). Dazu erfolgten digitale Aufnahmen. Die Belichtungszeit betrug je nach Antikörper 1-5 min beziehungsweise für die β -Aktin-Ladekontrolle 10 sec. Die Bilder wurden als .tif (8-bit) gespeichert.

Als Ladekontrolle fungierte β -Aktin. Dazu wurde die PVDF-Membran mit Strippingpuffer von Antikörpern befreit (10 min bei RT) und mit TBST für 5 min gewaschen. Inkubation und Entwicklung erfolgten analog den oben beschriebenen Schritten.

Eine quantitative Analyse der Signalintensität der jeweiligen Bande erfolgte mittels ImageJ Software. Dabei wurden die spezifischen Banden mit dem Rectangular-Tool umrandet und über die Funktion „Analyze – Gels – Select first lane“ und nachfolgend „Analyze – Gels – Plot lanes“ in einen Graphen übersetzt und die Bandenintensität (entspricht dem Proteingehalt) als *Area under the curve* verglichen. Dieses Verfahren wurde sowohl für die spezifischen Banden des jeweiligen Protein of Interest als auch für die korrespondierende β -Aktin-Ladekontrolle im Sinne der Qualitätskontrolle einer gleichmäßigen Proteinladung durchgeführt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 7.

2.3.5. Verhaltensstudien

Verhaltensstudien wurden in Kooperation mit der Animal Outcome Core Facility (AOCF) am Charité Campus Mitte durchgeführt. Die Evaluierung des MyD88-defizienten Phänotyps erfolgte anhand folgender fünf Tests:

1. SHIRPA
2. Barnes Maze
3. Open Field
4. Social Activity Monitoring (SAM)
5. Home Cage Scan (HCS),

Bei einer Gruppengröße von $n = 15$ für den jeweiligen Genotyp (WT bzw. *Myd88*^{-/-}) erfolgte aufgrund räumlicher Kapazitäten der AOCF und einer Protokoll-bedingten Obergrenze von maximal 16 Tieren im Barnes Maze eine Aufteilung der Tiere in zwei Kohorten (Kohorte #1, WT $n = 7$, *Myd88*^{-/-} $n = 7$ und Kohorte #2, WT $n = 8$, *Myd88*^{-/-} $n = 8$). Beide Kohorten wurden vor dem Transfer in die AOCF durch eine dritte Person verblindet.

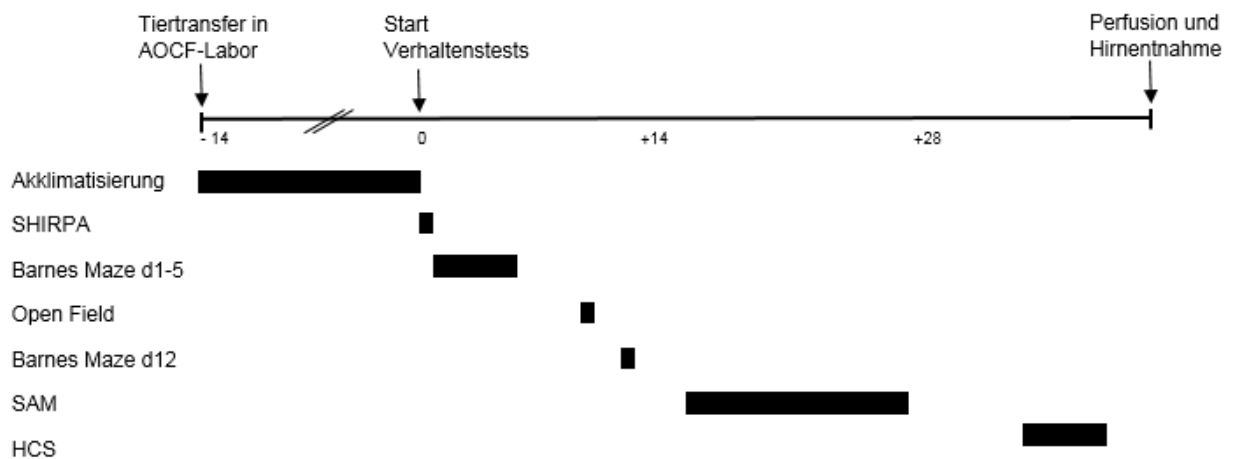


Abbildung 1: Experimentelles Design der Verhaltensstudien im zeitlichen Überblick. Angaben in Tagen. SAM = Social Activity Monitoring. HCS = Home Cage Scan.

Den eigentlichen Tests ging jeweils eine zweiwöchige Akklimationierungsphase voraus, in der sich die Tiere sowohl an die räumliche Umgebung der AOCF als auch durch tägliche Handhabung an die Personen, die im Folgenden die Tests durchführten, gewöhnten. Somit konnten externe Stressoren während der nachfolgenden Tests minimiert werden. Die genaue zeitliche Abfolge der Verhaltenstests ist Abbildung 1 zu entnehmen.

Zwischen den einzelnen Tests wurden die Mäuse in standardisierten Käfigen in angereicherter Umgebung in Gruppen von 3-5 Tieren mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Es erfolgte ein wöchentlicher Einstreuwechsel; der Hell-Dunkel-Zyklus betrug 12/12-Stunden.

2.3.5.1. SHIRPA

SHIRPA ist eine standardisierte Zusammenstellung einzelner Untersuchungen, die ein generelles Erfassen des Phänotyps von (genetisch veränderten) Mäusen ermöglicht. Dieser Test ist ein wichtiger Bestandteil von Verhaltensstudien und dient als Interpretationsgrundlage etwaiger Auffälligkeiten in weiterführenden Tests.

SHIRPA wurde 1997 von einer Gruppe von Wissenschaftlern in Zusammenarbeit mit dem Pharmaunternehmen SmithKline Beecham in Großbritannien entwickelt (Rogers et al., 1997). Das Akronym steht für *SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment*.

Gemäß Extended SHIRPA-Protokoll modifiziert nach Riken und Irwin⁵ wurden folgende Parameter erhoben:

Tabelle 8: SHIRPA-Protokoll – Erhobene Parameter

General health	<ul style="list-style-type: none"> - Body and tail length - Weight - Sex
Physical characteristics	<ul style="list-style-type: none"> - Body position - Limb, tail, head, whisker, ear morphology - Coat color - Skin color of plantar surface - Hair length and morphology - Piloerection - Eye characteristics - Lacrimation, salivation - Abnormal physical features
General behavior	<ul style="list-style-type: none"> - Locomotor activity - Spatial locomotion - Gait

⁵ http://ja.brc.riken.jp/lab/bpmp/SDOP/en/mc/shirpa/filter_index.html, abgerufen am 11.10.2017.

	<ul style="list-style-type: none"> - Pelvic and tail elevation - Grip strength
Abnormal behavior	<ul style="list-style-type: none"> - Abnormal and stereotyped behavior - Convulsions - Tremor - Twitches - Provoked freezing
Reflexes	<ul style="list-style-type: none"> - Object approach (cotton-tip swab) - Vibrissa placing response when touched - Back touch escape - Acoustic startle response - Inclined plane - Pinna and corneal reflex - Air righting reflex - Limb grasping while tail suspension - Visual placing - Wire maneuver
Other	<ul style="list-style-type: none"> - Vocalization during handling - Urination and defecation - Diarrhea

2.3.5.2. Barnes Maze

Räumliches Lernen und Gedächtnis (Kurz- und Langzeitkonsolidierung) wurden mittels Barnes Maze Test analysiert. Der Test wurde ursprünglich 1979 für Ratten entwickelt (Barnes, 1979) und später auch für Mäuse etabliert (Bach et al., 1995). Das Testkonzept basiert auf der antrainierten Fähigkeit, mit Hilfe räumlicher Hinweise den Ort einer Fluchtbox wiederholt aufzufinden. Diese Fähigkeit wird als Hippocampus-abhängig beschrieben (Pitts, 2018).

Das hierbei verwendete Labyrinth besteht aus einer runden, weißen Plattform (Durchmesser 920 mm in einer Höhe von 800 mm über dem Boden), an deren Rand 20 Löcher (Durchmesser 45 mm) in gleichem Abstand angeordnet sind. Unter einem dieser Löcher ist eine Fluchtbox angebracht (für die Dauer der Trainingstage, anschließend wird

diese entfernt). An den Wänden um die Plattform sind vier schwarz-weiße geometrische Formen als räumliche Orientierungspunkte angebracht.

Die Testtiere wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen (Trainingstage 1-4) jeweils in vier aufeinanderfolgenden Durchgängen (mit einem optimalen Abstand zwischen den jeweiligen Durchgängen von 15 min) darauf trainiert, das Zielloch mit der darunter befindlichen Fluchtbox zu finden und in diese zu gelangen. Als Fluchtstimulus dienten die exponierte, hell ausgeleuchtete Plattform sowie ein aversiver akustischer Reiz. Zur Überprüfung der Gedächtnisleistung wurde an Tag 5 (Kurzzeitkonsolidierung) und Tag 12

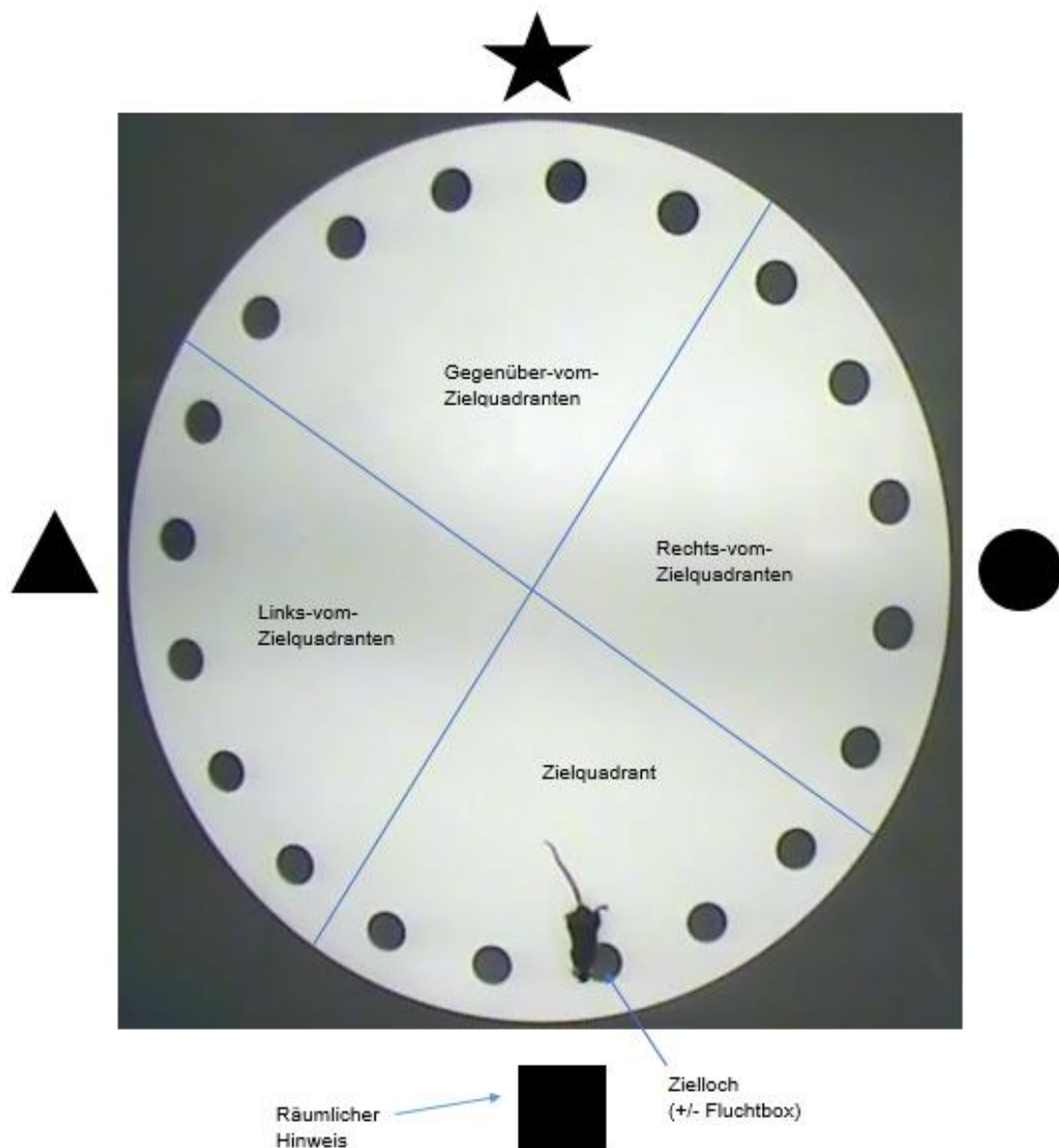


Abbildung 2: Aufbau Barnes Maze. Einteilung in vier Quadranten mit jeweils vier räumlichen Hinweisen an den Wänden. Maße: Platte 920 mm Durchmesser, 10 mm Dicke, angebracht in 800 mm Höhe. 20 Löcher mit einem Durchmesser von 45 mm. Die Fluchtbox wurde an den Testtagen d5 und d12 entfernt. Sicht aus Kameraperspektive.

(Langzeitkonsolidierung) nach einem modifizierten Protokoll das jeweilige Tier getestet, Details dazu weiter unten.

Die Aufzeichnung des Bewegungsmusters erfolgte mittels einer zentral über der Plattform angebrachten Videokamera und Viewer Software (Biobserve GmbH, Bonn, Deutschland) und ermöglichte eine Registrierung der Aufenthaltsdauer innerhalb vier definierter Quadranten sowie die Anzahl der Kontakte mit den einzelnen Löchern des Labyrinths (Abbildung 2).

Ablauf Trainingstag (Tag 1-4): Zur Eliminierung olfaktorischer Hinweise wurde das Labyrinth zu Beginn mit 5% Ethanol gereinigt. Die Startkammer wurde in der Mitte des Labyrinths platziert und das Testtier hineingesetzt. Nach 10 sec wurde die Startbox entfernt und die Testzeit von maximal drei Minuten begann. Durch das Entfernen der Startbox wurde das Tier den aversiven Stimuli (helles Licht (500 lx) und Lärm (white noise durch Radio, 80 dB)) ausgesetzt und dadurch motiviert, diesen durch Aufsuchen der dunklen Fluchtbox zu entfliehen.

Das Tier hatte in der Trainingsphase maximal drei Minuten Zeit, die Fluchtbox aufzusuchen. Befand sich das Tier in der Box, wurde der aversive Stimulus ausgeschaltet und das Tier für eine Minute in der Fluchtbox belassen. Wenn nach Ablauf der 3 min das Tier die Fluchtbox nicht aufgesucht hat, wurde es in diese transferiert und dann ebenfalls nach Ausschalten der Stimuli für 1 min in der Box belassen. Verließ das Tier innerhalb dieser Minute die Fluchtbox, wurde es jeweils wieder in diese zurückgesetzt.

Anschließend wurde das Tier zurück in den Gruppenkäfig transferiert, bevor es nach ca. 15 Minuten erneut getestet wurde (insgesamt vier Trainingsdurchläufe pro Tier und Trainingstag). Nach jedem Trainingsdurchlauf wurde das Labyrinth wie zu Beginn mit 5% Ethanol gereinigt. Als Parameter wurden erhoben: Latenz bis zum erstmaligen Auffinden des Zielloches [s]; zurückgelegte Distanz [m]; Latenz bis zum Aufsuchen der Fluchtbox [s]; Anzahl der Fehler.

Ablauf Testtag (Tag 5 und 12): Im Vergleich zu den Trainingstagen (Tag 1-4) gab es drei wesentliche Unterschiede im Testprotokoll der Testtage (Tag 5 und 12). Jedes Tier wurde nur einmal für einen Zeitraum von 90 sec und ohne Vorhandensein der Fluchtbox getestet. Die Anordnung der räumlichen Hinweise entsprach den Trainingstagen.

Zu Beginn und zwischen der Testung der einzelnen Tiere wurde das Labyrinth zur Eliminierung olfaktorischer Reize mit 5% Ethanol gereinigt. Wieder dienten das

Radiorauschen und die Lichtexposition nach Entfernen der Startkammer als aversive Reize. Der Test endete nach Ablauf von 90 Sekunden und das Testtier wurde zurück in den Gruppenkäfig transferiert. Als Parameter wurden erhoben: Latenz bis zum erstmaligen Auffinden des Ziellocks [s]; zurückgelegte Distanz [m]; Anzahl der Fehler; Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Quadranten [s].

2.3.5.3. Open Field Test

Das Verhalten von Mäusen in einer neuen Umgebung (*Novel Arena*) kann mittels Open Field Test evaluiert werden und ermöglicht Rückschlüsse auf genotypisch veränderte Furcht- und Angstlevel. Es wird angenommen, dass Tiere sich in einer ihnen unbekanntem Umgebung explorativ verhalten. Dies wird als zurückgelegte Strecke in einem definierten Zeitraum quantifiziert. Besonders ängstliche Tiere zeigen hingegen ein geringeres exploratives Verhalten und werden daher eine geringere Distanz zurücklegen. In Extremfällen kann es sogar zum sogenannten „freeze“ (Verharren an einer Stelle) kommen (Sousa et al., 2006). Zudem werden sie sich weniger häufig beziehungsweise kürzer in der besonders exponierten zentralen Zone im Vergleich zur peripheren Zone aufhalten.

Vor Beginn des Testes wurden die Tiere in ihren Gruppenkäfigen für eine 30-minütige Akklimationsphase in den Testvorraum transferiert. Als Open Field diente eine weiße PVC-Box (50 x 50 x 50 cm), welche zur Eliminierung olfaktorischer Reize vor jedem Test mit 5% Ethanol gereinigt wurde. Jedes Tier wurde einzeln für einen Zeitraum von 10 min getestet und initial in der Mitte der PVC-Box (Zentralzone) platziert (Abbildung 3). Mittels Viewer Software (Biobserve Inc., Bonn, Deutschland) wurde die zurückgelegte Strecke, anteiliger Aufenthalt in der Zentralzone (16,5 x 16,5 cm) bzw. Peripherie, Anzahl der Zonenwechsel, Latenz bis zum ersten freiwilligen Betreten der Zentralzone und manuell die Anzahl von Defäkationen und Urinieren registriert.

Die Raumbedingungen wurden konstant bei einer Temperatur von 22-24°C, Luftfeuchtigkeit 45-65% und Lichtintensität von 500 lux gehalten, sowie auf die Vermeidung jeglicher akustischer Störgeräusche geachtet. Nach Ablauf der 10-minütigen Testphase wurde das Tier zurück in den Gruppenkäfig transferiert und das Open Field von Kot und Urin gereinigt.

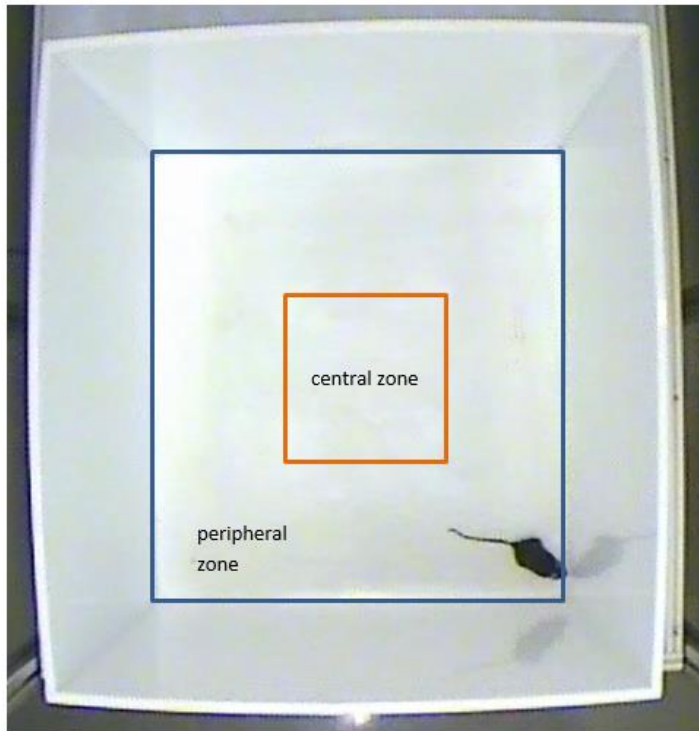


Abbildung 3: Testaufbau Open Field. PVC-Box (50 x 50 x 50 cm) mit Testtier aus Kameraperspektive. Einteilung der zentralen (central zone) und peripheren Zone (peripheral zone).

2.3.5.4. Home Cage Scan

Das natürliche Verhalten einzeln gehaltener Tiere innerhalb ihres Käfigs und unbeeinflusst durch einen menschlichen Experimentator wurde mittels Home Cage Scan (HCS) evaluiert. Per Videoaufzeichnung erfolgt die automatisierte Registrierung definierter Verhaltensweisen.

Dazu wurden die Testtiere jeweils einzeln in Käfigen Typ II mit Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* für einen Testzeitraum von 23 h gehalten. Über den Hell-Dunkel-Zyklus von 11/12 h wurden mittels Analogkamera (video.at) und Infrarotlampe (MIRAI) und HomeCageScan Software (CleverSys Inc., Reston, VA, USA) 16 vordefinierte Verhaltensweisen (Tabelle 9) sowie die zurückgelegte Distanz registriert.

Auf Basis der erhobenen Daten wird eine Quantifizierung definierter Verhaltensweise über einen Zeitraum von 23 h und damit die Erstellung eines Verhaltensprofils ermöglicht. Wobei die ersten 6 h der Aufzeichnungsphase gesondert ausgewertet wurden, um das Verhalten in neuer Umgebung zu charakterisieren. Als weiterer Parameter wurde die zurückgelegte Distanz analysiert.

Tabelle 9: Home Cage Scan – Verhaltensweisen. 16 definierte Verhaltensweisen wurden aufgezeichnet. Diese können in Anlehnung an Adamah-Biassi et al. 4 Kategorien zugeordnet werden (Adamah-Biassi et al., 2013).

Verhaltenskategorie	Verhaltensweise
Aktivitätsphase	<i>Walking; come down; hanging; jumping</i>
Explorationsphase	<i>dig forage; sniffing; stretching; grooming; rearing up; chewing</i>
Verdauungsphase	<i>Drinking; eating</i>
Ruhephase	<i>Awaken; twitching; remaining low; immobile</i>

2.3.5.5. Social Activity Monitoring

Das Social Activity Monitoring (SAM) System (PhenoSys GmbH) ermöglicht eine automatische Registrierung individueller Bewegungsmuster innerhalb sozialer Gruppen. Die Tiere wurden in regulären Typ-II-Käfigen in angereicherter Umgebung und Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* in Gruppen von 4-5 Tieren (gemischte Genotypen) gehalten. Jedes Tier wurde zuvor mittels eines subkutan platzierten RFID-Transponder (Radio Frequency Identification) im Nacken der Tiere markiert. Über ein unter dem Käfig platziertes Gitter von 8 RFID-Lesegeräten wurde die Aktivität (zurückgelegte Distanz im zeitlichen Verlauf) des Tieres über einen Zeitraum von 13 Tagen aufgezeichnet. An Tagen, an denen das Einstreu gewechselt wurde, zeigte sich bei allen Tieren ein Anstieg der Aktivität. Da dieser Anstieg artifiziell durch den Einstreuwechsel von extern getriggert wurde, wurde diese Tage aus der finalen Analyse ausgeschlossen. Damit verblieb ein Zeitraum von 9 Tagen zur finalen Analyse.

2.4. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad PRISM 7 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und RStudio (RStudio Inc., Boston, MA, USA). Soweit nicht anders angegeben, wurde der Student's *t*-Test oder Wilcoxon rank-sum Test durchgeführt. Im Falle von SAM und HCS können multiple Faktoren möglicherweise die erhobenen Daten beeinflussen. Daher wurde MCMCglmm (Generalized Linear Mixed Model with Markov Chain Monte Carlo method, GLMM) verwendet, um den Einfluss aller

Variablen auf solche von größtem Interesse zu untersuchen (beispielsweise Genotyp, Zeit und Hell/Dunkel-Phase). Ergebnisse wurden folgendermaßen als signifikant definiert: * wenn $p \leq 0,05$, ** wenn $p \leq 0,01$ und *** wenn $p \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Expression des TLR-Adapterproteins MyD88 auf die Struktur des Gehirns und das Verhalten der Maus untersucht. Es wurden zwei Altersstufen analysiert: neonatal (4. Postnataler Tag (P4)) und adult (8-10 Wochen). Zunächst erfolgte mittels in Kapitel 2 beschriebener Methoden eine quantitative Analyse von ZNS-Zellpopulationen inklusive Neurone, Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und proliferierenden Zellen im Neokortex neonataler und adulter MyD88-defizienter Mäuse. Als Vergleichsgruppe dienten Wildtyp-Mäuse (WT) des gleichen Stammes (C57BL/6). Des Weiteren wurden morphologische Analysen wie die Bestimmung der Kortexhöhe und die Analyse der Arborisierung neokortikaler Neuronen an MyD88-defizienten und WT Tieren durchgeführt.

Zur Charakterisierung eines spezifischen Phänotyps MyD88-defizienter Mäuse wurden Verhaltenstests im Vergleich mit WT-Mäusen durchgeführt. Nachfolgend werden die Ergebnisse präsentiert.

3.1. Analyse der Kortexhöhe und Quantifizierung kortikaler Zellpopulationen in neonatalen MyD88-defizienten Mäusen

Zunächst wurde untersucht, ob die Expression von MyD88 Einfluss auf die Höhe des Neokortex hat. Die Kortexhöhe wurde definiert als Höhe des DAPI⁺ Areal im Bereich von primärem motorischem und sensorischem Kortex. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Reduktion der Kortexhöhe neonataler MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zum WT (s. Abbildung 4, fold change 0,875, $p = 0,0280$).

Zur quantitativen Analyse kortikaler Zellpopulationen wurden koronare Hirnschnitte neonataler *Myd88*^{-/-} und WT-Mäuse immunhistochemisch mit anti-NeuN Antikörper zur Markierung von Neuronen, sowie mit DAPI zur Darstellung aller Zellen innerhalb des auszuwertenden Areals gefärbt. Antikörper gegen Iba1, APC und GFAP wurden zur Identifizierung von Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten genutzt.

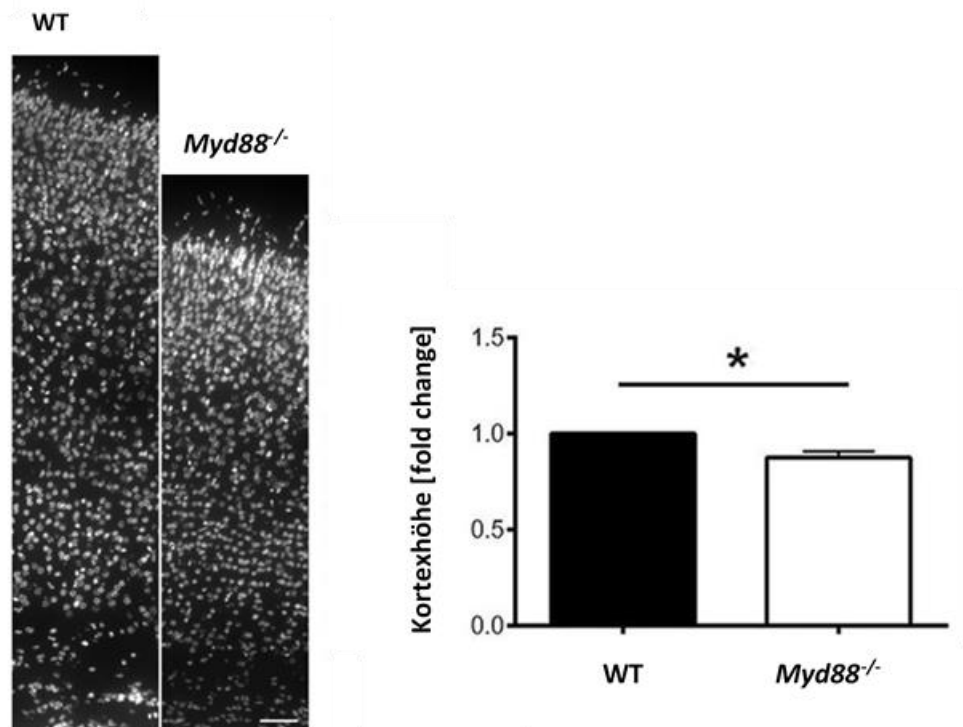


Abbildung 4: Analyse der Kortexhöhe neonataler *Myd88*^{-/-} Mäuse. Koronare Hirnschnitte neonataler (P4) WT und *Myd88*^{-/-} Mäuse wurden mit DAPI gefärbt (je $n = 6$). Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 50 μm . Die neokortikale Höhe wurde quantifiziert. Darstellung als fold change. * $p < 0,05$, Student's t -Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

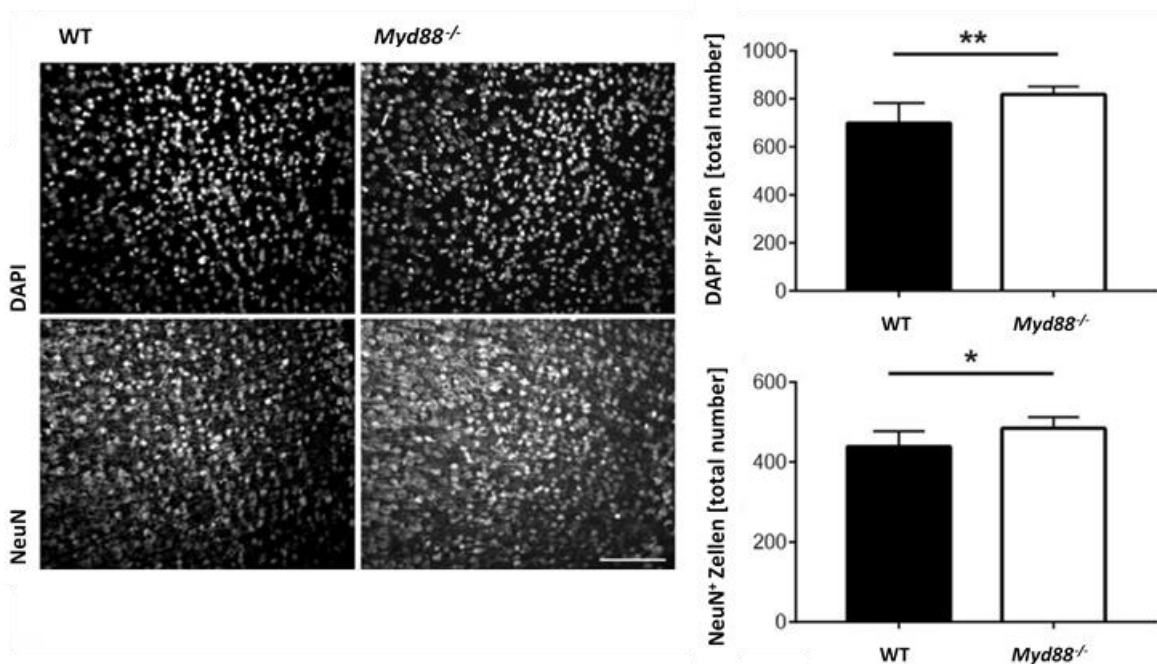


Abbildung 5: Quantifizierung kortikaler Neurone in neonatalen *Myd88*^{-/-} Mäusen. Koronare Hirnschnitte neonataler (P4) WT und *Myd88*^{-/-} Mäuse wurden mit anti-NeuN Antikörper und DAPI immunhistochemisch gefärbt (je $n = 6$). Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 50 μm . Die Anzahl NeuN⁺ bzw. DAPI⁺ Zellen wurde erfasst. Darstellung als mean \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Student's t -Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung sowohl NeuN⁺ als auch DAPI⁺ Zellen im Neokortex neonataler *Myd88*^{-/-} Mäuse im Vergleich zum WT (s. Abbildung 5, NeuN⁺ (mean ± SEM, WT (439,3 ± 15,48), *Myd88*^{-/-} (484,5 ± 11,26), *p* = 0,0399); DAPI⁺ (mean ± SEM, WT (669,1 ± 33,82), *Myd88*^{-/-} (817,8 ± 13,62), *p* = 0,0087)).

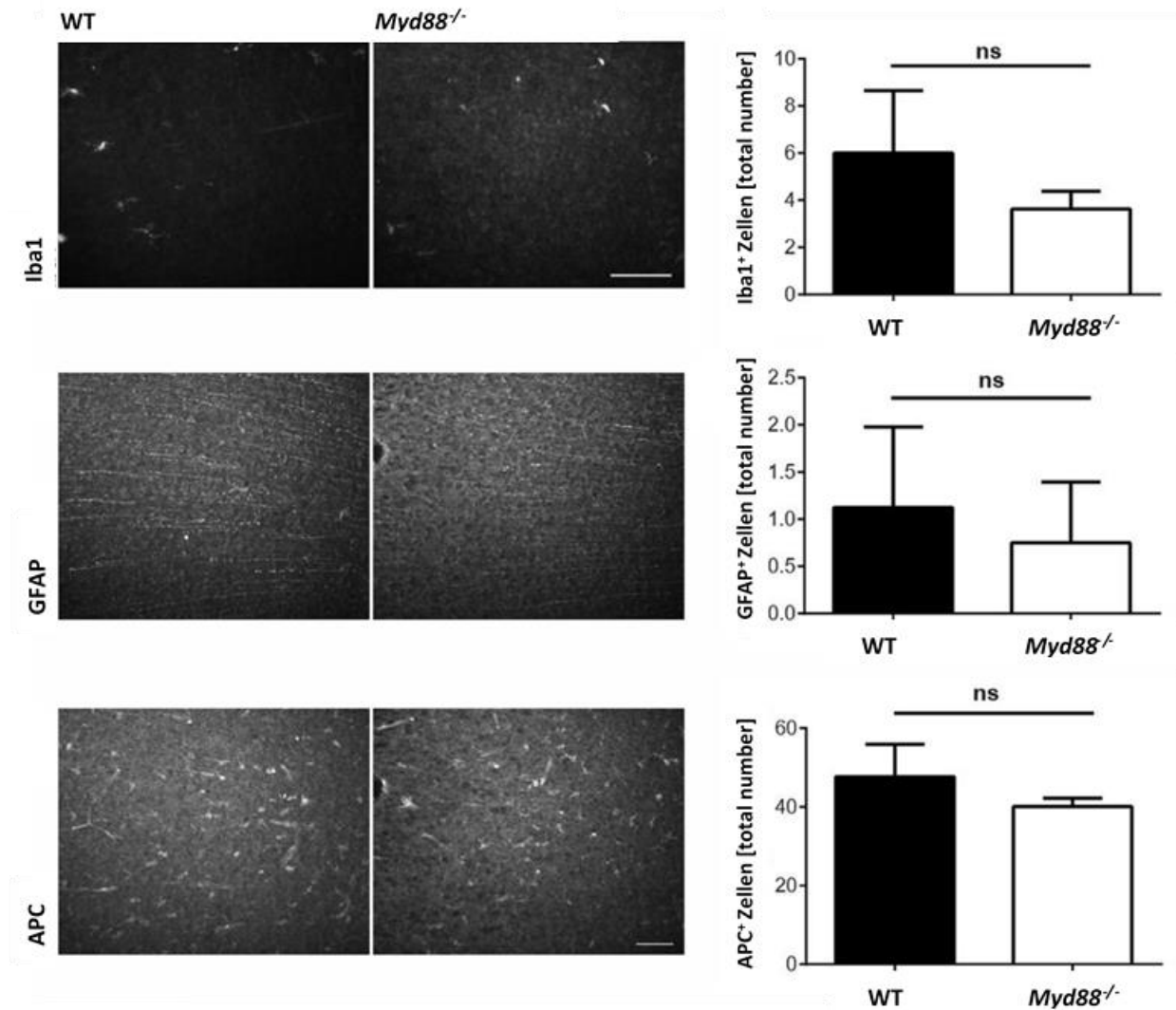


Abbildung 6: Quantitative Analyse von Gliazellen im neonatalen Kortex von *Myd88*^{-/-} Mäusen. Koronare Hirnschnitte neonataler (P4) WT und *Myd88*^{-/-} Mäuse wurden mit anti-Iba1, anti-GFAP, anti-APC Antikörper und DAPI immunhistochemisch gefärbt (je *n* = 6). Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 50 µm. Die Anzahl Iba1⁺, GFAP⁺ und APC⁺ Zellen wurden quantifiziert. Darstellung als mean ± SEM. Ns, nicht signifikant, Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

Für Gliazellen konnte hingegen kein signifikanter quantitativer Unterschied nachgewiesen werden, das heißt, die Zellzahl von Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten unterschieden sich nicht im Kortex von MyD88-defizienten und WT-Tieren (s. Abbildung 6, Iba1⁺ (mean ± SEM; WT *n* = 3 (6 ± 1,528), *Myd88*^{-/-} *n* = 5 (3,625 ± 0,375), *p* = 0,1395), APC⁺ (mean ± SEM, WT *n* = 4 (47,63 ± 4,14) *Myd88*^{-/-} *n* = 4 (40,13 ± 1,048), *p* = 0,1296)

und GFAP⁺ (mean ± SEM, WT n=4 (1,125 ± 0,4270), *Myd88*^{-/-} n = 4 (0,75 ± 0,3327), p = 0,5098).

Proliferierende Zellen wurden immunhistochemisch mit anti-ki67-Antikörper gefärbt. Auch hier zeigte sich bei der Quantifizierung ki67⁺ Zellen im Neokortex kein signifikanter Unterschied zwischen *Myd88*^{-/-} und WT (s. Abbildung 7, mean ± SEM, WT n = 3 (16 ± 4,444), *Myd88*^{-/-} n = 5 (18,8 ± 2,672), p = 0,5824).

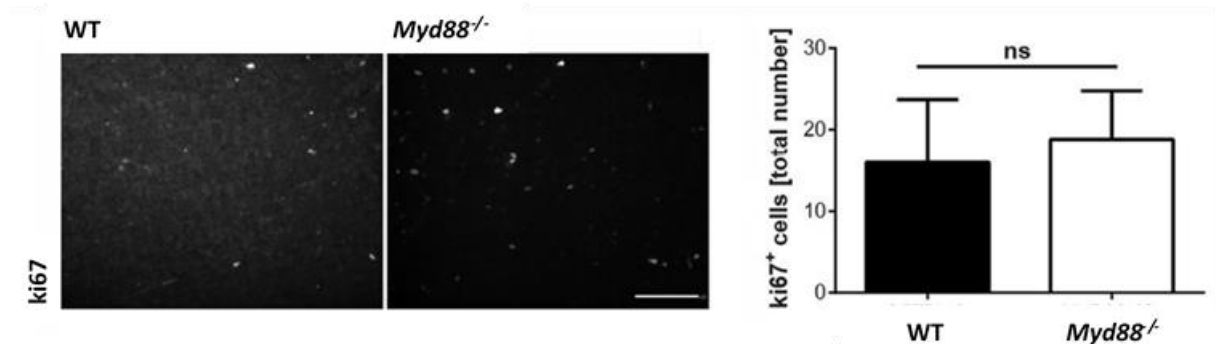


Abbildung 7: Quantifizierung proliferierender Zellen im neonatalen Kortex von *Myd88*^{-/-} Mäusen. Koronare Hirnschnitte neonataler (P4) WT und *Myd88*^{-/-} Mäuse wurden mit anti-ki67 Antikörper immunhistochemisch gefärbt (je n = 6). Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 50 µm. Die Anzahl ki67⁺ Zellen wurde quantifiziert. Darstellung als mean ± SEM. Ns, nicht signifikant, Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

Zusammenfassend wurde für neonatale *Myd88*^{-/-} Tiere eine signifikante Reduktion der Kortexhöhe bei gleichzeitiger quantitativer Erhöhung der Zahl kortikaler Neurone nachgewiesen. Mikroglia, Oligodendrozyten, Astrozyten und proliferierende Zellen waren hingegen hinsichtlich der Zahl unverändert in WT- und *Myd88*^{-/-} Tieren.

3.2. Kortikale und neuronale Veränderungen im adulten MyD88-defizienten Tier

Nachdem sich eine signifikante Zunahme der Neuronenanzahl im Neokortex neonataler MyD88-defizienter Mäuse fand, wurden im Weiteren die Hirne adulter MyD88-defizienter und WT Mäuse analysiert. Untersucht wurde, ob die oben genannten Unterschiede auch im adulten Tier bestehen. Zudem wurde in die quantitative Analyse ein weiteres Hirnareal – der Hippocampus – einbezogen, um regionenspezifische Aspekte zu berücksichtigen.

3.2.1. Erhöhte Anzahl kortikaler und hippocampaler Neurone im adulten MyD88-defizienten Tier

Anhand immunhistochemischer Färbungen von koronaren Hirnschnitten mit anti-NeuN Antikörper und mit DAPI wurden NeuN⁺, respektive DAPI⁺ Zellen quantifiziert. Analog zu den Ergebnissen der Altersstufe P4 fand sich eine signifikante Zunahme sowohl NeuN⁺ (mean ± SEM; WT $n = 10$ ($610,1 \pm 20,43$); *Myd88*^{-/-} $n = 8$ ($717,7 \pm 16,63$); $p = 0,0012$) als auch DAPI⁺ (mean ± SEM; WT ($1137 \pm 24,71$); *Myd88*^{-/-} ($1245 \pm 33,39$); $p = 0,0177$) Zellen im Neokortex adulter MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zum WT (s. Abbildung 8). Dementsprechend wiesen adulte MyD88-defiziente Tiere eine signifikant

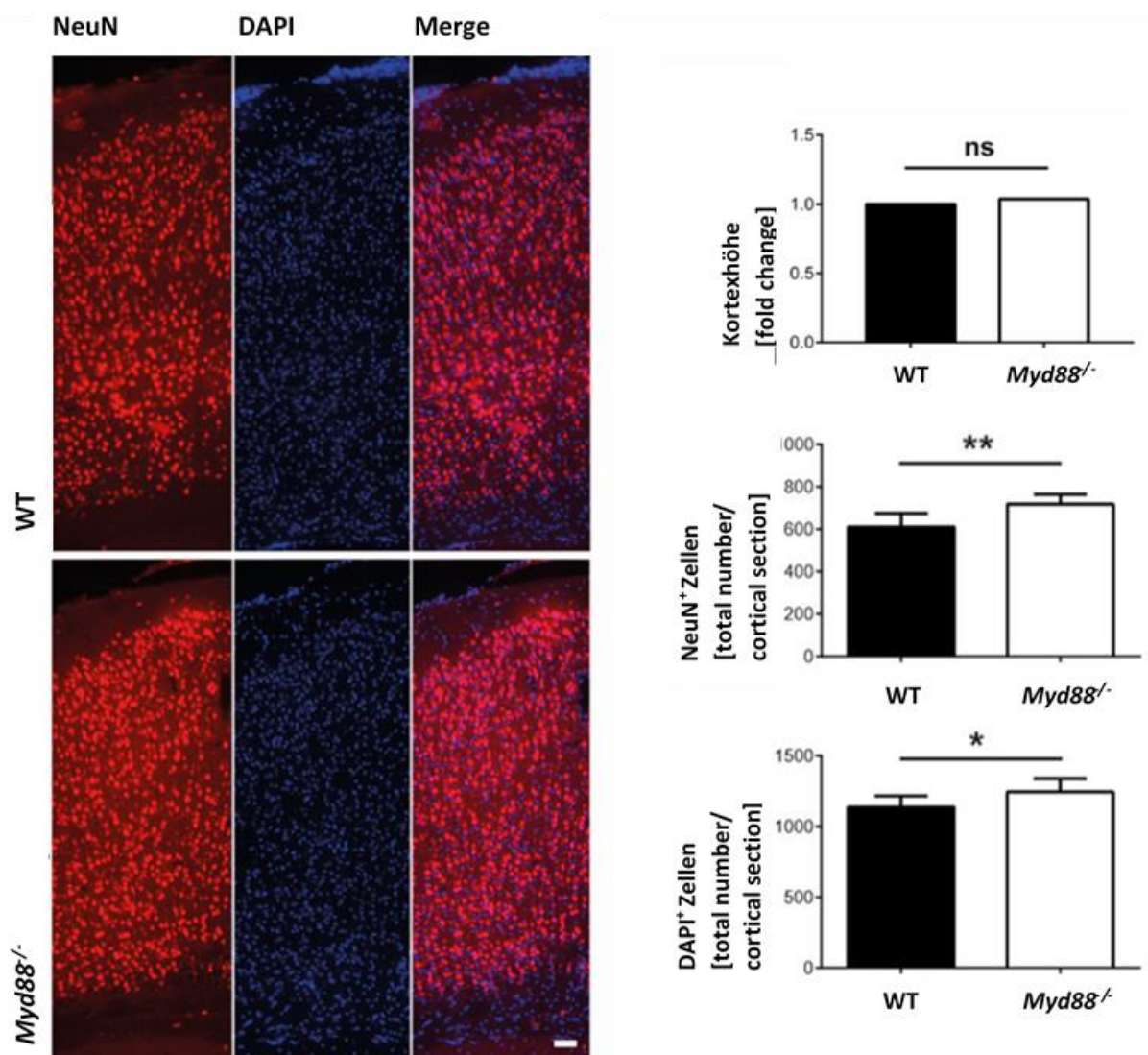


Abbildung 8: Quantifizierung von NeuN⁺ und DAPI⁺ Zellen im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse. Koronare Hirnschnitte 8-10 Wochen alter WT ($n = 10$) und MyD88-defizienter Mäuse ($n = 8$) wurden immunhistochemisch mit anti-NeuN Antikörper und DAPI gefärbt. Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 50 µm. Die Hirnschnitte wurde bezüglich Kortexhöhe analysiert und die Anzahl NeuN⁺ und DAPI⁺ quantifiziert. Darstellung als fold change bzw. mean ± SEM. ** $p = 0,0177$, * $p < 0,05$, ns, nicht signifikant, Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

erhöhte kortikale Gesamtzellpopulation sowie eine signifikant erhöhte Zahl kortikaler Neurone im Vergleich zum Wildtypen auf.

Da der Neokortex in spezifische Schichten gegliedert ist (Schichten I-VI), wurden zur Identifizierung der Subpopulation, die möglicherweise für die beobachtete Erhöhung kortikaler Neuronenanzahl ausschlaggebend ist, immunhistochemische Färbungen mit anti-Ctip2-Antikörper (tiefe Schichten V-VI) und anti-Cux1-Antikörper (obere Schichten II-IV) durchgeführt (Nieto et al., 2004). Die quantitative Analyse erfolgte anhand mikroskopischer Aufnahmen (BX51 Mikroskop, Magnafire Software, 20x) repräsentativer Felder mittels Adobe Photoshop C6. MyD88-defiziente Tiere und WT wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zahl Cux1⁺ (WT $132 \pm 27,04$, *Myd88*^{-/-} $127,1 \pm 28,96$, $p = 0,9037$) und Ctip2⁺ Zellen (WT $271,6 \pm 12,14$, *Myd88*^{-/-} $272,6 \pm 6,767$, $p = 0,9382$) auf. Ebenso wenig zeigte sich ein Unterschied in Bezug auf die Kortexhöhe adulter MyD88-defizienter Tiere im Vergleich zum WT (s. Abbildung 8, fold change 1,0385, $p = 0,5279$). Dies stand im Gegensatz zur signifikant reduzierten Kortexhöhe neonataler MyD88-defizienter Tiere (siehe Kap. 3.1).

Die bisherigen Analysen beschränkten sich auf den Neokortex. Sowohl im adulten als auch im neonatalen MyD88-defizienten Tier wurde eine signifikante Erhöhung der Zahl kortikaler Neurone nachgewiesen. Zusätzlich zum Kortex sollte ein weiteres Hirnareal hinsichtlich der Neuronenanzahl untersucht werden. Es wurde der Hippocampus ausgewählt, da dieser unter anderem eine Schlüsselrolle für das Gedächtnis spielt: Eine kognitive Leistung, die auch in Aspekten in den folgenden Verhaltenstests geprüft werden sollte.

Es zeigte sich, dass die signifikante Zunahme NeuN⁺ Zellen nicht nur auf den Kortex beschränkt, sondern auch im Hippocampus adulter MyD88-defizienter Mäuse nachweisbar war. Anhand immunhistochemisch mit anti-NeuN Antikörper gefärbter Gehirnschnitte wurden NeuN⁺ Zellen mittels mikroskopischer Aufnahmen repräsentativer Felder der CA1-Region des Hippocampus (Olympus BX51 Mikroskop, Magnafire Software, 100x) quantifiziert. Die Quantifizierung wies eine signifikante Zunahme NeuN⁺ (mean \pm SEM, WT $n = 7$ ($45,79 \pm 1,43$), *Myd88*^{-/-} $n = 7$ ($51,18 \pm 1,987$), $p = 0,0473$) und DAPI⁺ (mean \pm SEM, WT ($60,61 \pm 1,773$), *Myd88*^{-/-} ($67,68 \pm 2,614$), $p = 0,0449$) Zellen auf (s. Abbildung 9).

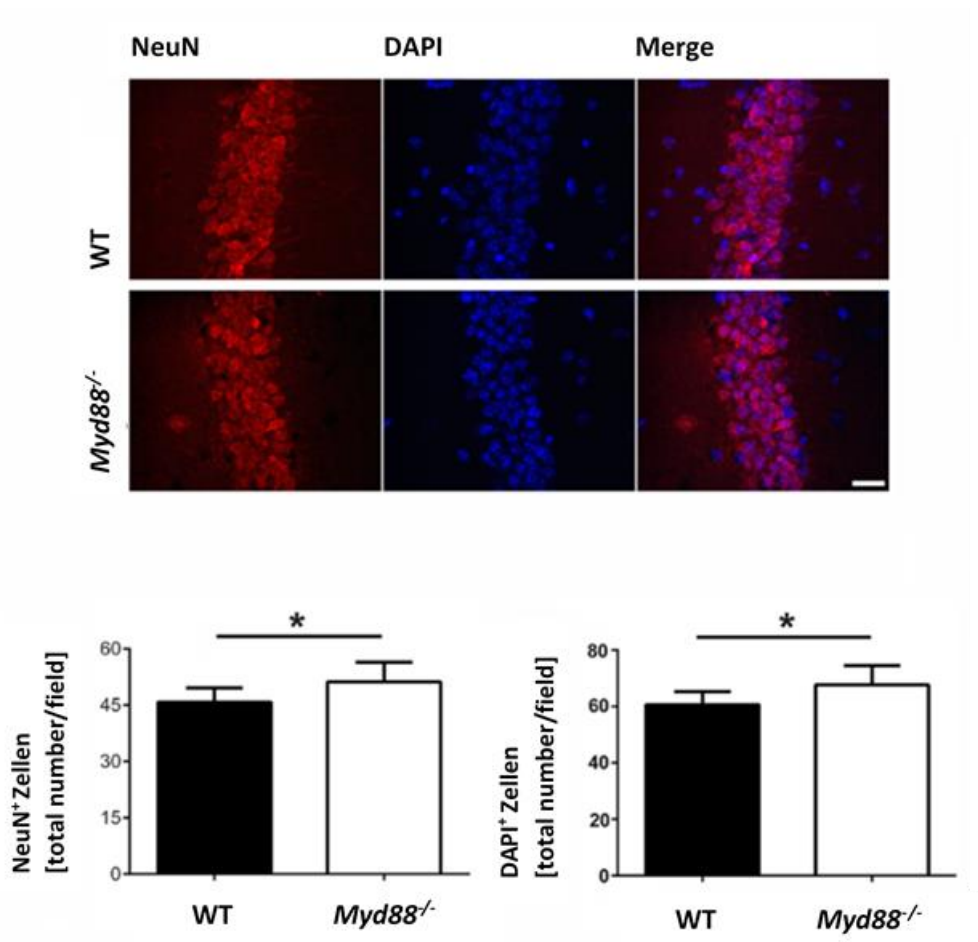


Abbildung 9: Quantifizierung von Neuronen im Hippocampus adulter MyD88-defizienter Mäuse. Koronare Hirnschnitte 8-10 Wochen alter WT und MyD88-defizienter Mäuse (je $n = 7$) wurden immunhistochemisch mit anti-NeuN Antikörper und DAPI gefärbt. Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 10 μm . Die Anzahl NeuN⁺ und DAPI⁺ Zellen im Hippocampus (CA1-Region) wurden quantifiziert. Darstellung als mean \pm SEM. * $p < 0,05$, Student's t -Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

Zusammenfassend konnte eine signifikante quantitative Zunahme kortikaler Neurone in adulten MyD88-defizienten Mäusen gezeigt werden. Eine signifikante Veränderung der Kortexhöhe konnte bei diesen Tieren im Alter von 8-10 Wochen nicht nachgewiesen werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die quantitative Erhöhung von Neuronen im adulten MyD88-defizienten Tier nicht auf einen funktionellen Hirnbereich beschränkt ist, sondern in mindestens einer weiteren Region – dem Hippocampus – nachweisbar ist.

3.2.2. Verstärkte NeuN-Expression im Kortex adulter MyD88-defizienter Tiere

Mittels Western Blot wurden im Folgenden Zellpopulationen von kortikalen Neuronen, Mikroglia und Astrozyten auf Proteinebene quantifiziert. Dazu wurden Lysate von

Kortizes adulter MyD88-defizienter und WT Tiere hergestellt. Nach Gelaufentrennung der Probe, Transfer mittels Semi-Dry-Blotting-Verfahren und Antikörperfärbung wurden die jeweiligen antikörperspezifischen Banden mittels ImageJ quantifiziert.

Die Western Blot-Analyse zeigte eine verstärkte NeuN-Expression im MyD88-defizienten Tier im Vergleich zum WT (s. Abbildung 10).

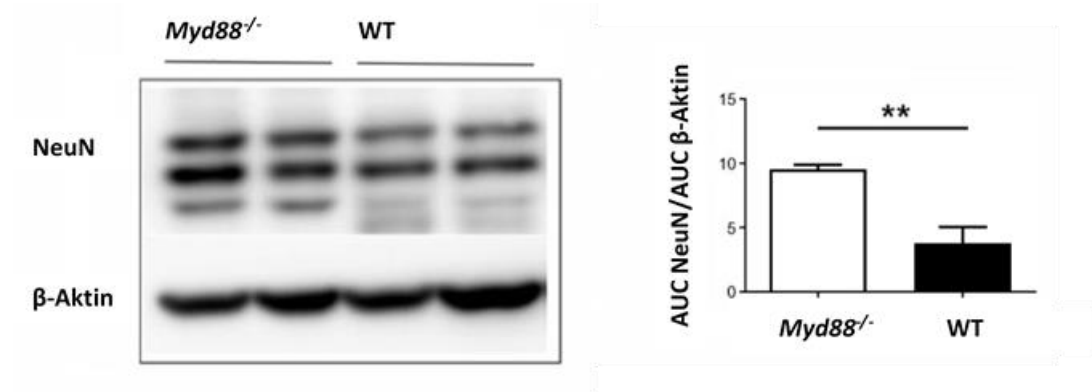


Abbildung 10: Expressionsanalyse von Neuronen im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse. 10 µg Kortexlysat von 8-10 Wochen alten WT und MyD88-defizienten Mäusen (je $n = 3$) wurden mittels anti-NeuN Antikörper im Western Blot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Erwartete Bandenhöhe NeuN 42/48 kDa. Darstellung eines repräsentativen Western Blots. Das Proteinsignal wurde quantifiziert als Area under the Curve (AUC). Darstellung als mean ± SEM. $**p < 0,01$, Student's t -Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

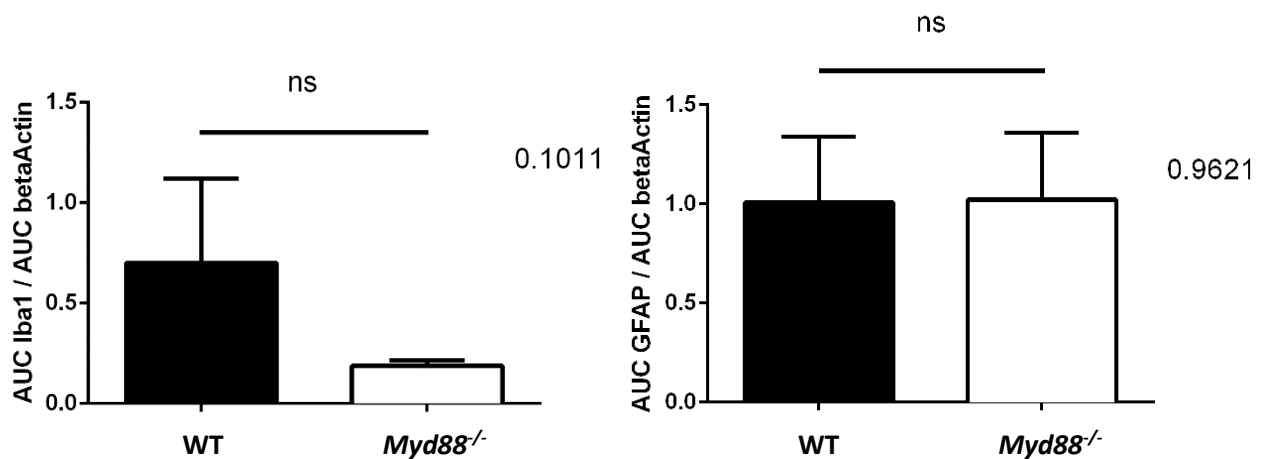


Abbildung 11: Expressionsanalyse von Mikroglia und Astrozyten im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse. 10 µg Kortexlysat von 8-10 Wochen alten WT und MyD88-defizienten Mäusen (je $n = 3$) wurden mittels anti-Iba1 und anti-GFAP Antikörper im Western Blot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Erwartete Bandenhöhe GFAP 51 kDa und Iba1 16 kDa. Darstellung eines repräsentativen Western Blots. Die Proteinsignale wurden quantifiziert als Area under the Curve (AUC). Darstellung als mean ± SEM. Ns, nicht signifikant, Student's t -Test.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bezüglich der Expression von Iba1 (Mikroglia) und GFAP (Astrozyten) kein signifikanter Unterschied zwischen den oben genannten Genotypen (s. Abbildung 11).

3.2.3. Reduzierte Arborisierung kortikaler Neurone in adulten MyD88-defizienten Mäusen

Mittels modifizierter Sholl-Analyse wurde die Arborisierung kortikaler Neurone in adulten MyD88-defizienten und WT Mäusen analysiert.

Basierend auf der Technik der Sholl-Analyse (Sholl, 1953) wurde die neuronale Arborisierung anhand der Quantifizierung dendritischer Kreuzungsstellen mit um das Soma eines Neurons gelegten konzentrischen Kreisen (analyisierte Neurone: WT $n = 57$

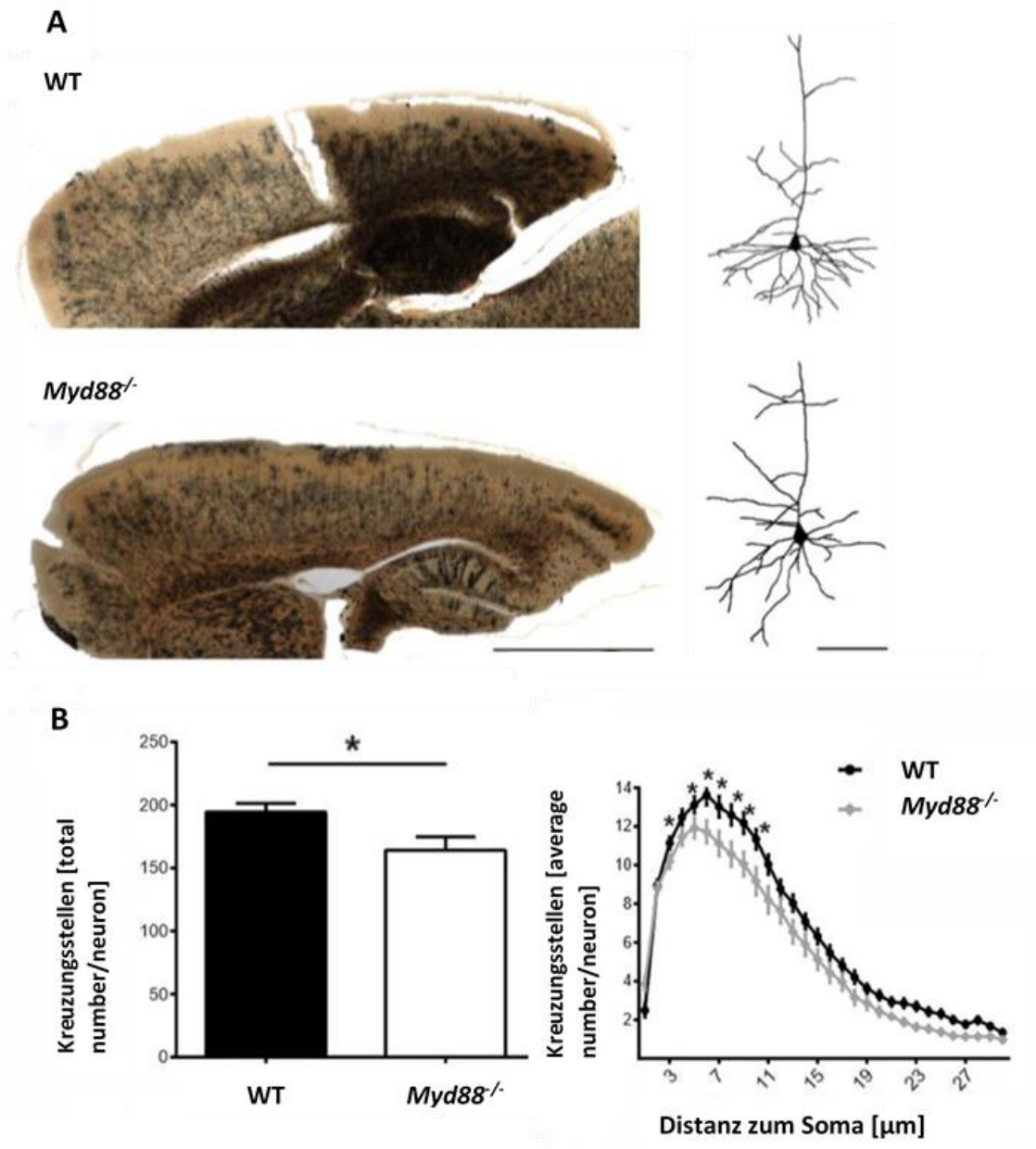


Abbildung 12: Arborisierung kortikaler Neurone in adulten MyD88-defizienten Mäusen. Färbung nach Golgi. (A) Sagittale Schnitte 8-10 Wochen alter WT und *Myd88*^{-/-} Mäuse (je $n = 6$) wurden mittels Golgi-Methode gefärbt. Darstellung repräsentativer Färbung (10x). Rekonstruktion eines repräsentatives kortikalen Neurons, Maßstab 10 µm. (B) Quantifizierung der absoluten und mittleren Anzahl von Kreuzungsstellen in Abhängigkeit zur Distanz vom Soma. Anzahl analysierte Neurone WT $n = 57$, *Myd88*^{-/-} $n = 43$. Darstellung als mean \pm SEM. * $p < 0,05$, Student's t -Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

aus 6 Tieren; *Myd88*^{-/-} *n* = 43 von 5 Tieren) untersucht (Image J, Concentric Circles Plug-In). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Anzahl von Kreuzungsstellen im Sinne einer reduzierten neuronalen Arborisierung in adulten MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtypen (WT 194,55 ± 6,794, *Myd88*^{-/-} 164,19 ± 10,64, *p* = 0,01378). Des Weiteren zeigte sich eine in Abhängigkeit von der Distanz zum Soma signifikante Reduktion der mittleren Anzahl von Kreuzungsstellen (s. Abbildung 12). Zusammenfassend wurde bei erhöhter Neuronenanzahl eine verringerte neuronale Arborisierung im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse nachgewiesen.

3.2.4. Erhöhte Mikrogliaanzahl und verstärkte Myelinisierung im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse

Die bisherigen Analysen im adulten Tier fokussierten sich auf die neuronale Zellpopulation. Um den Einfluss von MyD88-Defizienz auf die Anzahl von Gliazellen zu untersuchen, wurden analog zur oben genannten quantitativen Analyse von Neuronen

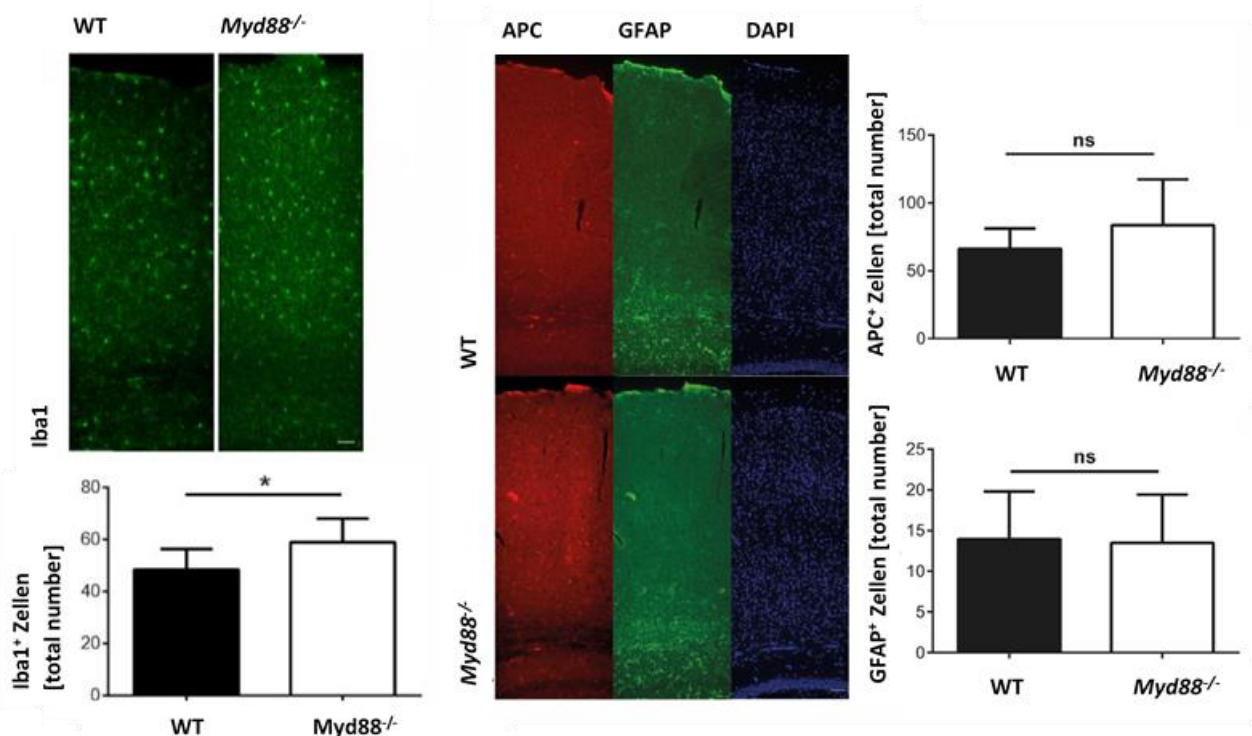


Abbildung 13: Quantifizierung kortikaler Mikroglia im Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse. Koronare Hirnschnitte 8-10 Wochen alter WT und MyD88-defizienter Mäuse wurden immunohistochemisch mit anti-Iba1 (WT *n* = 10, *Myd88*^{-/-} *n* = 8), anti-GFAP (WT *n* = 10, *Myd88*^{-/-} *n* = 6), anti-APC Antikörper (WT *n* = 10, *Myd88*^{-/-} *n* = 6) und DAPI gefärbt. Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 10 µm. Die Anzahl Iba1⁺, GFAP⁺ und APC⁺ Zellen im Neokortex wurde quantifiziert. Darstellung als mean ± SEM. **p* < 0,05, ns, nicht signifikant, Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

immunhistochemische Färbungen koronarer Gefrierschnitte mit anti-Iba1 (Mikroglia), anti-GFAP (Astrozyten) und anti-APC (Oligodendrozyten) Antikörpern durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme Iba1⁺ Zellen im Neokortex adulter MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtypen (mean ± SEM, WT $n = 10$ ($48,4 \pm 2,498$), *Myd88*^{-/-} $n = 8$ ($58,94 \pm 3,208$); $p = 0,018$) im Sinne einer signifikanten Zunahme von Mikroglia im Neokortex adulter MyD88-defizienter Tiere (s. Abbildung 13). Für Astrozyten und Oligodendrozyten fand sich hingegen kein signifikanter Unterschied. Nach immunhistochemischer Färbung mit anti-GFAP Antikörper (WT $n = 10$ *Myd88*^{-/-} $n = 6$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zahl von GFAP⁺ Zellen in MyD88-defizienten Tieren und Wildtypen (mean ± SEM, WT ($13,95 \pm 1,855$), *Myd88*^{-/-} ($13,5 \pm 2,419$), $p = 0,8844$) (s. Abbildung 13). Die immunhistochemische Färbung mit anti-APC Antikörper (WT $n = 10$ *Myd88*^{-/-} $n = 6$) und anschließende Quantifizierung der als Oligodendrozyten identifizierten Zellen im Kortex ergab ebenfalls keine signifikante Veränderung hinsichtlich der Gesamtzahl APC⁺ Zellen im Vergleich von MyD88-defizienten Tieren und Wildtypen (mean ± SEM, WT ($66 \pm 4,795$), *Myd88*^{-/-} ($83,5 \pm 13,8$), $p = 0,1738$) (s. Abbildung 13).

Darüber hinaus wurden mittels anti-MBP Antikörper Myelinscheiden im Kortex von MyD88-defizienten Mäusen und WT angefärbt. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der mittleren MBP⁺ Fläche pro Feld (mean ± SEM, WT $n = 3$ ($5,368 \pm 0,2414$), *Myd88*^{-/-} $n = 4$ ($13,76 \pm 2,028$), $p = 0,0176$) (s. Abbildung 14). Diese Daten weisen auf eine erhöhte neokortikale Myelinisierung im Kortex MyD88-defizienter Mäuse hin.

Zusammenfassend zeigte sich eine Zunahme von Neuronen und Mikroglia sowie eine verstärkte Myelinisierung im Neokortex adulter MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zum WT. Die Zahl der Astrozyten und Oligodendrozyten im adulten Neokortex unterschieden sich nicht in den genannten Genotypen. Eine Erhöhung der Neuronenzahl fand sich auch im Hippocampus adulter MyD88-defizienter Mäuse.

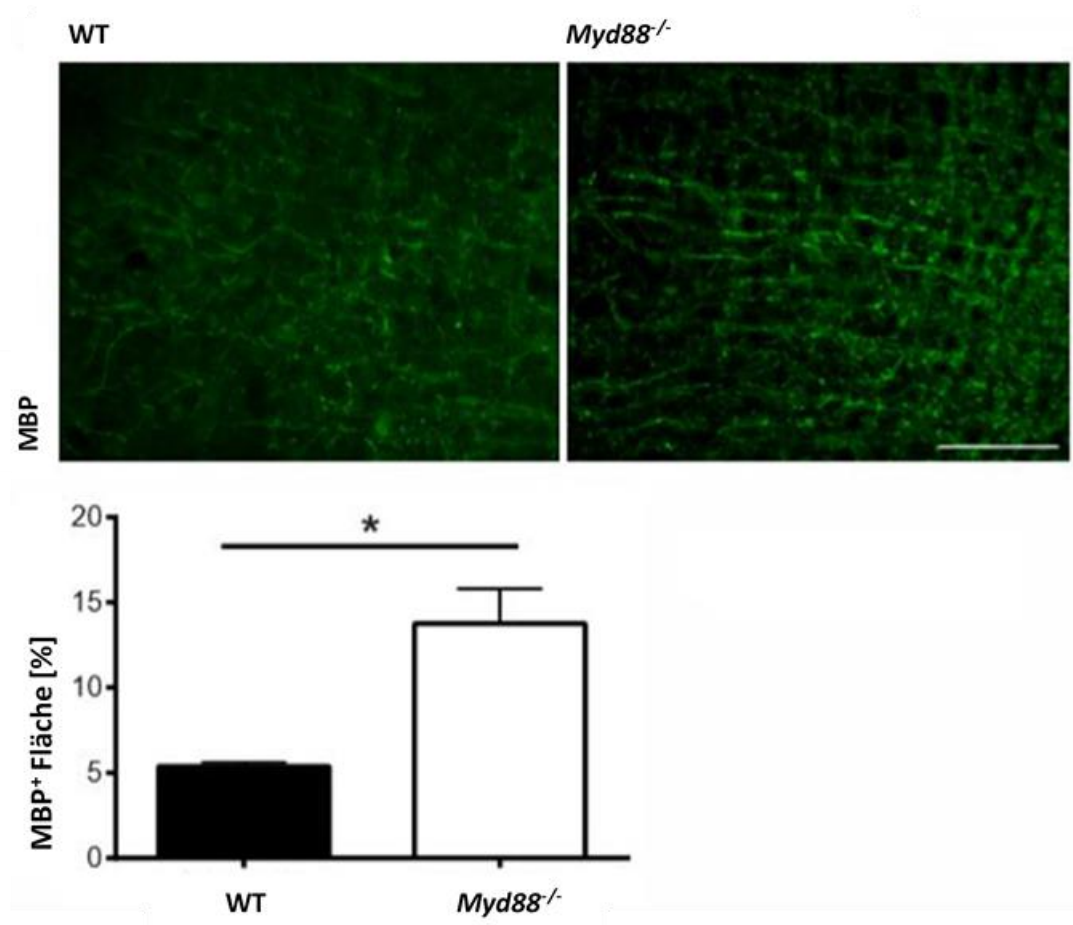


Abbildung 14: Analyse kortikaler Myelinisierung adulter MyD88-defizienter Mäuse. Koronare Hirnschnitte 8-10 Wochen alter WT und MyD88-defizienter Mäuse wurden immunhistochemisch mit anti-MBP Antikörper (WT $n = 3$, *Myd88*^{-/-} $n = 4$) gefärbt. Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 100 μm . Die MBP⁺ Fläche wurde quantifiziert. Darstellung als mean \pm SEM. * $p < 0,05$. Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

3.2.5. Erhöhte Anzahl proliferierender Zellen in der subventrikulären Zone adulter MyD88-defizienter Mäuse

Als Marker proliferierender Zellen wurde anti-ki67 Antikörper verwendet. Dieser färbt Zellen, die sich in aktiven Zellzyklusphasen, also allen Phasen außer G₀, befinden (Scholzen und Gerdes, 2000). Die absolute Zahl ki67⁺ Zellen der subventrikulären Zone (SVZ) sowie der subgranulären Zone des Hippocampus (SGZ) (WT $n = 5$, *Myd88*^{-/-} $n = 5$) wurde analysiert. Beide Areale gelten als sogenannten „Stammzellnischen“ im adulten Säugetierhirn (Conover und Shook, 2011). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung ki67⁺ Zellen in der subventrikulären Zone adulter MyD88-defizienter Tiere (mean \pm SEM, WT (50,8 \pm 2,354), *Myd88*^{-/-} (77,1 \pm 8,01), $p = 0,0136$). In der SGZ hingegen war die absolute

Anzahl der $ki67^+$ Zellen nicht signifikant verändert (mean \pm SEM, WT ($42,2 \pm 3,878$), $Myd88^{-/-}$ ($48,9 \pm 4,311$), $p = 0,2813$) (s. Abbildung 15).

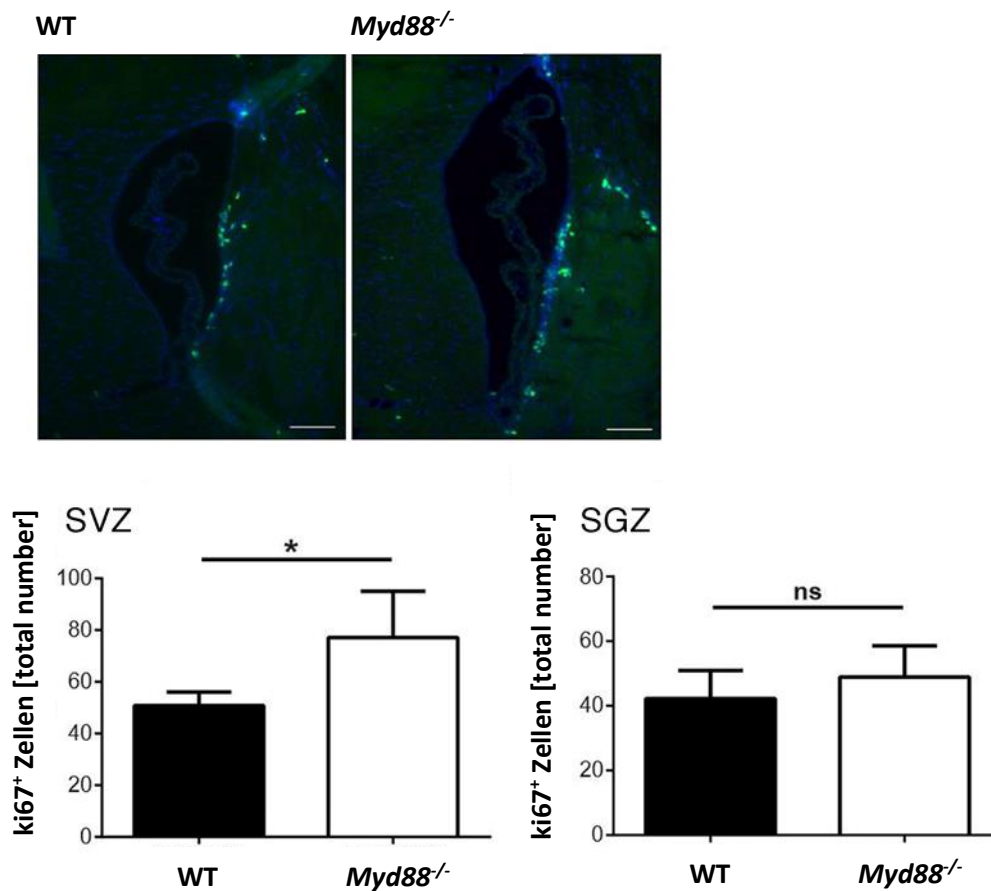


Abbildung 15: Quantifizierung proliferierender Zellen in SVZ und SGZ adulter MyD88-defizienter Mäuse. Koronare Hirnschnitte 8-10 Wochen alter WT und MyD88-defizienter Mäuse wurden immunhistochemisch mit anti-ki67 Antikörper (je $n = 5$) gefärbt. Repräsentative Darstellung der Färbung. Maßstab 50 μ m. Die Anzahl $ki67^+$ Zellen wurde quantifiziert. Darstellung als mean \pm SEM. * $p < 0,05$, ns, nicht signifikant, Student's t -Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

3.2.6. Volumen von Gesamthirn und Neokortex in adulten MyD88-defizienten und WT Tieren nicht signifikant verändert

Da sich in den bisherigen Versuchen eine signifikante Erhöhung der Anzahl von Neuronen, Mikroglia und proliferierenden Zellen im Kortex von adulten MyD88-defizienten Tieren zeigte, stellte sich die Frage, ob adulte MyD88-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypen Unterschiede bezüglich des Hirnvolumens aufweisen.

Prinzipiell zeigte sich makroskopisch kein Unterschied zwischen Körper- und Hirngröße. Um die Hirnvolumina zu bestimmen, erfolgte eine Nissl-Färbung an koronaren Hirnschnitten adulter MyD88-defizienter und WT Mäuse ($n = 6$ pro Gruppe). Nach

Flächenausmessung mittels Image J Software (Freehand Selection Tool, Orientierung anhand Franklin und Paxinos (Franklin und Paxinos, 2008)) wurde das Volumen von Kortex und Gesamthirn berechnet. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich Kortex- (mean \pm SEM. WT (53,06 \pm 2,352); *Myd88*^{-/-} (52,18 \pm 1,305), $p = 0.7503$) und Gesamtvolumen (WT (128,3 \pm 5,341); *Myd88*^{-/-} (123 \pm 2,082) $p = 0,3780$)) zwischen den beiden Genotypen (s. Abbildung 16).

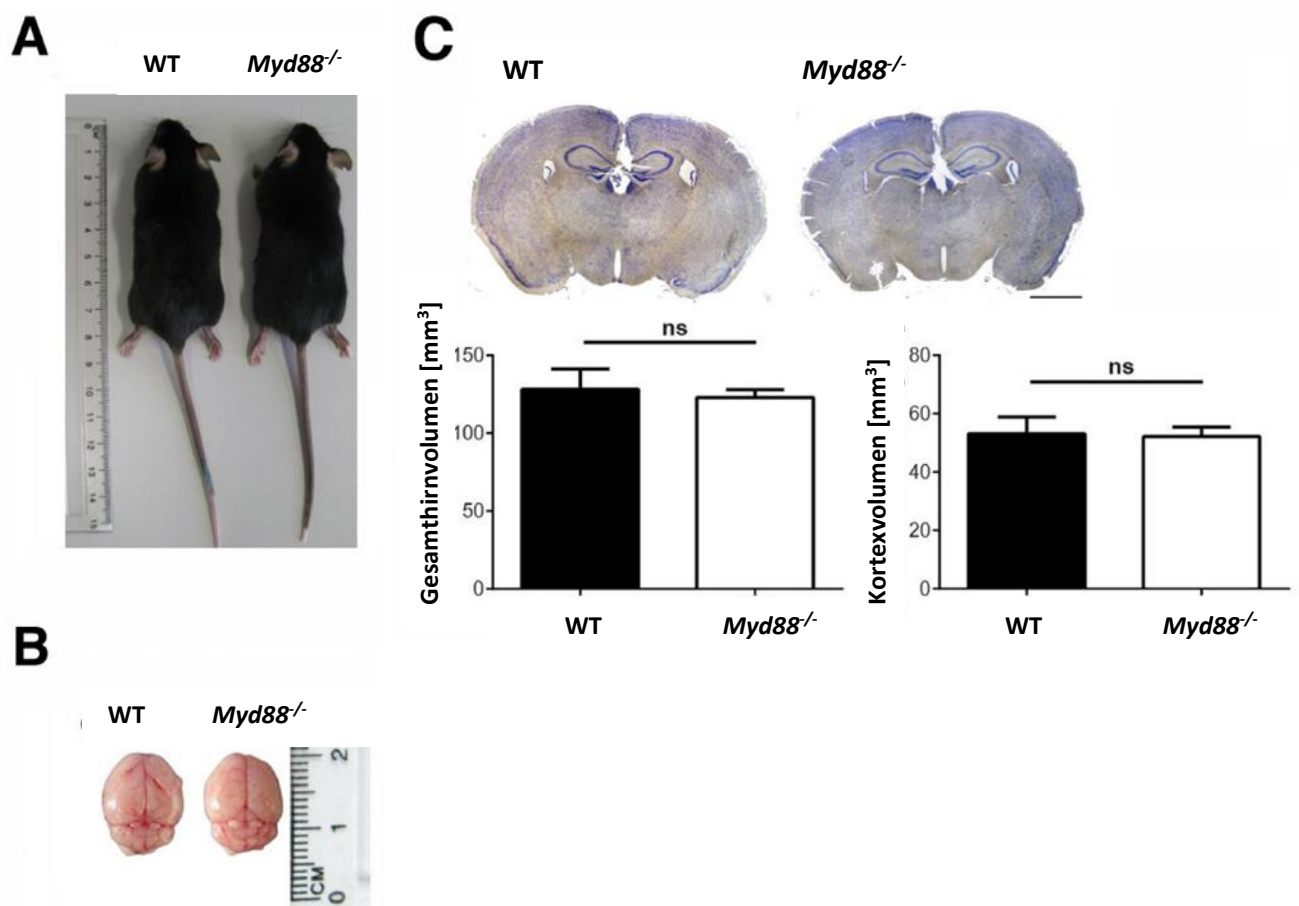


Abbildung 16: Volumetrie von murinem Kortex und Gesamthirn. (A) Makroskopische Aufnahme repräsentativer Mäuse. (B) Makroskopische Aufnahme von Gesamthirnen. (C) Repräsentative koronare Hirnschnitte, gefärbt nach Nissl. Maßstab 500 μ m. Die volumetrische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Volumens von Gesamthirn bzw. Kortex adulter MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zum WT. Darstellung als mean \pm SEM. Ns, nicht signifikant, Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

3.3. Verhaltenstests zeigen spezifischen MyD88-defizienten Phänotyp

Es stellt sich die Frage, ob Veränderungen der Gehirnstruktur MyD88-defizienter Mäuse mit spezifischen Verhaltensänderungen einhergehen. Zum Zeitpunkt der Arbeit liegen bereits einige ältere Studien zum Verhalten MyD88-defizienter Mäuse vor. Allerdings sind

deren Ergebnisse zum Teil widersprüchlich, zudem wurden andere Altersstufen als in der vorliegenden Arbeit untersucht: Lim et al. untersuchten Tiere im Alter von 10 Monaten, Drouin-Ouellet et al. hingegen Tiere im Alter von 2-4 Monaten (Drouin-Ouellet et al., 2012; Lim et al., 2011b). Daher wurden zur Untersuchung der Fragestellung MyD88-defiziente und WT Mäuse im Alter von 6-10 Wochen spezifischen Verhaltenstests unterzogen.

Zunächst erfolgte eine systematische generelle Einschätzung von MyD88-defizienten und WT Mäusen mittels Extended SHIRPA-Protokoll, modifiziert nach Riken und Irwin (Rogers et al., 1997). Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich physikalischer Charakteristika wie Körpermorphologie, Fellfarbe und -beschaffenheit in den untersuchten Genotypen. Auch bezüglich ihres physiologischen Verhaltens, das unter anderem Laufgeschwindigkeit, Gangbild und Körperhaltung beinhalten, und ihres Reflexverhaltens inkl. Kornealreflex, Akustische Reiz-Antwort und Verhalten auf schiefer Ebene ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Extended SHIRPA-Protokoll, modifiziert nach Riken und Irwin.

Test name	scores	Wildtype (control)	<i>Myd88^{-/-}</i>
Physical and abnormal behaviors			
Body position	8 completely flattened, 6 lying on side, 4 lying upright, 2 sitting up, 1 standing on HL (rearing), 0 repeated vertical leaping,	All 1	
Normal walking	2 inactive, 0 active, 1 excessive activity	All 0	
Limb morphology	0 normal, 1 polydactyly, 2 ectrodactyly, 3 abnormal in the upper limb, 4 dark footpad, pigmentation	All 0	
Tail morphology	0 normal, 1 kinked, 2 curly, 3 other abnormalities	All 0	
Head morphology	0 normal, 1 abnormal	All 0	
Whisker morphology	0 normal, 1 abnormal	All 0	
Coat color	Major/minor color; pattern with different color	Black	
Skin color of plantar surface	0 blanched, 1 pink, 4 bright, deep red flush, 2 mild pigmentation, 3 dark footpad, pigmentation	All 1	
Hair length	0 normal, 1 alopecia, 2 short, 3 long	All 0	
Hair morphology	0 normal, 1 curly, 2 other	All 0	
piloerection	0 none, 2 slight, 4 moderate, 6 marked, 8 extensive	All 0	
Ear morphology	0 normal, 1 abnormal	All 0	
Eye characteristics	0 normal, 1 abnormal	All 0	
lacrimation	0 absent, 1 present, C Chromodacryorrhea	All 0	
salivation	0 none, 1 wet zones	All 0	
Abnormal physical features	0 none, 1 present	All 0	
Abnormal and stereotyped behavior	0 none, 1 present	All 0	

convulsions	0 none, 1 present	All 0	
tremors	0 none, 1 present	All 0	
twitches	0 none, 1 present	All 0	
General activity and gait			
Locomotor activity	Numbers of squares entered in 30s	19,4	20,8
Transfer arousal	2 extended freeze (over 5 sec), 1 brief freeze followed by movement, 0 immediate movement	All 0	
Spatial locomotion	1 slow, 0 active, 1 rapid	All 0	
gait	0 normal, fluid movement, 1 fluid, but abnormal, 2 limited movement only, 3 incapacitated	All 0	
Pelvic elevation	2 markedly flattened, 3 barely touches, 1 3mm elevation, 0 6mm elevation, 1 12mm elevation, 4 crouched, 5 abnormal head position	All 0	
Tail elevation	2 flattened, dragging, 0 horizontally extended, 1 diagonally elevated (45°), 2 vertically upright (90°), 3 diagonally retrograde (135°)	All 0	
Sensory function and reflexes			
Object approach (cotton-tip swab)	0 sniffs at or approaches object, turns away, 1 attacks object, 2 no response	All 0	
Vibrissa placing response when touched	1 whisker movement stops, 0 head turning, 2 no response, 3 no or very short vibrissae only	All 0	
Back touch escape	3 no response, 1 mild, 0 moderate, 1 vigorous	Score 0 = 1; score 1 = 14	All 1
Acoustic startle response	2 none, 1 preyer reflex, 0 reaction in addition to Preyer reflex (e.g. startled response, jump)	Score 1 = 9; score 0 = 6	Score 1 = 11; Score 0 = 4
Cage movement	1 postural reflex (extend all legs), 0 walking backwards, 2 none	All 2	
Inclined plane (ability to maintain position on inclined plane (45°))	0 present, 1 absent	All 0	
Pinna reflex	2 none, 0 active retraction, 1 hyperactive, repetitive flicking	All 0	
Corneal reflex	3 none, 1 sluggish closure, 0 active single eye-blink, 1 double eye-blink, 2 triple eye-blink	Score 0 = 14; score 1 = 1	Score 0 = 14; score 1 = 1
Grip strength	3 none (no grip), 2 slight grip, semi-effective, 1 moderate grip, effective, 0 active grip, effective, 1 unusually effective	All 0	
Air righting reflex (2 back-flips)	0 no impairment, 1 sluggish when placed on back, 2 absent when on back	All 0	
Neurological and sensory function			
Positional passivity	0 struggles when held by tail/neck/back/hindlegs, 1 does not struggle	All 0	
Limb grasping	0 absent, 1 present	All 0	
Visual placing (vision and touch)	1 early vigor, extension incl. HL (25mm), 0 before vibrissae contact, active (18mm), 1 after slight vibrissae contact, active (12mm), 2 after marked vibrissae contact (6mm), 3 after nose contact, 4 none, even after nose contact	Score 1 = 4; score 0 = 11	Score 2 = 1; score 1 = 1; score 0 = 13
Wire maneuver (with a grid)	0 actively grasps with HL, 2 moderately effective grasps with HL, 4 unable to grasp with HL, slightly raises HL, 6 unable fit HL, falls 6-10 sec, 8 falls immediately	All 0	
Emotional reactivity			
Provoked freezing	0 none, 1 slight, 2 moderate, 3 marked, abrupt freeze	All 0	

Vocalization (provoked squeaking during handling)	number during handling	None = 11; once = 4	None = 9; once = 5; three times = 1
Urination and defecation	Number during handling	None = 6; once = 3; twice = 4; three times = 2	None = 2; once = 6; twice = 4; three times = 2; four times = 1
General health			
Body length	(l; mm)	88,67	85,33
Tail length	(t; mm)	76,67	71,33
Body weight	(w; g)	19,4	20,8
Acute death	0 absent, 1 present, C convulsions	All 0	

Diese generelle Einschätzung des Verhaltens diente als Basis für die nachfolgend gewählten Verhaltenstests, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Beispielsweise hätte eine signifikant unterschiedliche akustische Reiz-Antwort ein Hinweis auf eine zugrundeliegende Presbyakusis oder Taubheit sein können. Dies hätte ggf. zu Fehlinterpretationen im Rahmen des Barnes Maze führen können, da hier gemäß Testprotokoll ein akustischer Reiz als aversiver Stimulus eingesetzt wird.

3.3.1. Adulte MyD88-defiziente Mäuse lernen langsamer und zeigen eine vergleichbare räumliche Kurz- und Langzeitgedächtnisleistung

Mittels Barnes Maze wurden räumliches Lernverhalten und Gedächtnisleistung adulter MyD88-defizienter Mäuse im Vergleich zum WT untersucht. Dazu wurden die Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen (Trainingstag 1-4) in jeweils vier Durchgängen trainiert, in einem Testareal mit zwanzig Löchern ein bestimmtes Loch und die darunter befindliche Fluchtbox aufzusuchen. Kurz- und Langzeitkonsolidierung wurden an Tag 5 bzw. 12 getestet.

An Trainingstag 1 und 2 benötigen die MyD88-defizienten Tiere im Vergleich zum Wildtypen signifikant mehr Zeit, um die Fluchtbox aufzusuchen (mittlere Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox \pm SEM; d1 WT ($45,71 \pm 5,052$), *Myd88*^{-/-} ($64,46 \pm 7,569$), $p = 0,0487$; d2 WT ($13,59 \pm 1,626$), *Myd88*^{-/-} ($24,44 \pm 4,573$), $p = 0,0335$). An den beiden folgenden Tagen (Trainingstag 3 und 4) waren die Tiere beider Gruppen hingegen vergleichbar schnell. Diese Daten sprechen für ein initial langsames Lernen der MyD88-defizienten Tiere, wobei im Laufe der Trainingsphase aber mit dem WT vergleichbare Lerneffekte erzielt wurden. Die mittlere Anzahl von Fehlern an Tag 1 bis 4, d.h. das

Aufsuchen von Löchern, die nicht dem Zielloch mit Fluchtbox entsprechen, und die mittlere zurückgelegte Distanz waren in beiden Genotypen ähnlich (s. Abbildung 17). Beide Parameter (Anzahl der Fehler und Zeit bis zum Aufsuchen der Fluchtbox) nahmen in beiden Gruppen im Laufe der Trainingstage im Sinne eines Trainingseffektes ab (s. Abbildung 17).

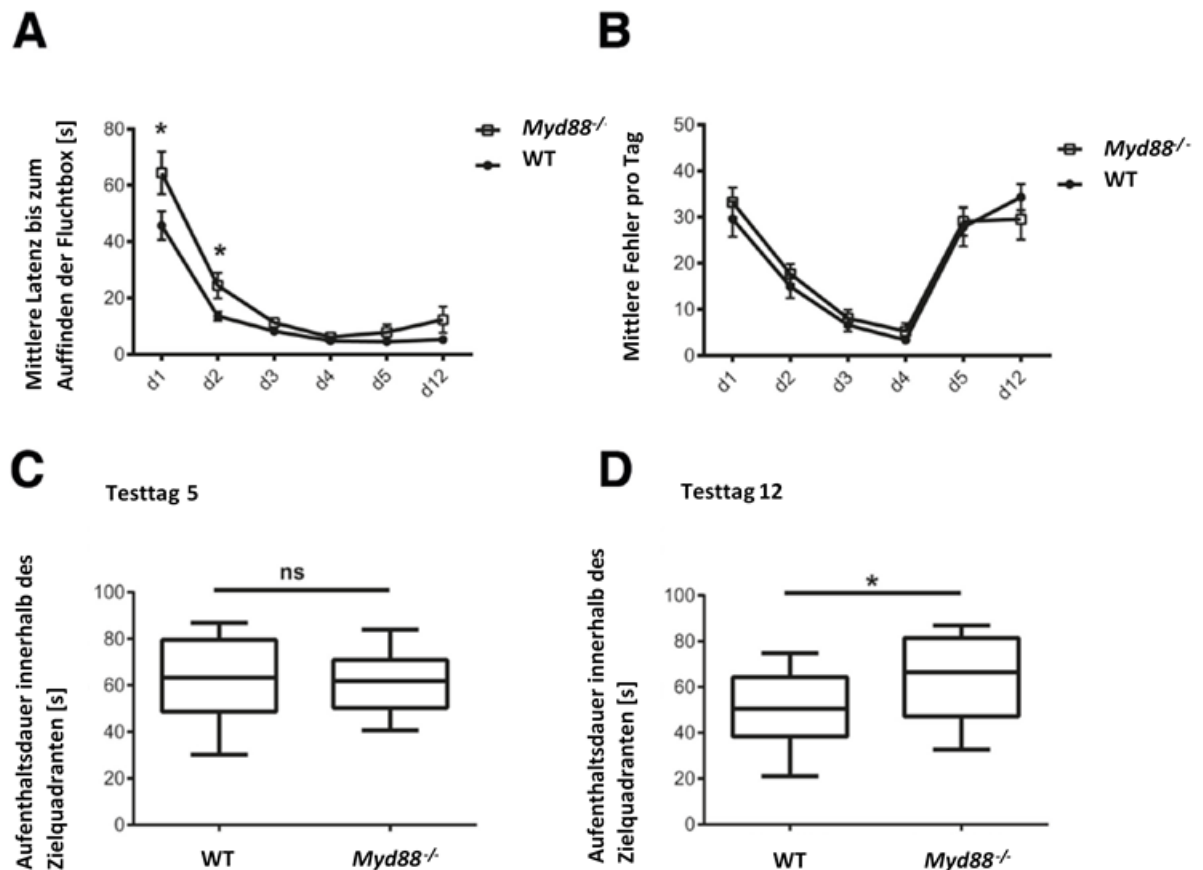


Abbildung 17: Lern- und Gedächtnisleistung MyD88-defizienter Mäuse. 8-10 Wochen alte WT und *Myd88^{-/-}* Mäuse (je $n = 15$) wurden mittels Barnes Maze getestet: 4 Durchgänge an Trainingstagen 1-4 und je ein Durchgang an den Testtage 5 und 12. **(A)** Quantifizierung der mittleren Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox. **(B)** Mittlerer Fehler pro Tag. Aufenthaltsdauer innerhalb des Zielquadranten an Testtag 5 **(C)** bzw. 12 **(D)**. Darstellung als mean \pm SEM. * $p < 0,05$, ns, nicht signifikant, Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

Am Testtag 5 (Kurzzeitgedächtnis) zeigte sich eine vergleichbare Latenzzeit für beide Gruppen bis zum Auffinden des Zielloches (s. Abbildung 17C). Zudem verbrachten MyD88-defiziente und WT Mäuse eine vergleichbare Zeitspanne im Zielquadranten, machten eine vergleichbare Anzahl von Fehlern (s. Abbildung 17B) und legten dabei eine ähnliche Strecke zurück. Insgesamt zeigte sich damit eine dem Niveau des WT entsprechende räumliche Kurzzeitgedächtnisleistung für adulte MyD88-defiziente Tiere.

Am Testtag 12 (Langzeitgedächtnis) verbrachten die MyD88-defizienten Tiere signifikant mehr Zeit innerhalb des Zielquadranten (mean \pm SEM; WT 48,87 s \pm 4,059, *Myd88*^{-/-} 64,78 s \pm 4,651; $p = 0,0255$), wiesen dabei eine vergleichbare Latenz bis zum Aufsuchen des Zielloches und eine ähnliche Anzahl von Fehlern auf. Des Weiteren legten sie eine vergleichbare Strecke zurück, um das Zielloch aufzusuchen.

Insgesamt fand sich bei MyD88-defizienten Tieren also eine mit dem Niveau der WT-Kohorte vergleichbare räumliche Langzeitgedächtnisleistung. Zum einen könnte das Verweilen der MyD88-defizienten Mäuse im Zielquadranten (trotz fehlender Fluchtbox) als gute Langzeitgedächtnisleistung gewertet werden. Zum anderen könnten die Daten aber auch auf eine reduzierte kognitive Flexibilität im Vergleich zum Wildtypen hinweisen, da sich WT Mäuse signifikant häufiger im Quadrant rechts vom Zielquadranten aufhielten und dort nach der Fluchtbox suchten, nachdem diese innerhalb des Zielquadranten nicht aufgefunden werden konnte.

3.3.2. Adulte MyD88-defiziente Mäuse weisen ein reduziertes exploratives Verhalten und erhöhte Ängstlichkeitslevel auf

Mittels Open Field Test wurde das spontane explorative Verhalten von MyD88-defizienten und WT Mäusen in einer neuen und exponierten Umgebung untersucht, um Rückschlüsse auf das jeweilige Angstlevel ziehen zu können (Prut und Belzung, 2003). Hierzu wurde den einzelnen Tieren ermöglicht, eine quadratische, hell erleuchtete PVC-Box für 10 min frei zu erkunden.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der zurückgelegten Strecke innerhalb des Testzeitraumes für MyD88-defiziente Tiere im Vergleich zum WT sowohl in der Peripherie (mean \pm SEM; WT 5408 \pm 168,2, *Myd88*^{-/-} 4456 \pm 291,8, $p = 0,0086$) als auch im Zentrum (mean \pm SEM; WT 28,13 \pm 1,437, *Myd88*^{-/-} 20,93 \pm 1,722, $p = 0,0033$) des Testareals im Sinne einer Hypolokomotion. Diese reduzierte Lokomotion kann auf ein erhöhtes Angstlevel bei MyD88-defizienten Mäusen hinweisen. Darüber hinaus zeigten sich bei MyD88-defizienten Tieren im Vergleich zum WT eine signifikant reduzierte Laufgeschwindigkeit (mean \pm SEM; WT 9,02 \pm 0,2835, *Myd88*^{-/-} 7,42 \pm 0,4865, $p = 0,0083$) und weniger Eintritte in die zentrale Zone (mean \pm SEM; WT 28,13 \pm 1,437, *Myd88*^{-/-} 20,93 \pm 1,722, $p = 0,0033$) (s. Abbildung 18). Diese Ergebnisse weisen ebenfalls auf erhöhte Angstlevel beim MyD88-defizienten Tier in einer neuen Umgebung im

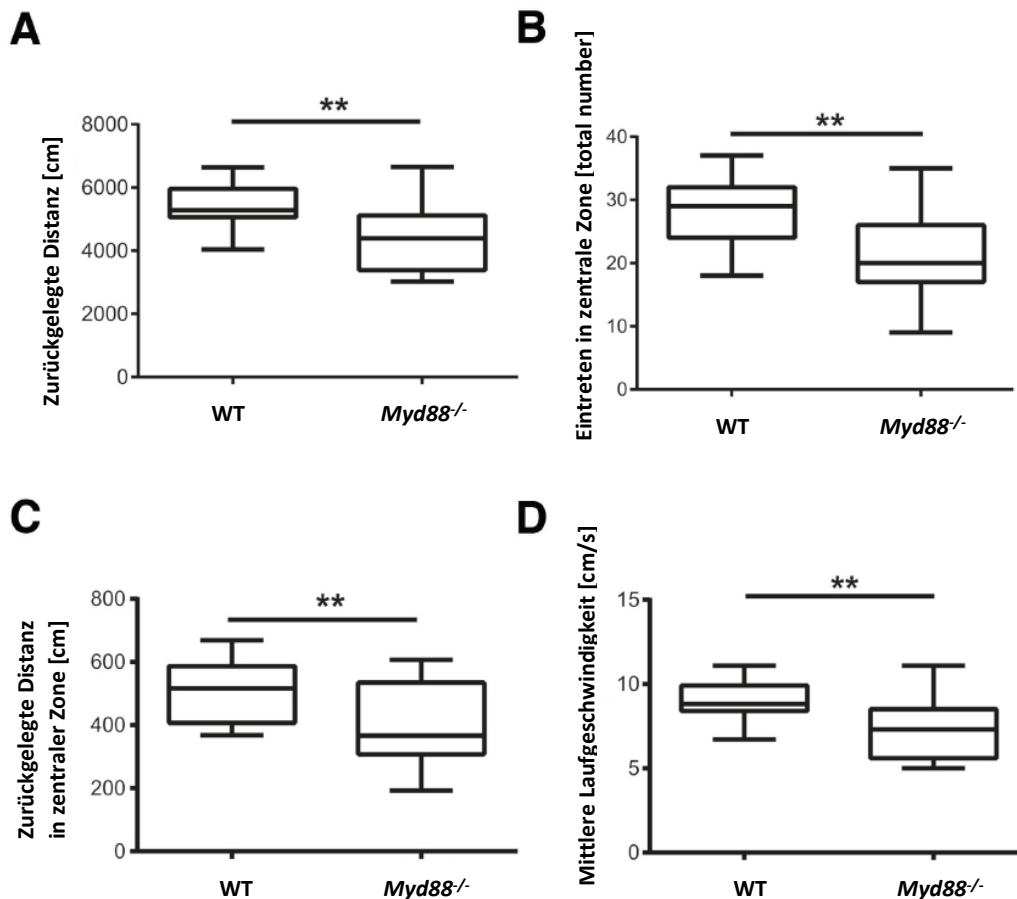


Abbildung 18: Exploratives Verhalten und Angstlevel MyD88-defizienter Mäuse. 8-10 Wochen alte WT und *Myd88*^{-/-} Mäuse (je *n* = 15) wurden mittels Open Field Test getestet, dabei durfte das Testtier für 10 min eine neue Umgebung frei erkunden. (A) Zurückgelegte Strecke innerhalb der 10 min, (B) Anzahl der Aufenthalte innerhalb der zentralen Zone, (C) Zurückgelegte Strecke innerhalb der zentralen Zone, (D) durchschnittliche Laufgeschwindigkeit. Darstellung als mean ± SEM. ***p* < 0,01, Student's *t*-Test. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

Vergleich zum WT hin. MyD88-defiziente Tiere zeigten zudem eine signifikant erhöhte Anzahl von "head-stretches" in der Peripherie (mean ± SEM; WT 660,9 ± 20,87, *Myd88*^{-/-} 784,1 ± 34,56, *p* = 0,0049). Dieses Verhalten kann auf eine vermehrte Risikoabschätzung des MyD88-defizienten Tieres hindeuten.

Insgesamt zeigten MyD88-defiziente Mäuse unter Testbedingungen einer neuen und exponierten Umgebung Hypolokomotion, häufigere Abschätzung von Risiko und Vermeidung der zentralen (besonders exponierten) Zone, was als erhöhte Angstlevel interpretiert werden kann.

3.3.3. MyD88-defiziente Mäuse zeigen vergleichbare Spontanaktivität und Sozialverhalten

Die bisherigen Verhaltenstests erforderten jeweils eine unmittelbare Interaktion des Experimentators mit dem Testtier und wurden innerhalb eines speziellen Versuchsaufbaus

durchgeführt. Um das Spontanverhalten der Tiere zu untersuchen, wurden Home Cage Scan und Social Activity Monitoring durchgeführt.

In ungestörter Umgebung präsentieren *MyD88*-defiziente und WT Mäuse sowohl in Einzelhaltung (Home Cage Scan, HCS) als auch in Gruppenhaltung (Social Activity Monitoring, SAM, Gruppen von 4-5 Tieren gemischten Genotyps) ähnliche Verhaltensweisen. Für beiden Genotypen fand sich ein spezie-typischer Wechsel des Aktivitätslevels zwischen Tag-/Nachtphasen: Höhere Aktivitätslevel während der dunklen und reduzierte Aktivitätslevel während der Lichtphase (12h/12h-Rhythmus) (GLMM (Generalized Linear Mixed Model with Markov Chain Monte Carlo Method), post. mean = -3,462, 1-95% CI = -3,856, u-95% CI = -3,059, eff. samp:1033, pMCMC < 0,001). Dies zeigte sich im Rahmen des SAM sowohl im Mittel über Hell- bzw. Dunkel-Phase als auch für aufeinanderfolgende Tage und vergleichbare Stunden im Tagesverlauf (s. Abbildung 19).

Diese mittels SAM untersuchten Verhaltensweisen zeigten sich auch im Rahmen des HCS, bei denen das präsentierte Verhalten in Einzelhaltung untersucht wurde (23h, davon 12h dunkel/11h hell). *MyD88*-defiziente Mäuse in Einzelhaltung legten sowohl über den

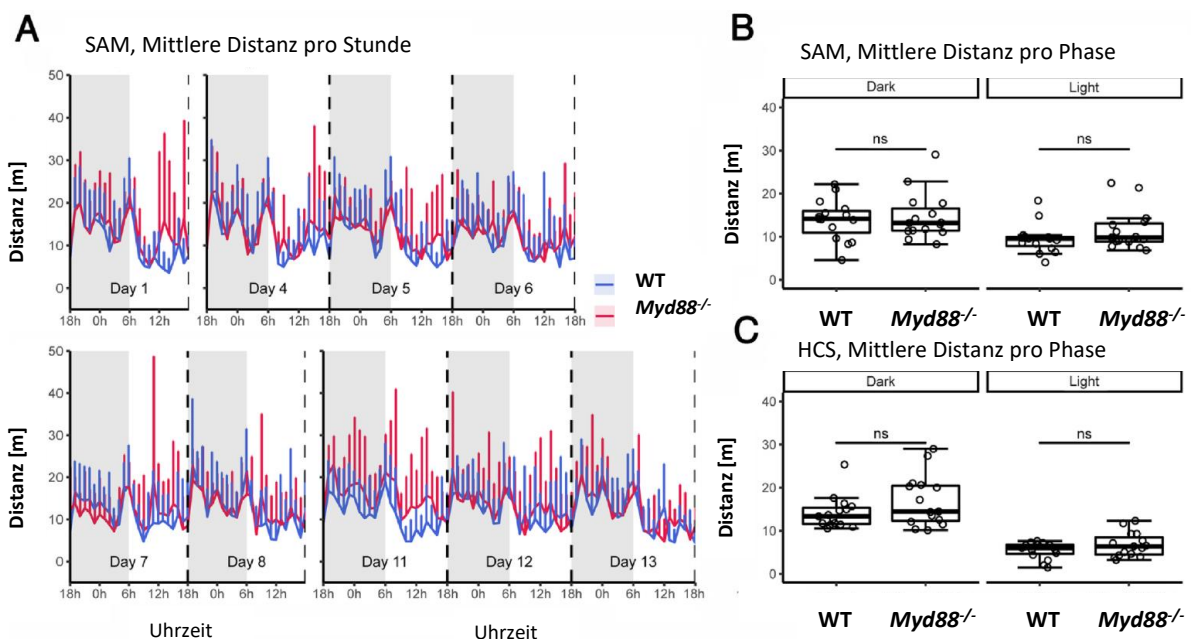


Abbildung 19: Spontanaktivität *MyD88*-defizienter Mäuse. Die spontane Aktivität 8-10 Wochen alter WT (blau) und *Myd88*^{-/-} (rot) Mäuse während Gruppenhaltung wurde mittels SAM analysiert (je *n* = 15). **(A)** SAM, mittlere zurückgelegte Distanz pro Stunde. 12h/12h-Hell-Dunkel-Phase. Ein Einstreuwechsel erfolgt an Tag 3 und 10 für Kohorte 1 und an Tag 2 und 9 für Kohorte 2, diese Tage wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Mittels GLMM wurde der Einfluss des Genotyps auf die Aktivität analysiert. **(B)** SAM, mittlere zurückgelegte Distanz pro Phase. Vergleich von Genotypen pro Phase mittels Wilcoxon rank-sum Test, ns, nicht signifikant. **(C)** HCS, Spontanaktivität in Einzelkäfighaltung für 23 h (11/12h-Hell-Dunkel-Phase), mittlere zurückgelegte Distanz pro Phase, ns, nicht signifikant. Wilcoxon rank-sum Test. Darstellung als ± SD, als Boxplots mit Median, Quartile und Perzentilen oder als Punkt für individuelle Ergebnisse. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

gesamten Zeitraum von 23 h als auch innerhalb der ersten 6 h keine signifikant kürzere Distanz im Vergleich zum WT zurück (s. Abbildung 20). Diese Daten deuten darauf hin, dass die im Open Field Test nachgewiesene Hypolokomotion auf den Effekt der neuen Umgebung zurückgeführt werden kann.

HCS, Aktivität (gesamt und pro Stunde)

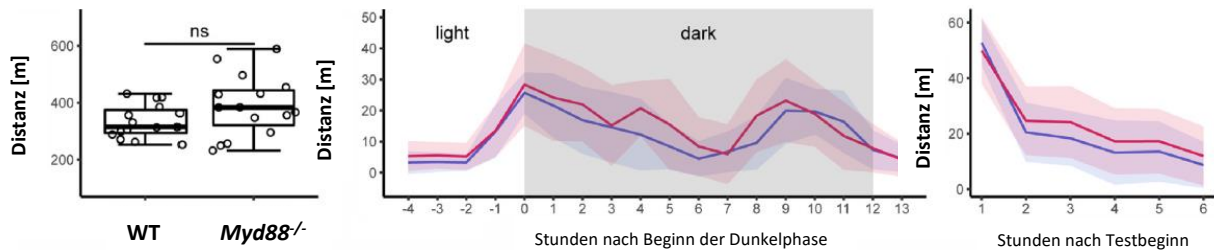


Abbildung 20: Aktivität von MyD88-defizienten Mäusen in natürlicher Umgebung. Darstellung der zurückgelegten Strecke pro Genotyp. (links) Absolut zurückgelegte Strecke in 23 h, ns, nicht signifikant, Wilcoxon rank-sum Test. (Mitte) Mittlere zurückgelegte Strecke pro Stunde je Genotyp (WT blau, *Myd88*^{-/-} rot) mit Fokus auf Start der Dunkelphase (0), ns, nicht signifikant, GLMM. (rechts) Mittlere zurückgelegte Strecke pro Stunde und Genotyp (WT blau, *Myd88*^{-/-} rot) mit Fokus auf Testbeginn (1), ns, nicht signifikant, GLMM. Darstellung als \pm SD, als Boxplots mit Median, Quartile und Perzentile oder als Punkt für individuelle Ergebnisse. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

Insgesamt wurden im Rahmen des HCS 13 Verhaltensweisen automatisiert ausgewertet. Lediglich bezüglich der Dauer der Verhaltensweisen “walking” und “hanging” fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen *MyD88*-defizienten und WT Tieren (Hanging: GLMM, pMCMC = 0,006, post. mean = 3,911 [l-95% CI = 1,554, u-95% CI = 6,247]; Walking: GLMM, pMCMC = 0,006, post. mean = 22,237 [l-95% CI = 7,623, u-95% CI = 38,525]) (s. Abbildung 21).

HCS, Verhaltensweise (mittlere Dauer pro Stunde)

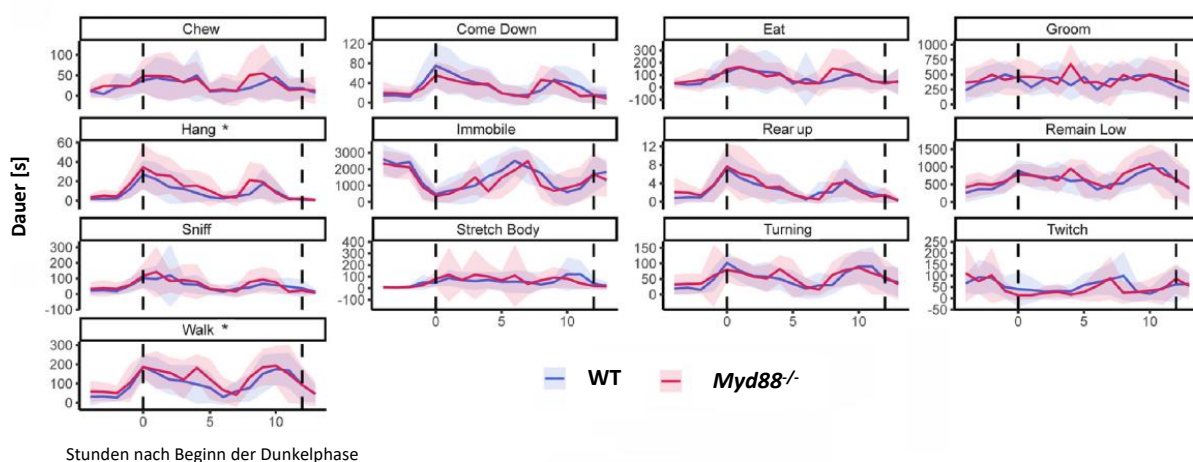


Abbildung 21: Analyse spezifischer Verhaltensweisen *MyD88*-defizienter Mäuse in natürlicher Umgebung. Mittlere Dauer einer spezifischen Verhaltensweise pro Stunde und Genotyp (WT blau, *Myd88*^{-/-} rot). Die Dunkelphase wird durch die gestrichelten vertikalen Linien abgegrenzt. GLMM. *pGLMM = 0,006. Modifiziert nach Schroeder et al., 2020.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression des TLR-Adapterproteins MyD88 einen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung und Struktur von murinem Neokortex und Hippocampus hat. Zudem beeinflusst eine fehlende MyD88-Expression verschiedene Verhaltensweisen in Mäusen.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse vor dem Hintergrund der relevanten Literatur diskutiert.

4.1. Diskussion der Hauptergebnisse im Kontext der Literatur

Die vorliegenden Daten zeigen, dass sowohl neonatale als auch adulte MyD88-defiziente Mäuse im Vergleich zum WT eine erhöhte Anzahl kortikaler Neurone aufweisen. Des Weiteren fand sich eine signifikante Zunahme von Mikroglia und eine verstärkte Myelinisierung im adulten, nicht aber im neonatalen MyD88-defizienten Kortex. Diese Resultate lassen vermuten, dass die Expression von bzw. die Abwesenheit des Adapterproteins MyD88 eine funktionale Rolle bei der Entwicklung des murinen Kortex spielt. Unklar bleibt, ob MyD88 dabei über die bekannte konventionelle TLR-Signalkaskade als intrazellulärer Toll/TLR-Adapter agiert oder als eigenständiger Faktor, bzw. über bisher nicht identifizierte Signalwege operiert. Die Dynamik der MyD88-Expression bzw. deren Verlauf bei der Hirnentwicklung ist unklar. Sowohl eine abnehmende MyD88-Expression (Okun et al., 2010b) als auch eine relativ konstante MyD88-Expression über die Zeit der murinen Hirnentwicklung (Kaul et al., 2012) wurden beschrieben. Für einzelne TLRs wie TLR7 und TLR9 fanden sich zeitspezifische Expressionsmuster im murinen Großhirn mit einem postnatalen Maximum (TLR7) und einem Expressionsmaximum im adulten Tier (TLR9) (Kaul et al., 2012). MyD88 ist seit langem als Schlüsselmolekül bei Entwicklungsprozessen bekannt. Dies gilt allerdings vor allem für die sich entwickelnde *Drosophila melanogaster* und weniger für Vertebraten. So beschrieb Christiane Nüsslein-Volhard bereits in den 1980ern die Rolle von *Toll* und dessen Adapterprotein dMyD88 bei der Entwicklung der Drosophilalarve und erhielt später für ihre Forschungsarbeiten inklusive Entwicklung der Gradiententheorie den Nobelpreis für Medizin. Hiernach rekrutiert *Toll* nach Aktivierung durch den Liganden Spätzle, der im Rahmen der Fertilisation freigesetzt wird, einen Adapterkomplex aus dMyD88 und Tube. Dies wiederum führt zur Rekrutierung der Kinase Pelle. Diese bindet an den

Adapterkomplex und wird aktiviert. Dadurch kann der I κ B-like Inhibitor Cactus abgebaut werden. An Cactus ist normalerweise Dorsal gebunden, wodurch die nukleare Translokation inhibiert wird. Wird Cactus degradiert, wird das Protein Dorsal aktiviert, wodurch ein nuklearer Gradient ausgebildet wird. Über NF- κ B-Transkriptionsfaktoren bildet sich eine dorsoventrale Achse der Taufliege aus (Sun et al., 2004; Belvin et al., 1996; Wasserman, 2000; Drier und Steward, 1997). Darüber hinaus spielt *Toll* in der Drosophila eine wichtige Rolle hinsichtlich der Funktion und Ausbildung von Motoneuronen und Muskelzellen (Halfon et al., 1995; Halfon und Keshishian, 1998).

Im Säugetier rekrutiert MyD88 die Tube- und Pelle-Orthologe IRAK4 und IRAK1. Dies führt am Ende der ablaufenden TLR-Signalkaskade zu einer Translokation von NF- κ B und darüber zu einer Expression spezifischer Gene (u.a. antimikrobielle Gene, Chemokine und Zytokine), die vor allem für immunologische und Entwicklungsprozesse relevant sind (Leulier und Lemaitre, 2008). Allerdings gibt es nicht *einen* Signalweg mit MyD88 als Adapterprotein, sondern zahlreiche Upstream- und Downstream-Varianten. Im Säugetier können nach TLR-Aktivierung sowohl MyD88-abhängige als auch -unabhängige Signalwege aktiviert werden. Zudem unterscheiden sich die Downstream-Signalwege im Vertebraten im Vergleich zur Drosophila zum Teil erheblich bezüglich einzelner Signalfaktoren. So ist beispielsweise die Expression von Weckle exklusiv in der Drosophila und die Expression der TIR Adapterproteine TRIF (TICAM1), TIRAP und TRAM (TICAM2) nur in Vertebraten beschrieben (Akira et al., 2004; Valanne et al., 2011). Ob und inwiefern die Expression beziehungsweise das Fehlen verschiedener Adapterproteine in Vertebraten einen Einfluss auf das sich entwickelnde Gehirn beziehungsweise seine Struktur hat und ob die Gegebenheiten in Drosophila und Säugetier ähnlich beziehungsweise übertragbar sind, bleibt ungeklärt. Der Toll/TLR-Signalweg könnte speziesspezifisch sein und darüber hinaus von weiteren Faktoren, zum Beispiel den zur Verfügung stehenden Adapterproteinen, spezifischen ZNS-Zelltypen und dem pathophysiologischen Kontext abhängen (Anthony et al., 2018).

4.1.1. MyD88- und TLR-Defizienz im Kontext muriner Hirnentwicklung

Der Nachweis einer signifikant erhöhten Neuronenanzahl sowohl im Neokortex als auch im Hippocampus adulter MyD88-defizienter Mäuse kann im Kontext früherer Studien zur Funktion von TLRs betrachtet werden. So wird Proliferation und Differenzierung von

Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) via Toll/TLR-Signalweg reguliert (Okun et al., 2010b; Lathia et al., 2008; Rolls et al., 2007; Shechter et al., 2008; Sloane et al., 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass TLR4- und TLR2-defiziente NPCs sich exklusiv in Neurone und nicht mehr in Astrozyten ausdifferenzieren. Ähnliche Beobachtungen wurden für MyD88-Defizienz allein beschrieben (Rolls et al., 2007).

Der Einfluss der TLRs- und MyD88-Expression auf Zellproliferation und -differenzierung kann sich im Falle einzelner TLRs und unterschiedlicher Zelltypen elementar unterscheiden. Beispielsweise supprimieren MyD88 und bestimmte TLRs NPC-Proliferation, während hingegen TLR4 für neuronales Überleben benötigt wird (Ma et al., 2006; Okun et al., 2010a; Zhu et al., 2016). Lathia et al. beschrieben eine Zunahme neuronaler Vorläuferzellen im Kortex postnataler TLR3-defizienter Mäuse und einen gegenteiligen Effekt nach Aktivierung von TLR3 mit einem spezifischen Liganden (PolyIC). Hier ist zu beachten, dass die TLR3-induzierte Signalkaskade MyD88-unabhängig ist (Lathia et al., 2008). Des Weiteren hat die Aktivierung von TLR2 durch einen bakteriellen Liganden einen inhibierenden Effekt auf NPC-Proliferation sowie eine ventrikuläre Dysplasie zur Folge. TLR2-defiziente murine Embryonen zeigten hingegen keinen Unterschied bezüglich Hirn- und Ventrikelmorphologie im Vergleich zum WT auf (Okun et al., 2010b).

Trotz dieser Studien bleiben genaue molekulare und zelluläre Mechanismen sowie die jeweilig beteiligten Liganden bei der Regulierung von ZNS-Zellanzahl und -morphologie im Rahmen der murinen Hirnentwicklung ungeklärt. Obwohl MyD88 eine kritische Rolle bei der physiologischen Hirnentwicklung und Ausbildung der Hirnstruktur spielen könnte, bleibt fraglich, ob bei diesen Prozessen der kanonische Toll/TLR Signalweg involviert ist. So wird beispielsweise die TLR8-induzierte Degeneration von Axonen im sich entwickelnden Gehirn NF- κ B-unabhängig vermittelt (Ma et al., 2006). Zudem scheint bei MyD88-defizienten Mäusen und damit einhergehendem Fehlen der jeweiligen downstream TLR-Signalwege die ZNS-Entwicklung nicht bemerkenswert beeinträchtigt zu sein, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde. Diese fehlende Beeinträchtigung wurde auch für TRIF-defiziente Mäuse gezeigt. TRIF ist ein zentrales Adapterprotein in der MyD88-unabhängigen Signalkaskade, welche beispielsweise nach Aktivierung von TLR3 und TLR4 induziert werden kann (Adachi et al., 1998; Yamamoto et al., 2003).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben keine Unterschiede bezüglich Hirnvolumen oder kortikaler Höhe in der adulten MyD88-defizienten Maus. Somit scheint eine Defizienz von TLR-Adapterproteinen wie MyD88 im Rahmen der ZNS-Entwicklung

kompensierbar zu sein. Des Weiteren könnten alternative – bisher nicht identifizierte – Adapterproteine und / oder Signalwege existieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt während der ZNS-Entwicklung ist die Konkurrenz zwischen einzelnen Zellen hinsichtlich Überleben und Proliferation. Physiologisch gehen im Rahmen der Entwicklung eine bestimmte Anzahl von Neuronen und Gliazellen unter. Dies wird über die Konkurrenz einzelner Zellen um Liganden vermittelt, welche essenziell für das Überleben sind (Anthony et al., 2018).

Es ist somit möglich, dass die beobachtete erhöhte Anzahl von Neuronen und Mikroglia im Neokortex MyD88-defizienter Mäuse zumindest teilweise durch eine verminderte Konkurrenz zustande kommt. In Säugetieren wurde bereits gezeigt, dass sowohl neuronale Eliminierung als auch Protektion durch sogenannte Neurotrophine (NTs) entscheidende Faktoren darstellen. Diese NTs unterstützen je nach Rezeptortyp neuronalen Zelltod oder neuronales Überleben, wobei im Säugetier bisher vier solcher unterschiedlicher Neurotrophine beschrieben sind (Lu et al., 2005). In Analogie dazu könnten TLRs und / oder MyD88 sowohl eine proapoptotische als auch überlebenssichernde Funktion haben, sodass in Abhängigkeit von den zur Verfügung stehenden Adaptermolekülen in einem spezifischen Zelltyp zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung entweder verstärkt neuronales Überleben oder neuronaler Zelltod ermöglicht werden (Foldi et al., 2017). Es ist nicht bekannt, ob und wie NTs eine Rolle im Rahmen der Apoptoseinduktion im Säugetierhirn spielen. In der Drosophila wurde hingegen ein Zusammenhang zwischen Kontrolle der ZNS-Zellzahl im Rahmen der Entwicklung und dem Gleichgewicht proapoptotischer und überlebenssichernder Funktion von *Toll* gezeigt (Foldi et al., 2017). Ein ähnlicher Mechanismus ist im Säugetier denkbar, da zumindest bei immunologischen Prozessen, bei denen *Toll* involviert ist, eine Übertragbarkeit auf TLRs im Säugetier möglich war, das heißt, es wurden ähnliche Mechanismen und Faktoren in diesem Kontext identifiziert (Shmueli et al., 2018).

4.1.2. Einfluss der MyD88-Defizienz auf spezifisches Verhalten

Die oben beschriebenen Verhaltensstudien ergaben ein verändertes spezifisches Verhalten adulter MyD88-defizienter Mäusen. So zeigte sich in unbekannter Umgebung eine Hypolokomotion der adulten MyD88-defizienten Mäuse. Unter interventionsfreien Bedingungen war die Lokomotion hingegen unverändert. Darüber hinaus zeigten die

MyD88-defizienten Mäuse eine leicht verlangsamte räumliche Lernfähigkeit ohne Abnahme der Kurzzeit- oder Langzeitgedächtnisleistung. Allerdings schien die kognitive Flexibilität im Sinne der Anpassung eines erlernten Verhaltens auf veränderte Bedingungen im Vergleich zum Wildtypen eingeschränkt und die Sensitivität gegenüber angstverstärkenden / exponierten Umgebungen erhöht.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen teilweise im Einklang mit in früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen beschriebener Forschungsergebnisse. So beobachteten Drouin-Ouellet et al. ebenfalls Hypolokomotion von MyD88-defizienten Mäusen im Open Field Test sowie eine reduzierte räumliche Lernleistung, getestet durch das Barnes Maze. Eine Abnahme der Kurzzeit- oder Langzeitgedächtnisleistung an Tag 5 und 12 des Barnes Maze Tests – wie von Drouin-Ouellet und Kollegen gezeigt – konnte die vorliegende Arbeit hingegen nicht bestätigen (Drouin-Ouellet et al., 2012). Stattdessen ergaben sich an den Testtagen keine Unterschiede, die auf eine veränderte Kurzzeit- oder Langzeitgedächtnisleistung MyD88-defizienter Mäuse hingewiesen hätten.

Lim et al. beobachteten erhöhte Angstlevel bei MyD88-defizienten Mäusen mittels Elevated Plus Maze Test (Lim et al., 2011b). Im Open Field Test sind Lokomotion und erhöhtes Angstlevel schwer voneinander zu trennen, da eine Vermeidung der zentralen Zone im Sinne einer Angstvermeidungsstrategie sekundär zu reduzierter Lokomotion führen kann (Deacon, 2006). Da die MyD88-defizienten Tiere im Home Cage Scan – also ohne Intervention – eine mit dem WT vergleichbare Spontanaktivität im Tag-Nacht-Zyklus zeigen, scheint es sich nicht um einen solchen sekundären Effekt zu handeln. Nichtsdestotrotz zeigten die MyD88-Mutanten im Hinblick auf spontane Verhaltensweise leichte Veränderungen. Sie verbrachten signifikant mehr Zeit mit „Hängen“ (hanging) vom Käfiggitter und „Gehen“ (walking), sodass sich auch bei der Spontanaktivität ein spezifischer Phänotyp in Abgrenzung zum WT zeigt.

Obwohl die MyD88-defizienten Tiere am Ende der Trainingstage mit dem WT vergleichbare Lernleistung bezüglich räumlichen Lernens und bezogen auf Kurzzeit- und Langzeitkonsolidierung der räumlichen Lernleistung gute Leistung zeigen, weist doch das initial im Vergleich zum WT verlangsamte Lernvermögen (Trainingstage 1 und 2) auf möglicherweise tiefgreifende kognitive Einschränkungen der MyD88-defizienten Tiere hin. Zur Beurteilung weiterer Aspekte kognitiver Fähigkeiten bzw. Einschränkungen sind weiterführende systematische Untersuchungen erforderlich. Weiterführende Tests zur Untersuchung der Ängstlichkeit in Ergänzung zum durchgeführten Open Field Test

könnten das Elevated Plus Maze (unkonditioniert) und der Vogel-Konflikttest (konditioniert) sein. Kognition wiederum könnte ergänzend zum Barnes Maze (räumliche Gedächtnisleistung) mit Tests bezüglich passiver Vermeidungsstrategien sowie klassischer und operanter Konditionierung weiter untersucht werden (Sousa et al., 2006). Bisherige Verhaltensstudien kommen zudem zu teils widersprüchlichen Ergebnissen, was die Komplexität und Herausforderung an den Versuchsaufbau hervorhebt, um der Frage nachzugehen, welche funktionelle Rolle TLRs, Adapterproteine und ihre Signalwege im Verhalten von Säugetieren spielen. So befand eine Studie eine schlechtere räumliche Lernleistung bei dem Barnes Maze Test über dem gesamten Trainingszeitraum und eine Abnahme der Kurz- und Langzeitgedächtnisleistung (Drouin-Ouellet et al., 2012), wohingegen Lim et al. über eine verbesserte Leistung bei Testung mittels Morris water maze berichteten (Lim et al., 2011b). Bezüglich der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist festzuhalten, dass Lim et al. MyD88-defiziente Mäuse eines Alzheimer Mausmodells untersuchten, d.h. APP^{swE}/PS1^{dE9} transgene Tiere. Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit Tiere im Alter von 8-10 Wochen untersucht. Lim et al. verwendeten hingegen Tiere im Alter von 10 Monaten, während Drouin-Ouellet et al. Tiere im Alter von 2-4 Monaten (Drouin-Ouellet et al., 2012). Wie groß der Einfluss auch geringer Altersunterschiede auf das Verhalten bei der Durchführung etablierter Verhaltenstests sein kann, wurde unter anderem für C57BL/6J Mäuse eindrücklich gezeigt (Shoji et al., 2016). So zeigten ältere (4-5 und 6-7 Monate) Tiere im Vergleich mit jüngeren (2-3 Monate) C57BL/6J WT Mäusen eine reduzierte Lokomotion in neuer Umgebung sowie Defizite räumlicher Lern- und Gedächtnisleistung. Getestet wurde unter anderem mittels Open Field Test, Elevated Plus Maze und Rotarod (Shoji et al., 2016).

4.2. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression bzw. das Fehlen des TLR-Adapterproteins MyD88 einen Einfluss auf die Struktur und zelluläre Zusammensetzung von Neokortex und Hippocampus hat. Zudem beeinflusst MyD88-Defizienz Verhaltensweisen in Mäusen. Es bleibt vorerst spekulativ, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen den im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen auf struktureller Ebene und dem Phänotypen (bezogen auf spezifisches Verhalten) gibt. Nichtsdestotrotz ist unter anderem bekannt, dass der Hippocampus essenziell für die

Entstehung und Konsolidierung von Gedächtnis und Erinnerung ist (Kitamura und Inokuchi, 2014).

Einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Anzahl von Neuronen und proliferativen Zellen im Kortex und Hippocampus adulter MyD88-defizienter Tiere und der vergleichbaren – beziehungsweise im Rahmen anderer Studien verbesserten (Lim et al., 2011b) – Gedächtnisleistung ist zu vermuten. Zudem ist bekannt, dass MyD88-Expression kritisch für Neurogenese im adulten Hippocampus (Okun et al., 2011), Hippocampus-abhängiges Lernen und Erinnerung und Hippocampus-abhängigen postoperativen kognitiven Verfall ist (Lynch, 2002; Terrando et al., 2010). Nicht nur MyD88, auch einzelnen TLRs wird eine Rolle bei kognitiven Leistungen zugeschrieben. TLR4, welcher als einziger TLR sowohl einen MyD88-abhängigen als auch einen MyD88-unabhängigen Signalweg induziert, spielt eine kritische Rolle bei kognitiver Beeinträchtigung (Tahara et al., 2006; Tang et al., 2008; Teeling et al., 2007). Im Mausmodell konnte ein klinischer Bezug zur Alzheimer Erkrankung aufgezeigt werden (Tahara et al., 2006; Tang et al., 2008). TLR3-defiziente Mäuse wiederum präsentieren bessere Leistungen im Hinblick auf das Hippocampus-abhängige Arbeitsgedächtnis, Objekterkennung und Angstkonditionierung (Drouin-Ouellet et al., 2012; Okun et al., 2010a).

Inwiefern die TLR-Signalkaskade und deren Endstrecke, zum Beispiel die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, einen Einfluss auf die beobachteten strukturellen Veränderungen im Hirn und die veränderten Verhaltensweisen im MyD88-defizienten Tier haben, bleibt ungeklärt. Diverse Studien haben die Rolle inflammatorischer Zytokine auf die Hirnentwicklung (Mehler und Kessler, 1997; Merrill und Jonakrait, 1995; Meyer und Feldon, 2009; O'Loughlin et al., 2017; Potvin et al., 2008; Winter et al., 2009) und Verhalten – insbesondere Hippocampus-abhängige Fähigkeiten wie Lernen und Gedächtnis (Kohman und Rhodes, 2012) – beschrieben (Dantzer et al., 2008). IL-1 β und IL-1 regulieren die Entwicklung von Dendriten kortikaler Neuronen (Gilmore et al., 2004) und die Arborisierung nigrostriataler Neurone (Parish et al., 2002). Dementsprechend könnten ähnliche Effekte durch veränderte Signalwege in MyD88-defizienten Mäusen auftreten und in einer im Vergleich zum WT veränderten Hirnentwicklung und -struktur resultieren, sowie Einfluss auf Proliferation und Zelltod in bestimmten Hirnregionen haben.

Des Weiteren ist denkbar, dass ein genereller Verlust des MyD88-Signals, das heißt ein Fehlen von MyD88-Expression, das natürliche Gleichgewicht in Richtung Inflammation

verschiebt (Lim et al., 2011b) und kompensatorisch zur Aktivierung alternativer Signalkaskaden, beispielsweise via TRIF oder SARM1, führt. SARM1 wird insbesondere im Säugetierhirn exprimiert (Lin et al., 2014; Liu et al., 2014) und hier vor allem in Neuronen. Es wurde anhand mehrerer Arbeiten gezeigt, dass SARM1 bei der Hirnentwicklung und neuronalem Überleben involviert ist (Cameron et al., 2007; Hung et al., 2018; Kim et al., 2007; Tang et al., 2007). Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen von MyD88-defizienten Mäusen weisen SARM1-defiziente Mäuse eine reduzierte dendritische Arborisierung auf (Chen et al., 2011). Damit stellt sich nicht nur die Frage nach der Expression und Funktion von MyD88 im Rahmen der Hirnentwicklung, sondern auch nach der Rolle weiterer Adapterproteine wie Mal, TRIF, TRAM und SARM1. Hierbei ist nicht nur die TLR-Signalkaskade zu berücksichtigen, sondern auch die IL-1 Rezeptorfamilie, deren Signalweg dieses Adapterprotein integriert (Janssens und Beyaert, 2002). Des Weiteren ist etabliert, dass TLRs und TLR-Adaptermoleküle – zumindest bei immunologischen Prozessen – eine ausgeprägte Redundanz aufweisen (Barreiro et al., 2009). Daher sind weitere Studien an Knockout-Tieren / Mutanten für andere Adaptermoleküle und / oder funktionelle Gruppen von TLRs notwendig, um die pathophysiologischen Mechanismen und Bedeutung der oben genannten Rezeptoren und Adapter sowie alternative Signalkaskaden im Hinblick auf Entwicklung und Struktur des Säugetiergehirns zu verstehen.

Zusammenfassend wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die zentrale Rolle von MyD88 in Bezug auf die murine Hirnstruktur, Hirnentwicklung sowie natürliche und spezifische Verhaltensweisen untersucht. Es ist zu vermuten, dass die Rolle von Toll/TLRs, respektive dMyD88/MyD88 von den ursprünglichen Arbeiten und Erkenntnissen in *Drosophila melanogaster* nicht nur im Bereich immunologischer Fragestellungen, sondern auch im Kontext von Entwicklungsprozessen auf Säugetiere übertragbar ist. Um zugrundeliegende funktionelle Mechanismen und Signalkaskaden zu identifizieren, insbesondere auch im zeitlichen Verlauf des sich entwickelnden Säugetiergehirnes, bedarf es Folgestudien, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit übersteigen. Festzuhalten bleibt, dass die Expression bzw. das Fehlen des TLR-Adapterproteins MyD88 einen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung und Struktur von Neokortex und Hippocampus hat. Zudem beeinflusst MyD88-Defizienz Verhaltensweisen in Mäusen.

Literaturverzeichnis

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsuo, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.*, 9(1): 143-150.
- Adamah-Biassi, E. B., Stepien, I., Hudson, R. L., Dubocovich, M.L. (2013). Automated video analysis system reveals distinct diurnal behaviors in C57BL/6 and C3H/HeN mice. *Behav Brain Res.*, 243: 306-312.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783-801.
- Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunolog.*, 4(7): 499-511.
- Anderson, K.V., Bokla, L., Nüsslein-Volhard, C. (1985a). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42(3): 791-798.
- Anderson, K.V., Jürgens, G., Nüsslein-Volhard, C. (1985b). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, 42(3): 779-789.
- Anthony, N., Foldi, I., Hidalgo, A. (2018). Toll and Toll-like receptor signalling in development. *Development*, 145(9): dev156018.
- Bach, M. E., Hawkins, R. D., Osman, M., Kandel, E. R., Mayford, M. (1995). Impairment of Spatial but Not Contextual Memory in CaMKII Mutant Mice With a Selective Loss of Hippocampal LTP in the Range of the Theta Frequency. *Cell*, 81(6): 905-15.
- Barak, B., Feldman, N., Okun, E. (2014). Toll-like receptors as developmental tools that regulate neurogenesis during development: an update. *Front Neurosci.*, 8: 272.
- Barnes, C. A. (1979). Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93(1): 74-104.
- Barreiro, L. B., Ben-Ali, M., Quach, H., Laval, G., Patin, E., Pickrell, J. K., Bouchier, C., Tichit, M., Neyrolles, O., Gicquel, B., Kidd, J. R., Kidd, K. K., Alcais, A., Ragimbeau, J., Pellegrini, S., Abel, L., Casanova, J-L., Quintana-Murci, L. (2009). Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet.*, 5(7): e1000562.
- Belvin, M. P., Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 12: 393-416.
- Bsibsi, M., Nomden, A., van Noort, J. M., Baron, W. (2012). Toll-like receptors 2 and 3 agonists differentially affect oligodendrocyte survival, differentiation, and myelin membrane formation. *J Neurosci Res*, 90(2): 388-398.
- Bsibsi, M., Racid, R., Gveric, D, van Noort, J. M. (2002). Broad Expression of Toll-Like Receptors in the Human Central Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 61(11):1013-21.

- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J. L., Di Marco, F., French, L., Tschopp, J. (1998). MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem.*, 273(20):12203-9.
- Cameron, J. S., Alexopoulos, Sloane, J. A., DiBernardo, A. B., Ma, Y., Kosaras, B., Flavell, R., Strittmatter, S. M., Volpe, J., Sidman, R., Vartanian, T. (2007). Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *J Neurosci.*, 27(47):13033-13041.
- Carpentier, P. A., Begolka, W. S., Olson, J. K., Elhofy, A., Karpus, W. J., Miller, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, 49(3):360-74.
- Chen, C. Y., Lin, C. W., Chang, C. Y., Jiang, S. T., Hsueh, Y. P. (2011). Sarm1, a negative regulator of innate immunity, interacts with syndecan-2 and regulates neuronal morphology. *J Cell Biol.*, 193(4):769-84.
- Chen, C. Y., Shih, Y. C., Hung, Y. F., Hsueh, Y. P. (2019). Beyond defense: regulation of neuronal morphogenesis and brain functions via Toll-like receptors. *J Biomed Sci.*, 26(1):90.
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. V., Hoeffler, C. A., Littman, D. R., Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276):933-9.
- Conover, J. S., Shook, B.A. (2011). Aging of the subventricular zone neural stem cell niche. *Aging Dis.*, 2(1):49-63.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.*, 9(1):46-56.
- Deacon, R. M. J. (2006). Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nat Protoc.*, 1(2):936-946.
- Dembny, P., Newman, A. G., Singh, M., Hinz, M., Szczepek, M., Krüger, C., Adalbert, R., Dzaye, O., Trimbuch, T., Wallach, T., Kleinau, G., Derkow, K., Richard, B. C., Schipke, C., Scheidreit, C., Stachelscheid, H., Golenbock, D., Peters, O., Coleman, M., Heppner, F. L., Scheerer, P., Tarabykin, V., Ruprecht, K., Izsvák, Z., Mayer, J., Lehnardt, S. (2020). Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) RNA causes neurodegeneration through Toll-like receptors. *JCI Insight.*, 5(7):e131093.
- Drier, E. A., Steward, R. (1997). The dorsoventral signal transduction pathway and the Rel-like transcription factors in *Drosophila*. *Semin Cancer Biol.*, (2):83-92.
- Drouin-Ouellet, J., LeBel, M., Filali, M., Cicchetti, F. (2012). MyD88 deficiency results in both cognitive and motor impairments in mice. *Brain Behav Immun.*, 26(6):880-5.
- Dzamko, N., Gysbers, A., Perera, G., Bahar, A., Shankar, A., Gao, J., Fu, Y., Halliday, G. M. (2017). Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol.*, 133(2):303-319.

- Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., Planel, E. (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res.*, 234(2):34-342.
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., Golenbock, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med.*, 198(7):1043-55.
- Foldi, I., Anthoney, N., Harrison, N., Gangloff, M., Verstak, B., Nallasivan, M. P., AlAhmed, S., Zhu, B., Phizacklea, M., Losada-Perez, M., Moreira, M., Gay, N. J., Hidalgo, A. (2017). Three-tier regulation of cell number plasticity by neurotrophins and Tolls in *Drosophila*. *J Cell Biol.*, 216(5):1421-1438.
- Franklin, K., Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates, Compact 3rd edition*. Academic Press, Elsevier.
- Fujiwara, M., Anstadt, E. J., Flynn, B., Morse, K., Ng, C., Paczkowski, P., Zhou, J., Mackay, S., Wasko, N., Nichols, F., Clark, R. B. (2018). Enhanced TLR2 responses in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.*, 193(3):313-326.
- Gay, N. J., Gangloff, M. (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.*, 76:141-65.
- Gilmore, J. H., Fredrik Jarskog, L., Vadlamudi, S., Lauder, J. M. (2004). Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology*, 29(7):1221-1229.
- Graziolo, S., Hamilton, S. J., McKinnon, M. L., Del Bel, K. L., Hoang, L., Cook, V. E., Hildebrand, K. J., Junker, A. K., Turvey, S. E. (2016). IRAK-4 deficiency as a cause for familial fatal invasive infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Immunol.*, 163:14-6.
- Halfon, M. S., Hashimoto, C., Keshishian, H. (1995). The *Drosophila* Toll gene functions zygotically and is necessary for proper motoneuron and muscle development. *Dev. Biol.*, 169(1):151-167.
- Halfon, M. S., Keshishian, H. (1998). The toll pathway is required in the epidermis for muscle development in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.*, 199(1):164-174.
- Hanke, M. L., Kielian, T. (2014). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, (9):367-387.
- Hardy, J., Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353-356.
- Hung, Y. F., Chen, C. Y., Shih, Y. C., Liu, H. Y., Huang, C. M., Hsueh, Y. P. (2018). Endosomal TLR3, TLR7, and TLR8 control neuronal morphology through different transcriptional programs. *J Cell Biol.*, 217(8):2727-2742.
- Jack, C. S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., Antel, J. P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol.*, 175(7):4320-30.

- Janssens, S., Beyaert, R. (2002). A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci.*, 27(9):474-82.
- Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z., Fekete, C. (2009). Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *Journal of Neuroscience Methods*, 184(1):115-118.
- Kaul, D., Habel, P., Derkow, K., Krüger, C., Franzoni, E., Wulczyn, F. G., Bereswill, S., Nitsch, R., Schott, E., Veh, R., Naumann, T., Lehnardt, S. (2012). Expression of Toll-like receptors in the developing brain. *PLoS One*, 7(5):e37767.
- Kawai, T., Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.*, 13(5):816-825.
- Kawai, T., Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.*, 11(5):373-84.
- Kigerl, K. A., Lai, W., Rivest, S., Hart, R. P., Satoskar, A. R., Popovich, P. G. (2007). Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *Neurochem.*, 102(1):37-50.
- Kim, Y., Zhou, P., Qian, L., Chuang, J. Z., Lee, J., Li, C., Iadecola, C., Nathan, C., Ding, A. (2007). MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival. *J Exp Med.*, 204(9):2063-2074.
- Kitamura, T., Inokuchi, K. (2014). Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain.*, 7:13.
- Kohman, R., Rhodes, J. S. (2012). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun.*, 27(1):22-32.
- Koyama, Y. (2013). The unending fascination with the golgi method. *OA Anatomy*, 1(3):24.
- Ku, C., Yang, K., Bustamante, J., Puel, A., von Bernuth, H., Santos, O. F., Lawrence, T., Chang, H. H., Al-Mousa, H., Picard, C., Casanova, J. L. (2005). Inherited disorders of human Toll-like receptor signaling: immunological implications. *Immunol Rev.*, 203:10-20.
- Kumar, V. (2019). Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol.*, 332:16-30.
- Lathia, J. D., Okun, E., Tang, S. C., Griffioen, K., Cheng, A., Mughal, M. R., Laryea, G., Selvaraj, P.K., French-Constant, C., Magnus, T., Arumugam, T. V., Mattson, M. P. (2008). Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurosci.*, 28(51):13978-13984.
- Lehmann, S. M., Krüger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., Habel, P., Kälin, R., Franzoni, E., Rybak, A., Nguyen, D., Veh, R., Ninnemann, O., Peters, O., Nitsch, R., Heppner, F. L., Golenbock, D., Schott, E., Ploegh, H. L., Wulczyn, F. G., Lehnardt, S. (2012a). An unconventional role for miRNA: let-7 activates toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci.*, 15(6):827-835.
- Lehmann, S. M., Rosenberger, K., Krüger, C., Habel, P., Derkow, K., Kaul, D., Rybak, A., Brandt, C., Schott, E., Wulczyn, F. G., Lehnardt, S. (2012b). Extracellularly delivered

- single-stranded viral RNA causes neurodegeneration dependent on TLR7. *J Immunol.*, 189(3):1448–1458.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6):973-983.
- Leulier, F., Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors - taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet.*, 9(3):165-178.
- Lim, J-E., Kou, J., Song, M., Pattanayak, A., Jin, J., Lalonde, R., Fukuchi, K. (2011a). MyD88 deficiency ameliorates beta-amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*, 179(3):1095-1103.
- Lim, J-E., Song, M., Jin, J., Kou, J., Pattanayak, A., Lalonde, R., Fukuchi, K. (2011b). The effects of MyD88 deficiency on exploratory activity, anxiety, motor coordination, and spatial learning in C57BL/6 and APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Behav Brain Res.*, 227(1):36-42.
- Lim, K-H., Staudt, L. M. (2013). Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 5(1):a011247.
- Lin, C. W., Liu, H. Y., Chen, C. Y., Hsueh, Y. P. (2014). Neuronally-expressed Sarm1 regulates expression of inflammatory and antiviral cytokines in brains. *Innate Immun.*, 20(2):161-172.
- Liu, H. Y., Chen, C. Y., Hsueh, Y. P. (2014). Innate immune responses regulate morphogenesis and degeneration: roles of Toll-like receptors and Sarm1 in neurons. *Neurosci Bull.*, 30(4):645-654.
- Liu, H. Y., Hong, Y. F., Huang, C. M., Chen, C. Y., Huang, T. N., Hsueh, Y. P. (2013). TLR7 negatively regulates dendrite outgrowth through the Myd88-c-Fos-IL-6 pathway. *J Neurosci.*, 33(28):11479-93.
- Liu, H. Y., Huang, C. M., Hung, Y. F., Hsueh, Y. P. (2015). The microRNAs *Let7c* and *miR21* are recognized by neuronal Toll-like receptor 7 to restrict dendritic growth of neurons. *Exp Neurol.*, 269:202-12.
- Lu, B., Pang, P. T., Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.*, 6(8):603-614.
- O'Neill, L. A. J., Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews*, 7(5):353-364.
- Lynch, M. (2002). Interleukin-1 beta exerts a myriad of effects in the brain and in particular in the hippocampus: analysis of some of these actions. *Vitam Horm.*, 64:185-219.
- Ma, Y., Haynes, R. L., Sidman, R. L., Vartanian, T. (2007). TLR8: an innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle*, 6(23):2859-68.
- Ma, Y., Li, J., Chiu, I., Wang, Y., Sloane, J. A., Lü, J., Kosaras, B., Sidman, R. L., Volpe, J. J., Vartanian, T. (2006). Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J Cell Biol.*, 175(2):209-215.

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C. A. Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2(2):253-8.
- Mehler, M. F., Kessler, J. A. (1997). Hematolymphopoietic and inflammatory cytokines in neural development. *Trends Neurosci.*, 20(8):357-365.
- Merrill, J. E., Jonakait, G. M. (1995). Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *FASEB J.*, 9(8):611-618.
- Meyer, U., Feldon, J. (2009). Prenatal exposure to infection: a primary mechanism for abnormal dopaminergic development in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)*, 206(4):587-602.
- Miranda-Hernandez, S., Baxter, A. G. (2013). Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. *Am J Clin Exp Immunol.*, 2(1):75-93.
- Mukherjee, P., Winkler, C. W., Taylor, K. G., Woods, T. A., Nair, V., Khan, B. A., Peterson, K. E. (2015). SARM1, Not MyD88, Mediates TLR7/TLR9-Induced Apoptosis in Neurons. *J Immunol.*, 195(10):4913-21.
- Nieto, M., Monuki, E. S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S. J., Cunningham, J., Gotz, M., Walsh, C. A. (2004). Expression of CUX1-1 and CUX1-2 in the subventricular zone and upper layers II–IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol.*, 479(2):168–180.
- Okun, E., Griffioen, K., Barak, B., Roberts, N. J., Castro, K., Pita, M. A., Cheng, A., Mughal, M. R., Wan, R., Ashery, U., Mattson, M. P. (2010a). Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(35):15525-15630.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Son, T. G., Lee, J. H., Roberts, N. J., Mughal, M. R., Hutchison, E., Cheng, A., Arumugam, T. V., Lathia, J. D., van Praag, H., Mattson, M. P. (2010b). TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurochem.*, 114(2):462-474.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.*, 34(5):269-281.
- O'Loughlin, E., Pakan, J. M. P., Yilmazer-Hanke, D., McDermott, K. W. (2017). Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *J Neuroinflammation*, 14(1):212.
- Olsen, B. J. S. C., Markwell, J. (2007). Assays for the determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci.*, 3:14-17.
- Olson, J. K., Miller, S. D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.*, 173(6):3916-3924.

- Parish, C. L., Finkelstein, D.I., Tripanichkul, W., Satoskar, A. R., Drago, J., Horne, M. K. (2002). The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice. *J Neurosci.*, 22(18):8034-8041.
- Pitts, M. W. (2018). Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio Protoc.*, 8(5):e2744.
- Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A. A., Gendron, A., Bah, R., Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*, 63(8):801-808.
- Prut, L., Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review. *Eur J Pharmacol.*, 463(1-3):3-33.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(2): 588–59.
- Rogers, D. C., Fisher, E. M., Brown, S. D., Peters, J., Hunter, A. J., Martin, J. E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome*, 8(10):711-713.
- Roh, K. B., Kim, C. H., Lee, H., Kwon, H. M., Park, J. W., Ryu, J. H., Kurokawa, K., Ha, N. C., Lee, W. J., Lemaitre, B., Söderhäll, K., Lee, B. L. (2009). Proteolytic Cascade for the Activation of the Insect Toll Pathway Induced by the Fungal Cell Wall Component. *J Biol Chem.*, 284(29):19474–19481.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol.*, 9(9):1081-1088.
- Rosenberger, K., Derkow, K., Dembny, P., Krüger, C., Schott, E., Lehnardt, S. (2014). The impact of single and pairwise Toll-like receptor activation on neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*, 11:166.
- Rosenberger, K., Dembny, P., Derkow, K., Engel, O., Krüger, C., Wolf, S. A., Kettenmann, H., Schott, E., Meisel, A., Lehnardt, S. (2015). Intrathecal heat shock protein 60 mediates neurodegeneration and demyelination in the CNS through a TLR4- and MyD88-dependent pathway. *Mol Neurodegener.*, 10:5.
- Satoh, T., Akira, S. (2016). Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Microbiol Spectr.*, 4(6).
- Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.*, 182(3):311-322.
- Schroeder, P., Rivalan, M., Zaqout, S., Krüger, C., Schüler, J., Long, M., Meisel, A., Winter, Y., Kaindl, A. M., Lehnardt, S. (2020). Abnormal brain structure and behavior in MyD88-deficient mice. *Brain, Behav Immun.*, 91:181-193.
- Shechter, R., Ronen, A., Rolls, A., London, A., Bakalash, S., Young, M. J., Schwartz, M. (2008). Toll-like receptor 4 restricts retinal progenitor cell proliferation. *J Cell Biol.*, 183(3):393-400.

- Shmueli, A., Shalit, T., Okun, E., Shohat-Ophir, G. (2018). The Toll Pathway in the Central Nervous System of Flies and Mammals. *Neuromolecular Med.*, 20(4):419–436.
- Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol Brain*, 28;9-11.
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.*, 87(4):387-406.
- Sloane, J. A., Batt, C., Ma, Y., Harris, Z. M., Trapp, B., Vartanian, T. (2010). Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(25):11555-11560.
- Smith, P.K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.*, 150(1):76-85.
- Smith, S. E., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., Patterson, P. H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6 . *J Neurosci.*, 27(40):10695-702.
- Sousa, N., Almeida, O. F., Wotjak, C. T. (2006). A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav.*, 5 Suppl 2:5-24.
- Stathopoulos, A., Levine, M. (2002). Dorsal gradient networks in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol.*, 246(1):57-67.
- Sun, H., Bristow, B. N., Qu, G., Wasserman, S. A. (2002). A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20):12871-12876.
- Sun, H., Towb, P., Chiem, D. N., Foster, B. A., Wasserman, S. A. (2004). Regulated assembly of the Toll signaling complex drives *Drosophila* dorsoventral patterning. *EMBO J.*, 23(1):100-110.
- Tahara, K., Kim, H. D., Jin, J. J., Maxwell, J. A., Li, L., Fukuchi, K. (2006). Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain*, 129(Pt 11):3006-3019.
- Takeda, K., Akira, S. (2015). Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.*, 52(1):14.12.1-14.12.11.
- Tang, S-C., Arumugam, T.V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M. R., Jo, D. G., Lathia, J. D., Siler, D. A., Chigurupati, S., Ouyang, X., Magnus, T., Camandola, S., Mattson, M.P. (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(34):13798-13803.
- Tang, S-C., Lathia, J. D., Selvaraj, P. K., Jo, D. G., Mughal, M. R., Cheng, A., Siler, D. A., Markesbery, W. R., Arumugam, T. V., Mattson, M. P. (2008). Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol.*, 213(1):114-121.
- Teeling, J. L., Felton, L. M., Deacon, R. M., Cunningham, C., Rawlins, J. N., Perry, V. H. (2007). Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. *Brain Behav Immun.*, 21(6):836-850.

- Terrando, N., Monaco, C., Ma, D., Foxwell, B. M., Feldmann, M., Maze, M. (2010). Tumor necrosis factor-alpha triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(47):20518-20522.
- Valanne, S., Wang, J. H., Rämet, M. (2011). The Drosophila Toll signaling pathway. *J Immunol.*, 186(2):649-656.
- Vogel, S. N., Fitzgerald, K. A., Fenton, M. J. (2003). TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv.*, (8):466-77.
- von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C. L., Chrabieh, M., Mustapha, I. B., Ghandil, P., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Sirvent, N., Guedes, M., Vitor, A. B., Herrero-Mata, M. J., Aróstegui, J. I., Rodrigo, C., Alsina, L., Ruiz-Ortiz, E., Juan, M., Fortuny, C., Yagüe, J., Antón, J., Pascal, M., Chang, H. H., Janniere, L., Rose, Y., Garty, B. Z., Chapel, H., Issekutz, A., Maródi, L., Rodriguez-Gallego, C., Banchereau, J., Abel, L., Li, X., Chaussabel, D., Puel, A., Casanova, J. L. (2008). Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. *Science*, 321(5889):691-6.
- von Bernuth, H., Picard, C., Puel, A., Casanova, J. L. (2012). Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. *Eur J Immunol.*, 42(12):3126-3135.
- Wasserman, S. A. (2000). Toll signaling: the enigma variations. *Curr Opin Genet Dev.*, 10(5):497-502.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., Cao, Z. (1997). MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity*, 7(6):837-47.
- Winter, C., Djodari-Irani, A., Sohr, R., Morgenstern, R., Feldon, J., Juckel, G., Meyer, U. (2009). Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 12(4):513-524.
- Wu, W. L., Hsiao, E. Y., Yan, Z., Mazmanian, S. K., Patterson, P. H. (2017). The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. *Brain Behav Immun.*, 62:11-23.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633):640-643.
- Zaqout, S., Kaindl, A. (2016). Golgi-Cox Staining Step by Step. *Front Neuroanat.*, 10:38.
- Zhu, J. W., Li, Y. F., Wang, Z. T., Jia, W. Q., Xu, R. X. (2016). Toll-Like Receptor 4 Deficiency Impairs Motor Coordination. *Front Neurosci*, 10:33.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Patricia Beatrix Schroeder, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einfluss der Expression von MyD88 auf die Struktur des murinen Gehirns / Impact of MyD88 expression on the murine brain structure selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Ich, Patricia Beatrix Schroeder, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Schroeder, P., Rivalan, M., Zaqout, S., Krüger, C., Schüler, J., Long, M., Meisel, A., Winter, Y., Kaindl, A. M., Lehnardt, S. (2020). Abnormal brain structure and behavior in MyD88-deficient mice. *Brain, Behav Immun.*, 91:181-193.

Beitrag im Einzelnen:

Die grundsätzliche Konzeption des Themas „Einfluss der Expression von MyD88 auf die Struktur des murinen Gehirns“ erfolgte durch Prof. Dr. med. S. Lehnardt. Ich habe anschließend (zusammen mit Prof. Dr. med. S. Lehnardt) die weiteren Detailfragen und den konkreten experimentellen Ablauf ausgearbeitet. Des Weiteren erfolgte durch mich die eigenständige Durchführung der Experimente, inklusive Datenauswertung, mit Ausnahme folgender Experimente bzw. Auswertungen:

- Die statistische Auswertung von HCS und SAM (Figure 5) erfolgte durch M. Rivalan.
- Die Färbung mit S100 β und deren statistische Auswertung erfolgte durch C. Krüger, J. Schüler und S. Lehnardt (Vgl. Figure 1B und 3B).

Die Resultate habe ich kritisch analysiert und Limitationen und Schlussfolgerungen zusammen mit Prof. Dr. med. S. Lehnardt und den weiteren Ko-Autoren erarbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Schroeder, P., Rivalan, M., Zaqout, S., Krüger, C., Schüler, J., Long, M., Meisel, A., Winter, Y., Kaindl, A. M., Lehnardt, S. (2020). Abnormal brain structure and behavior in MyD88-deficient mice. *Brain, Behav Immun.*, 91:181-193.

Danksagung

Zuallererst richtet sich mein Dank an Frau Prof. Dr. med. Seija Lehnardt für die Überlassung des Themas, insbesondere auch für eine hervorragende Betreuung und stets hilfreiche und gute Ratschläge.

Frau Prof. Dr. med. Angela Kaindl und der ganzen AG Kaindl (insbesondere Sami Zaqout) möchte ich für eine gute Zweibetreuung sowie viele Anregungen danken. Marion Rivalan und Melissa Long von der AG Winter danke ich für die Kooperation im Rahmen der Verhaltensstudien und Hilfestellung bei Durchführung und Auswertung dieser.

Ich danke dem Graduiertenkolleg des SFB TRR43 für die finanzielle und ideelle Förderung im Rahmen meines Promotionsstipendiums.

Paul Dembny danke ich für das stets offene Ohr, die gute Gesellschaft, fachliche Unterstützung und insbesondere viele Lacher und kurzweilige Momente. Markus Klammer für die freundschaftliche Verbundenheit. Christina Krüger für die Unterstützung bei verschiedensten Experimenten sowie die gute Gesellschaft.

Ich danke meinen Eltern und insbesondere auch meinen Großeltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht und damit einen wesentlichen Teil zu der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Danke insbesondere auch an Matthias Straka für die unermüdliche Unterstützung.

Diese Arbeit widme ich meinem Großvater.