

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die let-7-miRNA-Familie: Untersuchung ihres Vorkommens in  
humanem Liquor bei neurodegenerativen Erkrankungen und ihrer  
neurotoxischen Wirkung *in vitro*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rosa Rößling

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.12.2020

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in folgendem Artikel:

Distinct expression of the neurotoxic microRNA family let-7 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Plos One, 2018.

Katja Derkow\*, **Rosa Rössling\***, Carola Schipke, Christina Krüger, Jakob Bauer, Michael Fähling, Andrea Stroux, Eckart Schott, Oliver Peters, Seija Lehnardt

**\*geteilte Erstautorenschaft**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Abstract .....	6
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
2.1 Die Alzheimer-Demenz .....	8
2.1.1 Die Frontotemporale Demenz .....	10
2.1.2 Depression mit kognitiver Beeinträchtigung .....	11
2.1.3 Klinisch Isoliertes Syndrom/Multiple Sklerose .....	11
2.2 MicroRNAs .....	12
2.2.1 Die Stabilität von miRNAs im Extrazellulärraum .....	13
2.2.2 Die miRNA-Familie let-7 .....	15
2.3 Toll-like Rezeptoren .....	17
2.4 MiRNAs und ZNS-Erkrankungen .....	18
2.5 Arbeitshypothese und Fragestellung .....	19
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1 Studiendesign .....	21
3.2 Patientenproben .....	21
3.2.1 Humane Liquorproben .....	21
3.2.2 Humanes Hirngewebe .....	22
3.3 Materialien .....	24
3.3.1 Chemikalien/Reagenzien .....	24
3.3.2 Medien und Puffer .....	26
3.3.3 Kommerzielle Kits .....	27
3.3.4 Primer .....	27
3.3.5 TLR-Liganden .....	28
3.3.6 Antikörper .....	29
3.3.7 Nukleinsäure-Anfärbung .....	30
3.3.8 Mausstämme und Zelllinien .....	30
3.3.9 Geräte .....	30
3.3.10 Sonstige Materialien und Verbrauchsmaterialien .....	31
3.3.11 Software .....	32
3.4 Methoden .....	32
3.4.1 Zellkultur .....	32
3.4.1.1 Anfertigung primärer Neuronenkulturen .....	32
3.4.1.2 Kultivierung von N1E-115- und SH-SY5Y-Zellen .....	33
3.4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	33
3.4.1.4 Zellzahlbestimmung .....	33
3.4.1.5 Stimulation von Neuronen .....	34
3.4.2 Immunzytochemie .....	34
3.4.2.1 Anfärbung von Neuronenkulturen .....	34
3.4.2.2 Apoptosefärbung .....	35
3.4.2.3 Fluoreszenzmikroskopie .....	35
3.4.3 Molekularbiologische Methoden .....	36
3.4.3.1 Herstellung von Zelllysate aus Hirngewebe .....	36
3.4.3.2 Exosomen-Isolation .....	36
3.4.3.3 RNA-Präparation .....	36
3.4.3.4 Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	37
3.4.3.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	37
3.4.3.6 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	38
3.4.3.7 Berechnung einer Standard-Reihe .....	39

3.4.3.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	40
3.4.3.9	Durchflusszytometrie.....	40
3.4.4	Proteinbiochemische Techniken.....	40
3.4.4.1	Proteinextraktion.....	40
3.4.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.4.4.3	Proteintransfer.....	41
3.4.4.4	Immunfärbung.....	42
3.5	Statistische Auswertung.....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
4.1	Untersuchung der let-7-miRNAs in humanem Liquor.....	43
4.1.1	Die let-7-miRNA- Familie im Liquor von Patienten mit AD.....	43
4.1.1.1	Expression der let-7-miRNA-Familie im humanen Gehirn.....	46
4.1.2	Die miRNAs let-7b und let-7e sind in AD-Liquor quantitativ erhöht.....	46
4.1.3	Nachweis ausgewählter let-7-miRNAs im Liquor von FTD, MDE und CIS....	47
4.1.4	Quantifizierung der miRNAs let-7b und let-7e bei FTD, MDE und CIS.....	50
4.1.5	Stabilität von miRNAs im humanen Liquor.....	51
4.1.6	Exosomen lassen sich aus AD-Liquor isolieren.....	52
4.1.7	Let-7b- und let-7e-miRNAs aus humanem Liquor sind mit Exosomen assoziiert.....	53
4.1.8	Zusammenfassung: Untersuchung der let-7-miRNAs in humanem Liquor.....	55
4.2	Die let-7-miRNA-Familie wirkt neurotoxisch <i>in vitro</i> .....	56
4.2.1	Let-7-miRNAs verursachen morphologische Veränderungen an Neuronen....	57
4.2.2	Let-7-miRNAs verursachen neuronalen Zelltod.....	61
4.2.3	Der neuronaler Zelltod induziert durch let-7-miRNAs ist dosis- und zeitabhängig.....	64
4.2.4	Let-7-miRNAs induzieren neuronale Schädigung in Kulturen einer murinen Neuroblastoma-Zelllinie.....	68
4.2.5	Neurotoxizität in Kulturen einer humanen Neuroblastoma-Zelllinie.....	69
4.2.6	Zusammenfassung: Die let-7-miRNA-Familie wirkt neurotoxisch <i>in vitro</i> .....	72
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
5.1	Die Ergebnisse im Kontext bisheriger Forschungsergebnisse.....	73
5.1.1	Technische Aspekte der miRNA-Untersuchung im Liquor.....	73
5.1.2	Das Vorkommen von let-7-miRNAs im Liquor.....	76
5.1.3	Die extrazelluläre Stabilität von miRNAs.....	78
5.1.4	Die Neurotoxizität der let-7-miRNA-Familie.....	79
5.1.5	Let-7-miRNAs im Liquor und ihre Neurotoxizität <i>in vitro</i> .....	81
5.2	Let-7-miRNAs und ihre mögliche Verwendung in der Klinik.....	83
5.2.1	MiRNAs als Biomarker bei ZNS-Erkrankungen.....	83
5.2.2	Let-7-MiRNAs als Zielmoleküle in der Therapie.....	86
5.3	Ausblick.....	86
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>100</b>
	<b>Anteilerklärung an erfolgten Publikationen.....</b>	<b>101</b>
	Weitere Veröffentlichungen, Poster und Kongressbeiträge.....	102
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>103</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD), eine neurodegenerative Erkrankung vor allem des älteren Menschen, ist verantwortlich für mindestens 60 % aller Demenzen. Dennoch ist eine frühe Diagnose nach wie vor schwierig zu stellen, insbesondere in Abgrenzung zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen. MicroRNAs (miRNAs) sind ca. 22 Nukleotide lange, nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, die an der post-transkriptionellen Genexpression beteiligt sind. Die miRNA-Familie let-7 ist stark im Gehirn exprimiert und umfasst neun miRNAs mit ähnlicher Sequenz, let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i und miR-98. Alle let-7-miRNAs verfügen über ein GU-reiches Motiv, über das sie als endogene Signalmoleküle den Toll-like-Rezeptor (TLR) 7 stimulieren können, was in Mikroglia und Neuronen zu Neuroinflammation und -degeneration führt.

In dieser Arbeit sollte mittels quantitativer Echt-Zeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) die Expression von let-7-miRNAs in humanem Liquor von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen und gesunden Individuen, die als Vergleichskontrollgruppe dienten, ermittelt und quantifiziert werden. Ob und in welchem Ausmaß Mitglieder der let-7-miRNA-Familie neurotoxisch wirken können, wurde zudem an primären murinen Neuronen sowie einer murinen und einer humanen neuronalen Zelllinie untersucht und nach immunozytochemischer Färbung sowie mit der TUNEL-Methode beurteilt.

Let-7-miRNAs konnten sowohl im Liquor von Patienten mit AD sowie von Patienten mit Frontotemporaler Demenz (FTD), Depression, klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und im Liquor von gesunden Kontrollpatienten detektiert werden. Die Quantität der einzelnen let-7-miRNAs im Liquor variierte dabei deutlich. Die Kopienzahlen der miRNAs let-7b und let-7e waren im Liquor von AD-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe erhöht. Let-7b-Kopienzahlen waren außerdem erhöht in Liquores von Patienten mit Depression und let-7e-Kopienzahlen im Liquor von Patienten mit Depression und von Patienten mit CIS. Die übrigen getesteten let-7-miRNAs wiesen keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Let-7e und let-7b waren auch nach langer Lagerung noch im Liquor von Patienten mit AD nachweisbar und lagen im AD-Liquor vollständig mit Exosomen assoziiert vor. Alle untersuchten Mitglieder der let-7-Familie zeigten an primären Neuronenkulturen neurotoxische Effekte im Sinne morphologischer Zellschädigung sowie gesteigerter Apoptose. Die Anwesenheit von nicht-neuronalen Zellen wie Mikroglia war dabei nicht notwendig, denn nach Stimulation neuronaler Zelllinien wurde ein ebenso ausgeprägter neuronaler Zelltod beobachtet.

Die selektive Expression von let-7-miRNAs im Liquor von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, ihre Stabilität und ihre nachgewiesene Neurotoxizität könnten unser Verständnis der Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen vertiefen und machen let-7-miRNAs zu potentiellen Biomarkern für Diagnose und Beurteilung spezifischer neurodegenerativer Erkrankungen wie AD.

## 1.1 Abstract

AD is a neurodegenerative disease of the elderly and responsible for at least of 60 % of all forms of dementia. Nevertheless, early diagnosis continues to be challenging, in particular when differentiated from other neurodegenerative diseases. MiRNAs are 22 nucleotides long, non-coding single-stranded RNAs involved in the posttranscriptional regulation of gene expression. The miRNA-family let-7 is expressed abundantly in the brain and comprises 9 members, let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i and miR-98 that share a similar sequence. All let-7 miRNAs have a GU-rich motif in common by which they can act as endogenous signalling molecules for TLR7 and lead to neuroinflammation and -degeneration in microglia and neurons.

Here, expression of let-7 miRNAs in human cerebrospinal fluid (CSF) of patients with neurodegenerative diseases and healthy control individuals should be quantified and analysed comparatively by qRT-PCR. The question of if, and to what extent members of the let-7 family mediate neurotoxicity was analysed in primary cortical neurons as well as in a murine and a human neuronal cell line using immunostaining and TUNEL-assay.

Let-7 miRNAs could be detected in the CSF of patients with AD, FTD, Major depressive Episode (MDE) and CIS as well as in the control individuals. However, the amount of individual let-7 miRNAs in the CSF varied substantially. CSF from patients with AD contained higher amounts of let-7b and let-7e compared to healthy controls. No increase in let-7b and let-7e copy numbers was detected in CSF from patients with FTD, whereas copy levels of let-7b were elevated in CSF from patients with depression. Additionally, copy levels of let-7e were elevated in CSF from patients with depression and from patients with CIS. No differences were observed with regards to the other let-7 miRNAs. Detection of let-7b and let-7e in the CSF of patients with AD was still possible after a long storage time. Besides, in CSF of patients with AD, let-7b and let-7e were exclusively associated with exosomes. In primary cortical neurons all let-7 family members that were tested mediated neurotoxicity with morphological cell damage and increased apoptosis. Presence of non-neuronal cells like microglia was not necessary, given that stimulation of neuronal cell lines led to a similar degree of cell death.

Selective expression of let-7 miRNAs in CSF of patients with neurodegenerative diseases and their demonstrated neurotoxicity could further help to understand the pathology of

neurodegenerative diseases. Thus, let-7 miRNAs are potential biomarkers for diagnosis and evaluation of specific neurodegenerative diseases like AD.

## 2 Einleitung

Inhalt dieser Arbeit ist die Analyse der microRNA- (miRNA) Familie let-7 in humanem Liquor und die Untersuchung ihrer neurotoxischen Wirkung *in vitro*. Es wurde Liquor von Patienten mit Alzheimer Demenz (AD), Frontotemporaler Demenz (FTD), Depression (im Folgenden auch *Major Depressive Episode*, MDE, genannt) mit kognitiver Beeinträchtigung, Klinisch Isoliertem Syndrom (*Clinically Isolated Syndrome*, CIS) sowie von gesunden, nicht-dementen Kontrollpatienten untersucht. Die neurotoxischen Eigenschaften von let-7-miRNAs wurden an primären murinen Neuronen sowie an murinen und humanen Zelllinien untersucht.

Im folgenden Kapitel soll zunächst auf die oben genannten verschiedenen Erkrankungsbilder eingegangen werden. Anschließend sollen die Eigenschaften von miRNAs charakterisiert werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den Mitgliedern der let-7-Familie und ihrer unkonventionellen Funktion als extrazelluläres Signalmolekül. Zuletzt wird der Stand der Literatur zu Untersuchungen von miRNAs in menschlichem Liquor vorgestellt.

### 2.1 Die Alzheimer-Demenz

Schätzungen besagen, dass im Jahr 2050 allein in Europa knapp 19 Millionen Menschen von einer Demenz betroffen sein werden. Die AD ist dabei für mindestens 60 % der Demenzerkrankungen verantwortlich (Ferri et al., 2005, Alzheimer's Disease International, 2009). Die sporadische AD ist eine neurodegenerative Erkrankung, die vor allem ab einem Alter von über 65 Jahren auftritt. Mit zunehmender Lebenserwartung der Bevölkerung wird die AD eines der dringlichsten Probleme der Gesundheits- und Sozialsysteme weltweit werden. Die WHO hat das deutlich gemacht, indem sie die Auseinandersetzung mit Demenz zu einer Priorität im Gesundheitswesen erklärt hat (WHO, 2012).

Bei der AD führen eine globale Hirnatrophie mit temporoparietaler Betonung sowie eine Abnahme des Hippocampus-Volumens zu einer Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit. Besonders betroffen sind Merkfähigkeit und Orientierung (Yew et al., 2013). Die Patienten haben im Verlauf zunehmend Schwierigkeiten, die Aktivitäten des täglichen Lebens zu bewältigen, was unter anderem auf den ausgeprägten Verlust praktischer Fähigkeiten, die Unfähigkeit, Entscheidungen zu treffen sowie Informationen zu interpretieren, und abnehmendes Sprachverständnis zurückzuführen ist. Hinzukommen können neuropsychologische Symptome wie Apathie, sozialer Rückzug und Irritabilität, die eine



Abgrenzung zur Depression erschweren. Auch psychotische Symptome sowie Agitiertheit und Aggression können auftreten (Scarmeas et al., 2007).

Neuropathologische Kennzeichen der AD sind zum einen extrazelluläre Plaques aus Amyloid-beta ( $A\beta$ ) und zum anderen intrazelluläre Neurofibrillen, Aggregate aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Die  $A\beta$ -Ablagerungen bewirken eine zelluläre Dysfunktion und führen zu neuronalem Zelltod im Gehirn.  $A\beta_{1-42}$  und  $A\beta_{1-40}$  sind Spaltprodukte des Amyloid-Vorläuferproteins (*Amyloid Precursor Protein*, APP), wobei  $A\beta_{1-42}$  zu Aggregatbildung neigt (Hardy et al., 1992, Hardy, 2006). Tau ist ein lösliches Mikrotubuli-assoziiertes Protein. Es bildet bei Hyperphosphorylierung unlösliche Fibrillen, die die Struktur und die Funktion des befallenen Neurons zerstören (Kosik et al., 1986).

Laut den Kriterien des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association ist die sichere Diagnose einer AD erst im fortgeschrittenen Stadium oder durch Untersuchung einer Gewebeprobe – per Biopsie oder *post mortem* – möglich (McKhann et al., 1984, McKhann et al., 2011). Pathologische Veränderungen der Hirnsubstanz, wie Ablagerungen von  $A\beta$ -Plaques, Neurofibrillen und Nekrose, treten jedoch schon Jahre vor den ersten Symptomen auf. Eine Korrelation zwischen dem klinischen Stadium und dem Ausmaß der Atrophie ist vor allem in frühen Stadien schwierig herzustellen; hier greift das Phänomen der kognitiven Reserve (Stern, 2012). Hierunter versteht man eine aufgrund geistiger Aktivität verhältnismäßig geringe kognitive Einschränkung trotz ausgeprägter Atrophie.

Nach Dubois et al. müssen für die Diagnose einer AD folgende Punkte erfüllt sein: Zum einen muss ein spezifischer klinischer Phänotyp mit einer deutlichen Einschränkung des episodischen Gedächtnisses vorliegen. Der Gedächtnisverlust muss graduell fortschreiten und über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten bestehen. Außerdem muss er in einer objektiven Testung, wie dem Mini Mental State Examination (MMSE) oder der Demenz-Detektion (DemTect), bestätigt werden. Zum anderen müssen Anhaltspunkte für eine AD-typische Pathologie vorliegen: entweder Liquor mit vermindertem  $A\beta_{1-42}$ - und erhöhtem Total-(T) beziehungsweise phosphoryliertem (P)-tau-Gehalt, eine Positronen-Emissions-Tomographie-Bildgebung (PET) mit Amyloid-Markern, die Amyloid-Plaques zur Darstellung bringt, oder der Nachweis einer autosomal dominanten Mutation im Präsenelin-1-, Präsenelin-2- oder APP-Gen (Dubois et al., 2007, Dubois et al., 2014). Solche Mutationen treten mit vollständiger Penetranz auf und verändern den Abbau von APP. Der gestörte Abbau hat erhöhte  $A\beta$ -Konzentrationen im Gehirn zur Folge und führt zu einer in einem frühen Stadium symptomatischen Alzheimer-Erkrankung (early-onset-AD, EOAD) (Shepherd et al., 2009). Auch bei der sporadischen AD gibt es genetische Risikofaktoren (Harvey et al., 2003). Das

Apolipoprotein E (ApoE) ist an der Regulation des Lipidmetabolismus beteiligt; die Isoform ApoE4 reguliert außerdem die A $\beta$ -Ablagerung sowie A $\beta$ -Fibrillen- und A $\beta$ -Plaquerbildung und ist mit dem Auftreten der sporadischen AD assoziiert (Holtzman et al., 2000, Raber et al., 2004).

Bis heute gibt es, abgesehen von neuropsychologischen Testverfahren, keinen sicheren Verlaufsmarker der AD; erst die Kombination von verschiedenen Markern erlaubt eine diagnostische Aussage. Sensitivität und Spezifität liegen – je nach Studie – bei bis zu 90 % (de Souza et al., 2011). Das trifft jedoch nicht für Abweichungen von der ‚typischen‘ Form der AD zu (Galton et al., 2000). Ebenfalls ist es schwierig, die prodromale AD zu erkennen und zu einem frühen Zeitpunkt von anderen Demenz-assoziierten Erkrankungen wie beispielsweise FTD oder Depression zu unterscheiden. Aber gerade die frühe Diagnosestellung ist wichtig für den Patienten und seine Angehörigen, um einerseits eine schnelle und bessere Behandlung zu gewährleisten und andererseits eine persönliche Planung des Lebens mit AD zu ermöglichen (Ballard et al., 2011).

### **2.1.1 Die Frontotemporale Demenz**

Unter den Demenzen, die bei Patienten im Alter unter 60 Jahren auftreten, ist die Prävalenz der FTD häufiger als die der AD (Ratnavalli et al., 2002). Die behaviorale Variante der FTD (bvFTD) ist die häufigste klinische Manifestation. Pathologisch liegt dieser Demenzform eine frontotemporale Lobärdegeneration (FTLD) zugrunde. Neben den kognitiven Beeinträchtigungen ist die Erkrankung durch Persönlichkeitsveränderungen gekennzeichnet (Hornberger et al., 2010). Die Patienten verhalten sich enthemmt und distanzlos, sind apathisch und haben mangelndes Empathievermögen. Sie zeigen perseverierendes Verhalten und Stereotypien. Des Weiteren ändert sich ihr Essverhalten hin zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme in Verbindung mit einer Hyperoralität. Dabei besteht typischerweise keine Krankheitseinsicht (Perry et al., 2013).

In der zerebralen Bildgebung ist eine frontale und/oder anterior temporale Atrophie sichtbar. Pathologische Merkmale der Erkrankung wurden zum ersten Mal von Arnold Pick beschrieben. Nach ihm benannt sind die Pick-Körper, die im Zytoplasma ballonierter Neurone auftreten und Ablagerungen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein enthalten (Pick, 1892). Bei den selteneren Tau-negativen Pathologien hingegen werden Akkumulationen des RNA-bindenden-Proteins ‚43-kd-TAR-DNA-binding-Protein‘ (TDP-43) oder des ‚Protein Fused in Sarcoma‘ (Ambros et al., 2003) beschrieben (Snowden et al., 2007).

Die Erkrankung wird anhand des klinischen Bildes und einer Biopsie oder durch Nachweis einer pathogenetischen Mutation diagnostiziert. Dabei darf kein Hinweis auf eine andere neurologische oder psychiatrische Erkrankung vorliegen. Da zuverlässige Biomarker fehlen, ist

die Diagnose zu Lebzeiten schwer zu sichern (Rascovsky et al., 2011). Eine frühe Diagnose würde jedoch den Umgang mit der Erkrankung bedeutend erleichtern. In Anbetracht des großen Anteils hereditärer Formen kann die Diagnose auch für die Familie des Patienten von großem Interesse sein (Seelaar et al., 2008).

### **2.1.2 Depression mit kognitiver Beeinträchtigung**

Hauptsymptome einer MDE sind gedrückte Stimmung, Interessenverlust und Freudlosigkeit sowie Antriebsmangel und erhöhte Ermüdbarkeit. Daneben können Zusatzsymptome wie Schlafstörungen und Appetitverlust bestehen, aber auch kognitive Einschränkungen wie Konzentrationsstörungen, psychomotorische Verlangsamung und Verschlechterung der Gedächtnisfunktion (Ravnikle et al., 2002, ICD-10-GM, 2016). Bei Patienten mit MDE, die keine antidepressive Medikation erhielten, konnte in einer Studie eine Abnahme des Hippocampus-Volumens festgestellt werden (Sheline et al., 2003). Kognitive Symptome treten einerseits häufig früh im Krankheitsverlauf auf, können andererseits aber auch nach abgeschlossener Behandlung als Residuen zurückbleiben (Fava et al., 2006). Bessern sich die Gedächtnisstörungen nach Ende der depressiven Episode, spricht man von einer sogenannten ‚Pseudodemenz‘. Das heißt, dass die demenziellen Symptome im Rahmen der MDE durch Apathie und fehlenden Antrieb verursacht werden und reversibel sind (Kiloh, 1961). Jedoch muss gerade bei älteren Patienten differentialdiagnostisch an eine zugrundeliegende neurodegenerative Erkrankung gedacht werden. Klinisch neigen Patienten mit Depression dazu, ihre Gedächtnisprobleme zu betonen, Patienten mit AD hingegen leugnen und verheimlichen ihre Symptome häufig. Eine Depression kann auch eine frühe oder prodromale Manifestation der AD sein (Devanand et al., 1996). Das Risiko, dass bei Patienten mit einer MDE innerhalb von fünf Jahren eine Demenz, insbesondere vom Alzheimer-Typ, diagnostiziert wird, ist erhöht (Alexopoulos et al., 1993, Devanand et al., 1996). Ob eine MDE dabei Ursache oder lediglich Symptom einer Demenzerkrankung ist, ist allerdings noch nicht geklärt. Um eine adäquate Behandlung sowohl für die Depression als auch die möglicherweise zugrundeliegende AD gewährleisten zu können, ist wiederum eine frühe Zuordnung zu der jeweiligen Erkrankung entscheidend.

### **2.1.3 Klinisch Isoliertes Syndrom/Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Zeitlich und räumlich disseminierte Entmarkungsherde mit nachfolgender Gliose führen zu neurologischen Funktionseinschränkungen und sind pathognomonisch (Polman et al., 2011). Die

MS manifestiert sich meist im jungen Erwachsenenalter und ist in diesem Alter die häufigste Ursache nichttraumatischer Behinderung. Die Erkrankung verläuft initial zumeist in Schüben oder – insbesondere bei späterem Krankheitsbeginn – primär progressiv. Häufige Symptome sind Visuseinschränkungen, Sensibilitätsstörungen sowie Paresen und Ataxie. Es können auch kognitive Beeinträchtigungen wie etwa Gedächtnisstörungen auftreten (Noseworthy et al., 2000). Das CIS bezeichnet eine erstmalig auftretende neurologische Störung, die mit einer einzelnen entzündlich-demyelinisierenden Läsion des Zentralnervensystems (ZNS) – meist im Nervus opticus, Hirnstamm oder Rückenmark – einhergeht. Es ist die erste klinische Manifestation einer möglichen MS (Miller et al., 2012). Wie bei Fisniku et al. gezeigt, entwickelte sich in 63 % der Fälle aus einem CIS das Vollbild einer MS (Fisniku et al., 2008).

CIS und MS sind neuroinflammatorische Erkrankungen mit Mikrogliaaktivierung und Blut-Hirn-Schrankenstörung im akuten Schub. Außerdem kommt es zu einer progredienten Schädigung von Axonen und einem Untergang von Neuronen (Trapp et al., 1998). In späteren Krankheitsstadien kann häufig eine progressive Atrophie des Gehirns beobachtet werden. In einer Studie mit 105 CIS-Patienten zeigten diejenigen CIS-Patienten, die im Verlauf eine MS entwickelten, im MRT verglichen mit gesunden Probanden eine signifikante Abnahme der grauen Substanz in kortikalen Bereichen, dem Thalamus und dem Putamen (Calabrese et al., 2011). Liquores von Patienten mit einem CIS enthalten erhöhte Konzentrationen an Neurofilamenten und Tau-Protein, die Ausdruck einer Axon- und Neuronschädigung sind (Brettschneider et al., 2006).

## 2.2 MicroRNAs

MiRNAs sind ca. 22 Nukleotide lange, einzelsträngige, nicht-kodierende RNAs. Sie werden ubiquitär exprimiert. Zuerst entdeckt in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) im Jahr 1993 von Lee et al., sind heute über 1800 verschiedene humane miRNAs bekannt (Lee et al., 1993, Kozomara et al., 2014). MiRNAs sind phylogenetisch hoch konserviert. So zeigen 60 % der miRNAs eine komplette Sequenzhomologie zwischen Maus und Mensch (Griffiths-Jones et al., 2008). Die meisten miRNAs existieren in einer Vielzahl von Klonen an verschiedenen Genloci (Lim et al., 2003). Ihr Transkript ist 100 Nukleotide bis mehrere Kilobasen groß. Die kernständige Ribonuklease (RNase) Drosha verkürzt die primäre (primary) miRNA (pri-miRNA) auf eine ca. 70 Nukleotide lange Vorläufer-(precursor) miRNA (pre-miRNA) in Haarnadel-Konfiguration, bevor sie mithilfe des Exportin-5-Transporters ins Zytoplasma überführt wird (Lee et al., 2003). Dort entsteht durch die RNase Dicer eine doppelsträngige RNA, die ca. 22 Nukleotide lang ist, deren Stränge jedoch unterschiedlich stabil sind (Hutvagner et al., 2001). Der stabilere Strang

besteht aus der späteren reifen miRNA. Der komplementäre sogenannte miRNA\*-Strang wird aufgrund seiner Instabilität schneller abgebaut (Schwarz et al., 2003).

MiRNAs kodieren nicht für Proteine, sondern sind an der posttranskriptionellen Genregulation in Eukaryonten beteiligt. Sie binden mit einer Kernregion von 7 Nukleotiden an die 3' untranslatierte Region ihrer Ziel-mRNA (messenger RNA, Boten-RNA). Damit unterdrücken sie die Translation oder führen zur Spaltung und Degradation dieser mRNA. Eine miRNA kann dabei eine einzige bis mehrere hundert mRNAs regulieren. Schätzungen zufolge sind mehr als 30 % der menschlichen Gene Ziel von miRNAs (Brennecke et al., 2005, Nilsen, 2007). Darüber hinaus spielen miRNAs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Stammzellen. Einige miRNAs sind zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten unterschiedlich stark exprimiert und variieren damit ihre Wirkung auf Zielgene. Dadurch können miRNAs regulatorisch in die Entwicklung eingreifen (Miska et al., 2004). Insbesondere im Gehirn von Säugetieren sind miRNAs maßgeblich an Neurogenese, neuronaler Differenzierung, Synapsenbildung und Hirnmorphogenese beteiligt (Chen et al., 2015). Die miRNA let-7 ist im sich entwickelnden Gehirn hoch exprimiert und beeinflusst die embryonale sowie die adulte Neurogenese (Rehfeld et al., 2015).

MiRNAs werden in Familien zusammengefasst. Die Mitglieder einer Familie ähneln sich vor allem in den Nukleotiden 2-8 am 5'-Ende, der Kernsequenz, mit welcher sie an ihr Zielmolekül binden. Am 3'-Ende unterscheiden sich die Mitglieder einer Familie nur durch wenige Nukleotide. Eine zusätzliche 3'-Paarung erhöht die Spezifität der miRNA-mRNA-Bindung und steigert ihre Funktionalität. Eine 3'-Paarung alleine hingegen ist für eine Bindung nicht ausreichend. Die hohe Sequenzhomologie der Familienmitglieder untereinander legt nahe, dass die miRNAs einer Familie redundante Funktionen erfüllen. (Brennecke et al., 2005).

MiRNAs liegen auch extrazellulär vor und können in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, wie zum Beispiel in Muttermilch, Plasma, Amnion- und Tränenflüssigkeit oder auch im Liquor. Die miRNA-Konzentrationen variieren dabei stark und reichen von unter 100 ng/l im zellfreien Liquor bis zu über 40 mg/l in der Muttermilch. Dabei können einzelne miRNAs in ausgewählten Körperflüssigkeiten angereichert sein (Weber et al., 2010).

### **2.2.1 Die Stabilität von miRNAs im Extrazellulärraum**

MiRNAs können in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelingt auch nach längerer Lagerung bei Raumtemperatur (RT) oder nach mehreren Zyklen von Einfrieren und Wiederauftauen (Mitchell et al., 2008). Generell ist RNA äußerst empfindlich gegenüber RNasen, die extrazellulär eine hohe Aktivität besitzen. Bei externer Zugabe von RNase in Körperflüssigkeiten bleibt die Konzentration der körpereigenen miRNAs jedoch stabil. Gibt man

RNase zu synthetischer miRNA, fällt deren Konzentration ab (Baraniskin et al., 2011). Im Gegensatz zu endogenen miRNAs sind synthetisch hergestellte miRNAs, die Plasma zugefügt werden, nach kürzester Zeit nicht mehr nachweisbar (Mitchell et al., 2008). Endogene miRNAs müssen also in einer Form vorliegen, die sie vor Abbau durch RNasen schützt.

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass miRNAs im Extrazellulärraum nicht nur frei, sondern auch gebunden vorliegen können. MiRNAs können Komplexe mit Lipoproteinen wie dem high-density-lipoprotein (HDL) bilden. HDL dient hier, wie auch bei überschüssigem Cholesterin, als Transporter (Vickers et al., 2011). Andere Autoren sehen in Proteinen wie Argonaute 2 (Ago2), einem RNA-Bindungs-Protein, den Hauptbindungspartner von miRNAs (Wang et al., 2010). MiRNAs können sich auch in extrazellulären Vesikeln befinden (Chen et al., 2012). Zu den extrazellulären Vesikeln zählen Exosomen, Mikrovesikel und Apoptosekörperchen. Mikrovesikel und Apoptosekörperchen unterscheiden sich von Exosomen sowohl durch ihre Größe als auch durch ihre Entstehung. Mikrovesikel sind 100 nm–1 µm groß und werden durch Ausknospung der Plasmamembran gebildet. Die 1 µm–5 µm messenden Apoptosekörperchen entstehen aus Blasen von untergehenden Zellen (Gyorgy et al., 2011). Exosomen besitzen eine Phospholipid-Doppelschicht und sind mit einem Durchmesser von 30–100 nm die kleinsten der extrazellulären Vesikel. Sie entstehen aus multivesikulären Körpern. Ihre Freisetzung aus der Zelle erfolgt durch Exozytose des multivesikulären späten Endosoms (Denzer et al., 2000). Auch von Zellen des Gehirns wie Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia werden Exosomen freigesetzt und können Hinweise auf krankhafte Veränderungen liefern (Kramer-Albers et al., 2007, Lachenal et al., 2011). So liegt bei AD das Aβ-Peptid exosomal gebunden vor (Rajendran et al., 2006). Valadi et al. zeigten im Jahr 2007 zum ersten Mal, dass Exosomen mRNA und miRNA enthalten. Diese exosomale RNA ist funktionsfähig und kann von einer anderen Zelle aufgenommen werden. Über Exosomen als Transportmittel kann miRNA also zwischen Zellen ausgetauscht werden. Damit dienen Exosomen dem horizontalen Austausch genetischer Information. Die miRNA ist dabei im Inneren des Exosoms lokalisiert und nicht außen gebunden. Die miRNA-Konzentration in den Exosomen muss nicht ihrer Konzentration in der Ursprungszelle entsprechen (Valadi et al., 2007). Exosomen kommen in vielen Körperflüssigkeiten vor und können auch im Liquor nachgewiesen werden (Street et al., 2012). Die RNA in Exosomen aus dem Liquor besteht zu über 50 % aus miRNA (Patz et al., 2013).

Ob miRNAs Bindungen mit Vesikeln oder Proteinen eingehen, könnte abhängig sein von der jeweiligen Ursprungszelle sowie dem Freisetzungsmechanismus (Chen et al., 2012).

MiRNAs eignen sich durch ihre extrazelluläre Stabilität und spezifische Freisetzung in Körperflüssigkeiten für eine Verwendung als Marker pathologischer Prozesse.

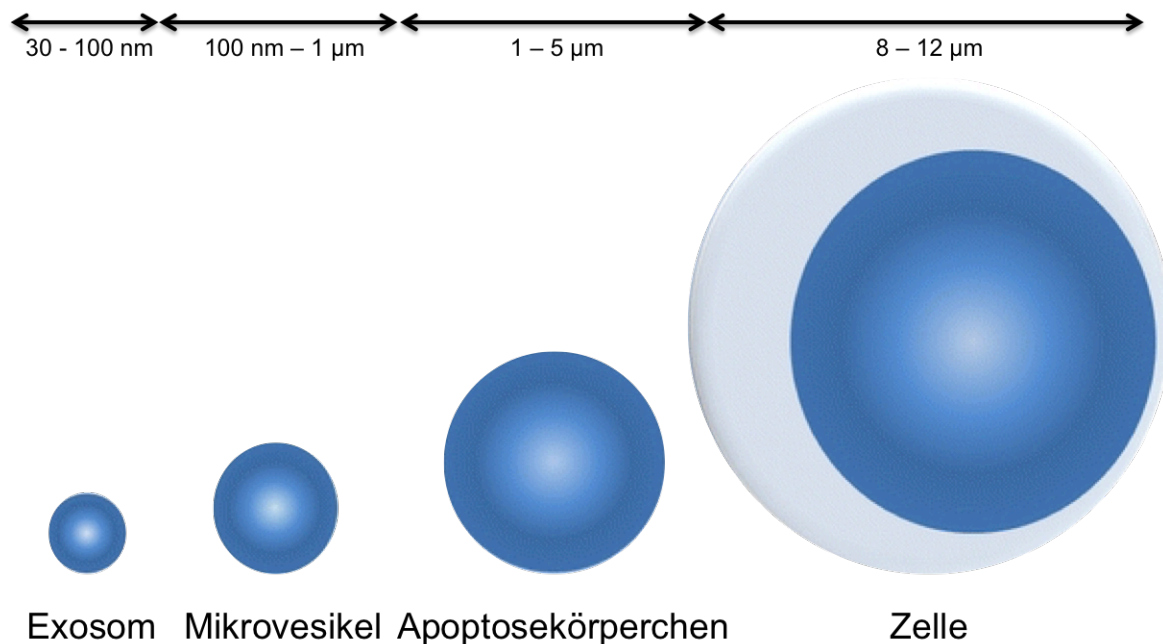


Abbildung 1: Größenordnung der Membranvesikel (modifiziert nach Gyorgy et al., 2011)

### 2.2.2 Die miRNA-Familie let-7

Die erste im Menschen entdeckte miRNA war let-7. Als eine der beiden ersten miRNAs überhaupt wurde let-7 in *C. elegans* gefunden (Reinhart et al., 2000). Auch *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) besitzt let-7-RNA. Let-7 ist zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert. Die Gesamtzahl an let-7-Genen unterscheidet sich allerdings zwischen den einzelnen Organismen: Der Mensch und die Maus besitzen 13 let-7 Gene, *D. melanogaster* hingegen nur eines. Im Menschen gibt es 8 verschiedene reife Sequenzen von let-7, die sich in einem bis vier Nukleotiden von der kanonischen let-7a unterscheiden (Kozomara et al., 2014). Die verschiedenen Mitglieder der Familie kennzeichnet ein nachgestellter Buchstabe (a, b, c, d, e, f, g, i). Zusätzlich werden diejenigen Mitglieder, die mehr als eine Vorläuferform haben, nummeriert. Es gibt 3 Vorläufersequenzen aus abgrenzbaren Genloci von let-7a: let-7a-1, let-7a-2 und let-7a-3; sowie zwei von let-7f: let-7f-1 und let-7f-2 (Ambros et al., 2003). Der let-7-Familie hoch verwandt sind die beiden miRNAs mir-98 und miR-202 (Ruby et al., 2006).

Der Name let-7 lässt sich auf die Entdeckung zurückführen, dass die Nullmutante in *C. elegans* letal ist. Let-7-miRNA ist, wie auch andere miRNAs, an der posttranskriptionellen Genregulation beteiligt. In *C. elegans* wird let-7-miRNA in späten Entwicklungsstufen exprimiert. Über Bindung an das heterochrone Gen LIN-41 reguliert es den späten Übergang vom Larven- in das adulte Stadium. In der Wurm-Nullmutante kann dieser Übergang nicht mehr vollzogen werden, und es kommt zum Tod (Reinhart et al., 2000). Auch in Säugetieren wird let-7-miRNA zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung unterschiedlich exprimiert. Zusätzlich wird let-7-miRNA selbst posttranskriptionell durch LIN28, ein RNA-bindendes Zinkfinger-Protein,

negativ reguliert (Newman et al., 2008). Die Expression von let-7-miRNA steigert sich in der embryonalen Entwicklung mit zunehmendem Differenzierungsgrad. Im sich entwickelnden Mausgehirn ist die let-7-Expression höher als später im adulten – insbesondere in der Hippocampus-Formation sowie in kortikalen Schichten. Let-7-miRNA ist also nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich reguliert. Bei der Maus sowie beim Menschen liegt let-7-miRNA in hoher Konzentration im Gehirn vor und ist insbesondere in Neuronen angereichert (Pasquinelli et al., 2000, Lagos-Quintana et al., 2002, Wulczyn et al., 2007).

Die Hauptfunktion der miRNA let-7 ist es, die Differenzierung von Zellen zu unterstützen. Fehlt let-7-miRNA, führt das zu übermäßiger Zellproliferation und unzureichender terminaler Differenzierung. So korrelierte in einer Studie von 2004 eine niedrige let-7-Expression bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom mit einem schlechteren postoperativen Ergebnis (Takamizawa et al., 2004). Zudem scheint let-7-miRNA ein Regulator von Onkogenen wie RAS und MYC zu sein und in dieser Funktion tumorsuppressiv zu wirken (Sampson et al., 2007, Chang et al., 2008).

Eine neue Wirkweise von let-7-miRNA wurde von Lehmann et al. entdeckt: Let-7-miRNA aktiviert den neuronalen Toll-like-Rezeptor 7 (TLR7) und induziert darüber als extrazelluläres Signalmolekül den Tod des Neurons. Die Bindung an den Rezeptor erfolgt über eine Guanosin-(G) und Uridin-(U) reiche Sequenz, die allen let-7-Familienmitgliedern gemein ist (siehe Abbildung 2). Das Motiv GUUGUGU in let-7b-miRNA ist bekannt als TLR7-bindendes Motiv, das erstmals in der einzelsträngigen RNA (single stranded RNA, ssRNA) 40 beschrieben wurde, einem mittlerweile etablierten Agonisten für TLR7 (Heil et al., 2004, Lehmann et al., 2012).

	5'		3'																			
hsa-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7b	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	G	G	U	U
hsa-let-7c	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	A	U	G	G	U	U
hsa-let-7d	A	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	C	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7e	U	G	A	G	G	U	G	G	U	A	G	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7f	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	A	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7g	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	U	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	A	C	A	G	U	U
hsa-let-7i	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	U	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	C	U	G	U	U
hsa-miR-98	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	A	<b>G</b>	<b>U</b>	<b>U</b>	<b>G</b>	<b>U</b>	A	U	U	G	U	U

**Abbildung 2: Die Sequenzen der let-7-Familie.** Hervorgehoben ist die GU-reiche Sequenz. Abweichungen von der GUUGUGU-Sequenz sind in grau dargestellt. (hsa: *homo sapiens*)



## 2.3 Toll-like Rezeptoren

TLR sind ein hoch konservierter Bestandteil des Immunsystems. Sie werden von Zellen des angeborenen Immunsystems und von Zellen des adaptiven Immunsystems sowie von Nicht-Immunzellen exprimiert und für die Immunabwehr genutzt. Die Abwehr erfolgt durch Erkennen von pathogen-assoziierten Mustern (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) – hoch konservierte Struktur motive von Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten. Damit zählen TLR zu den Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs). TLR sind Transmembranrezeptoren der Klasse 1 und erkennen PAMPs über ihre Ektodomäne, die aus einer Leucin-reichen Sequenz besteht. Über den zytosolischen Teil des Rezeptors, die TIR- (Toll/Interleukin-1 Rezeptor) Domäne, wird die weitere Signalkaskade durch Bindung des Adapter-Proteins MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*) aktiviert. Dies mündet letztendlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). Durch Bindung an DNA führt NF- $\kappa\text{B}$  zu einer verstärkten Transkription inflammatorischer Zytokine (Kawai et al., 2007).

Bis heute wurden im Menschen 10 TLR gefunden. Die TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 10 werden auf der Plasmamembran exprimiert. Sie erkennen in erster Linie Bestandteile von Pilzen und Bakterien. Im Gegensatz dazu sind TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert und binden einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren zum Beispiel aus Viren oder Bakterien (Kawai et al., 2007). Die einzelnen TLR erkennen dabei jeweils verschiedene Liganden und sind in der Zelle unterschiedlich lokalisiert. Außerdem unterscheiden sie sich durch ihr Auftreten in verschiedenen Zelltypen. TLR werden vor allem von Immunzellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen sowie T-Zellen, aber auch von Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert (Akira et al., 2006). Im ZNS exprimieren klassischerweise Mikroglia und Astrozyten TLRs, die als Antwort auf Infektionen, Gewebeverletzung oder Neurodegeneration inflammatorische Kaskaden in Gang setzen (Lehnardt et al., 2003). Aber auch Neurone und Oligodendrozyten exprimieren TLR. In Neuronen vorkommende TLR spielen eine Rolle nicht nur bei der Immunantwort, sondern auch bei der Entwicklung des embryonalen Gehirns. So werden TLR7 und TLR9 im sich entwickelnden Mausgehirn zeitabhängig exprimiert (Ma et al., 2006, Kaul et al., 2012).

TLR7 wird im ZNS von Mikroglia und Astrozyten, aber auch von Neuronen exprimiert (Lehmann et al., 2012). TLR7 ist im Endosom lokalisiert und wird dort durch synthetische Imidazoquinoline wie den Immunmodulator Imiquimod sowie virale und endogene ssRNA aktiviert. Die endosomale Lokalisation von TLR7 verhindert, dass unter physiologischen Bedingungen körpereigene RNA gebunden wird. Viren werden im Rahmen der Immunabwehr endozytotisch aufgenommen. Beim Abbau ihrer Bestandteile im Lysosom wird virale RNA in das

endo-/lysosomale Kompartiment freigesetzt. Dort kann die virale ssRNA von TLR7 gebunden werden (Kawai et al., 2007).

Eine Voraussetzung für das Erkennen der ssRNA durch TLR7 ist, dass sie einen hohen GU-Gehalt besitzt. Dieser Zusammenhang konnte zum ersten Mal anhand der GU-reichen ssRNA40 aus dem humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) gezeigt werden. SsRNA40 ist ein spezifischer TLR7-Ligand und führt nach Aktivierung des Rezeptors auf Immunzellen zu Interferon-(IFN)  $\alpha$ -Produktion (Hemmi et al., 2002, Heil et al., 2004). GU-reiche Motive kommen, wie bereits gezeigt, auch in menschlicher endogener RNA wie let-7 vor.

In Neuronen wird durch let-7b-miRNA nicht der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert. Zwar wird das Signal auch über MyD88-Aktivierung weitergeleitet; dies führt hier jedoch über Caspase-3 in die Apoptose, und TLR7 agiert in diesem Fall als Todesrezeptor (Lehmann et al., 2012).

## 2.4 MiRNAs und ZNS-Erkrankungen

Ihre extrazelluläre Stabilität und regulierte Freisetzung machen miRNAs zu interessanten Markern für Krankheitsprozesse. MiRNAs sind im Liquor nachweisbar und erlauben hier Rückschlüsse auf ZNS-Erkrankungen.

MiRNAs im Liquor wurden zuerst von Cogswell et al. im Jahr 2008 untersucht. Die Gruppe hat miRNA-Veränderungen *post mortem* in Gehirnen und Liquor von AD-Patienten im Vergleich zu einer altersgleichen Kontrollgruppe analysiert. Die Liquorproben wurden in Hinblick auf die Expression von 242 miRNAs untersucht. 201 miRNAs konnten nachgewiesen werden, 60 davon zeigten Unterschiede hinsichtlich ihrer Expression zwischen den Gruppen (Cogswell et al., 2008).

MiRNAs kontrollieren Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose. Let-7-miRNA zum Beispiel reguliert die Expression von Onkogenen (Johnson et al., 2005). Weitere miRNA-Liquor-Analysen erfolgten daher in Hinblick auf Neoplasien des ZNS. Es ist bekannt, dass miRNAs in Tumorzellen hochreguliert sein können und dann verstärkt in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Lu et al., 2005). Im Jahr 2011 untersuchten Baraniskin et al. miRNAs im Liquor von Patienten mit primärem B-Zell-Lymphom des ZNS. Sie fanden eine 97 %ige Diskriminationsfähigkeit zwischen Lymphom- und Kontrollproben und attestierten miRNAs einen großen diagnostischen Wert (Baraniskin et al., 2011). MiRNAs können an inflammatorischen Vorgängen beteiligt sein und sind daher auch in MS-Liquor analysiert worden. Hierbei waren miRNAs im Liquor nicht nur unterschiedlich zwischen der MS- und der Kontroll-Kohorte reguliert, sondern erlaubten auch eine Differenzierung verschiedener MS-Entitäten (Haghikia et al., 2012).

Grundlage bisheriger Studien zu miRNAs im Liquor ist meist ein Screening möglichst vieler miRNAs und miRNA-Familien. Lehmann et al. hingegen haben ausgehend vom zellulären Wirkmechanismus einer miRNA, let-7b, auf deren neurodegenerative Wirkung *in vivo* geschlossen. In einer Liquoranalyse kleiner Patientengruppen wiesen sie eine erhöhte Kopienzahl von let-7b-miRNA bei AD-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nach (Lehmann et al., 2012).

## 2.5 Arbeitshypothese und Fragestellung

In einer alternden Gesellschaft nehmen neurodegenerative Erkrankungen zu. Die korrekte Diagnose und Unterscheidung der einzelnen Krankheitsentitäten voneinander gelingt nicht immer sicher. Die Kenntnis weiterer Bausteine in Pathophysiologie und Diagnostik ist notwendig, um neurodegenerative Erkrankungen wie die AD in einem frühen Krankheitsstadium eindeutig zu diagnostizieren und von anderen neurologischen Erkrankungen wie FTD, MDE und CIS abzugrenzen.

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation unterschiedlicher biologischer Prozesse. Sie können in extrazellulären Flüssigkeiten nachgewiesen werden und sind der Untersuchung daher leicht zugänglich.

Die miRNA let-7b induziert in extrazellulärer Form über TLR7 neuronale Apoptose. Außerdem konnte gezeigt werden, dass let-7b-miRNA im Liquor von einzelnen AD-Patienten angereichert ist (Lehmann et al., 2012). Let-7b-miRNA wird von sterbenden Neuronen freigesetzt. Bindet die freigesetzte let-7b-miRNA an TLR7 des Nachbarneurons, stößt dies jeweils eine weitere Zelltodkaskade an. Es kommt zu weiterem neuronalem Zelluntergang und damit auch zu einer erneuten Freisetzung von let-7b-miRNA, die durch Aktivierung von TLR7 wiederum auf Nachbarneurone wirken kann (Lehmann et al., 2012). Über den TLR7-Signalweg kann let-7b-miRNA daher Neurodegeneration verursachen.

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen der verschiedenen let-7-miRNAs im Liquor von Patienten mit AD im Vergleich zu Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen und mit Gesunden zu analysieren. Außerdem sollte die potentielle Neurotoxizität der einzelnen let-7-miRNAs untersucht werden.

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Mitglieder der let-7-miRNA-Familie sind in humanem AD-Liquor nachweisbar? Aus Liquor sollte erst RNA isoliert werden und diese dann mittels quantitativer Echt-Zeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (*quantitative Real-Time Polymerase-Chain-Reaction*, qRT-PCR) untersucht werden.

2. Wie viele Kopien von let-7-miRNAs sind im Liquor von Patienten mit AD nachweisbar – insbesondere im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe sowie mit Patienten mit anderen ZNS-Erkrankungen mit kognitiver Beeinträchtigung wie FTD, MDE und CIS?
3. Sind let-7-miRNAs im Liquor von AD-Patienten stabil und können sie nach längerer Lagerung nachgewiesen werden?
4. Sind let-7-miRNAs im Liquor mit Exosomen assoziiert?
5. Haben die Mitglieder der let-7-Familie neurotoxische Eigenschaften? Neurotoxische Effekte sollten an primären Neuronen aus der Maus sowie einer murinen und einer humanen neuronalen Zelllinie *in vitro* evaluiert werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Studiendesign**

Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden eingehalten.

Sowohl die Versuche mit humanen Liquorproben als auch die Neurotoxizitätsversuche wurden verblindet durchgeführt und ausgewertet.

Alle Versuche wurden in den Laborräumen der Sicherheitsstufe 1 im Institut für Zell- und Neurobiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

### **3.2 Patientenproben**

#### **3.2.1 Humane Liquorproben**

Die humanen Liquorproben wurden von der lokalen und multizentrischen Kompetenznetz Demenzen Bank durch PD Dr. Oliver Peters (AD-, FTD-, MDE- und Kontrollproben) sowie der Klinik für Neurologie der Charité durch PD Dr. Klemens Ruprecht (CIS-Proben) zu Verfügung gestellt.

Durch Lumbalpunktion (LP) wurden genau 12 ml Liquor in ein Polypropylenbehältnis abgenommen. Der Liquor wurde unmittelbar nach Abnahme für 10 min bei 1.600 g zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen wie Erythrozyten sowie Zelldebris abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und aliquotiert (250 µl) und innerhalb von 30 min nach LP bei -80 °C gelagert. Die zentrifugierten CIS-Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt. Hämorrhagischer Liquor wurde vor weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Kontrollgruppe beinhaltete Proben von klinisch und laborchemisch gesunden Patienten mit subjektiven Gedächtnisstörungen ohne neurologische Diagnose. Die Diagnosen der Patienten mit AD, FTD, MDE mit kognitiven Defiziten und CIS wurden mit Hilfe neuropsychologischer Tests und biochemischer Analyse des Liquors nach aktuellen Leitlinien gestellt (Patientencharakteristika siehe Tabelle 1). Die Proben wurden nach dem Zufallsprinzip aus der Biobank ausgewählt. Die insgesamt 65 Liquorproben wurden mit Einwilligung der Patienten zur wissenschaftlichen Nutzung erhalten. Ein bewilligter Ethikantrag zur Nutzung der Liquorproben liegt vor (Kompetenznetz Demenzen, Abschnitt E1, 01GI0420 und EA1/182/10).

### 3.2.2 Humanes Hirngewebe

Humanes Hirngewebe wurde durch Prof. Dr. Rudolf Deisz (Institut für Zell- und Neurobiologie, Experimentelle Epileptologie, Charité) zur Verfügung gestellt. Die Probe stammte von einem Patienten (männlich, 47 Jahre) mit der Diagnose einer Temporallappenepilepsie mit Hippokampussklerose links. Das Gewebe wurde im Rahmen einer Balkendurchtrennung gewonnen.

**Tabelle 1: Patientencharakteristika.** Die Patienten sind nach Diagnosen geordnet und innerhalb einer Krankheitsgruppe durchnummeriert. Die Zahlenwerte sind für eine Gruppe zusammengefasst als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD). Geschlecht ist als w (weiblich) und m (männlich) angegeben; LP: Lumbalpunktion; MMSE: Mini-Mental State Examination; EDSS: Expanded Disability Status Scale; Kontrolle: nicht-demente Kontrolle; n.e.: nicht erhoben.

Patient	Diagnose	Geschlecht (w/m)	Alter (Jahre)	Zeit seit LP (Monate)	MMSE	EDSS	Total tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)
AD-1	AD	w	73	32	27		321	459
AD-2	AD	w	66	31	24		344	570
AD-3	AD	m	74	31	24		709	452
AD-4	AD	w	73	30	27		646	573
AD-5	AD	w	59	30	24		1277	522
AD-6	AD	w	54	28	24		368	396
AD-7	AD	m	80	7	17		465	501
AD-8	AD	w	70	7	12		535	673
AD-9	AD	w	76	7	16		566	530
AD-10	AD	w	78	6	22		297	364
AD-11	AD	w	71	5	21		1200	600
AD-12	AD	w	74	27	26		1200	559
AD-13	AD	w	70	27	25		479	406
AD-14	AD	m	67	18	17		375	479
AD-15	AD	w	67	13	23		1020	444
AD-16	AD	w	70	14	24		553	533
AD-17	AD	w	76	17	18		761	558
AD-18	AD	w	71	17	25		1200	319
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>		<b>15/3</b>	<b>70,5 <math>\pm</math> 6,4</b>	<b>19,3 <math>\pm</math> 10,2</b>	<b>22 <math>\pm</math> 4,3</b>	<b>n.e.</b>	<b>684,2 <math>\pm</math> 343,6</b>	<b>496,6 <math>\pm</math> 90</b>

Patient	Diagnose	Geschlecht (w/m)	Alter (Jahre)	Zeit seit LP (Monate)	MMSE	EDSS	Total tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)
AD-19	AD	m	71	52	18		837	362
AD-20	AD	m	50	101	22		416	229
AD-21	AD	m	70	101	23		490	391
AD-22	AD	w	77	115	23		350	421
AD-23	AD	m	75	135	26		150	566
AD-24	AD	w	67	75	24		1050	636
AD-25	AD	w	77	60	16		557	396
AD-26	AD	m	66	86	28		480	676
AD-27	AD	w	73	86	22		300	381
AD-28	AD	w	88	40	25		600	469
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>		<b>5/5</b>	<b>71,4 <math>\pm</math> 9,8</b>	<b>85,1 <math>\pm</math> 29,4</b>	<b>22,7 <math>\pm</math> 3,6</b>	<b>n.e.</b>	<b>523 <math>\pm</math> 261,7</b>	<b>452,7 <math>\pm</math> 136,6</b>
Ko-1	Kontrolle	m	50	17	27		152	1143
Ko-2	Kontrolle	w	79	16	30		463	614
Ko-3	Kontrolle	w	51	16	27		149	1267
Ko-4	Kontrolle	w	70	17	27		401	1571
Ko-5	Kontrolle	m	53	17	30		199	1153
Ko-6	Kontrolle	m	43	16	30		108	930
Ko-7	Kontrolle	m	63	10	29		275	1079
Ko-8	Kontrolle	m	51	9	29		189	962
Ko-9	Kontrolle	m	57	8	30		273	2144
Ko-10	Kontrolle	m	66	7	27		161	1117
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>		<b>3/7</b>	<b>58,3 <math>\pm</math> 11</b>	<b>13,3 <math>\pm</math> 4,2</b>	<b>28,6 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>n.e.</b>	<b>237 <math>\pm</math> 116,4</b>	<b>1198 <math>\pm</math> 412,7</b>
FTD-1	FTD	m	55	41	27		195	875
FTD-2	FTD	w	75	30	22		452	1222
FTD-3	FTD	w	69	29	nd		567	793
FTD-4	FTD	w	48	28	23		250	1271
FTD-5	FTD	m	61	21	27		493	1953
FTD-6	FTD	w	83	19	18		797	582
FTD-7	FTD	w	65	16	15		412	1088
FTD-8	FTD	m	56	10	30		279	2032
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>		<b>5/3</b>	<b>64 <math>\pm</math> 11,5</b>	<b>24,3 <math>\pm</math> 9,7</b>	<b>23,1 <math>\pm</math> 5,3</b>	<b>n.e.</b>	<b>430,6 <math>\pm</math> 195,5</b>	<b>1227 <math>\pm</math> 524,4</b>

Patient	Diagnose	Geschlecht (w/m)	Alter (Jahre)	Zeit seit LP (Monate)	MMSE	EDSS	Total tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)
D-1	MDE	w	84	7	25		659	645
D-2	MDE	m	51	8	23		132	867
D-3	MDE	w	60	8	28		361	1440
D-4	MDE	m	62	12	27		290	825
D-5	MDE	w	78	10	26		428	820
D-6	MDE	m	49	12	30		221	1067
D-7	MDE	w	48	13	26		106	716
D-8	MDE	w	64	15	13		254	1670
D-9	MDE	w	52	16	24		194	1067
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>		<b>6/3</b>	<b>60,9 <math>\pm</math> 12,9</b>	<b>11,2 <math>\pm</math> 3,2</b>	<b>24,7 <math>\pm</math> 4,8</b>	<b>n.e.</b>	<b>293,9 <math>\pm</math> 171,1</b>	<b>1013 <math>\pm</math> 342,3</b>
C-1	CIS	w	26	22		1,0		
C-2	CIS	w	41	24		0,0		
C-3	CIS	w	37	38		2,0		
C-4	CIS	w	59	nd		1,5		
C-5	CIS	w	25	40		2,0		
C-6	CIS	m	36	39		0,0		
C-7	CIS	w	48	34		2,0		
C-8	CIS	w	53	17		3,0		
C-9	CIS	w	37	26		1,5		
C-10	CIS	m	33	11		1,0		
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>		<b>8/2</b>	<b>39,5 <math>\pm</math> 11</b>	<b>27,9 <math>\pm</math> 10,4</b>	<b>n.e.</b>	<b>1,4 <math>\pm</math> 0,9</b>	<b>n.e.</b>	<b>n.e.</b>

### 3.3 Materialien

Es wurden ausschließlich Chemikalien mit analytischem Reinheitsgrad eingesetzt. Die verwendeten Chemikalien sowie ihre jeweiligen Hersteller sind im folgenden Abschnitt aufgelistet.

#### 3.3.1 Chemikalien/Reagenzien

0,05 % Trypsin-EDTA (1x)	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
40 % Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammonium Persulfat (APS)	US Biological, Salem, USA



Aqua dest.	Millipore 2, Billerico, USA
Cell disruption Puffer	Life Technologies, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
DNase I (1 mg/ml)	Roche, Basel, Schweiz
DNase I-Puffer	Roche, Basel, Schweiz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
Ethanol 100 %, reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Exosome Resuspension Buffer	Invitrogen by life technologies, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roth®, Karlsruhe
Hank's balanced salt solution (HBSS) (-Ca <sup>2+</sup> /-Mg <sup>2+</sup> )	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
HBSS (+Ca <sup>2+</sup> /+Mg <sup>2+</sup> )	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
Hyper Ladder I	Bioline, Luckenwalde
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
Luminol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Marker (Precision Plus Protein™ Standards)	Bio Rad, Hercules, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Neurobasalmedium	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
Normales Ziegen Serum (normal goat serum, NGS)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Nuklease-, RNase-freies, steriles Wasser	Qiagen, Hilden
Para-Formaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10.000 U bzw. 10 mg/ml)	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Basel, Schweiz
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
RNaseZap®	Ambion by life technologies, Carlsbad, USA
Rotiphorese 10x Tris-Acetat-EDTA-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Billerico, USA
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Triton X 100	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Trypanblau-Lösung 0,5 %	Biochrom AG, Berlin
Trypsin 2,5 %	Gibco, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

### 3.3.2 Medien und Puffer

10x Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS
10x Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> , PBS), pH 7,4	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Blockpuffer	5–10 % Milchpulver in PBS-T
DMEM für N1E-115- und SH-SY5Y-Zellen	Versetzt mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 10 % FCS</li> <li>– 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U bzw. 10 mg/ml)</li> </ul>
ECL- (enhanced chemiluminescence) Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Lösung A: 0,25 mg/ml Luminol in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6</li> <li>– Lösung B: 1,1 mg/ml p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO</li> <li>– H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> </ul>
Einfriermedium	DMEM + 10 % FCS, + 10 % DMSO
Natriumlaurylsulfat- (SDS) Ladepuffer	0,1 M Tris pH 6,8; 10 % Glycerin; 4 % SDS; 4 % β-ME; Bromphenolblau
Neurobasalmedium	Versetzt mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 2 % B27</li> <li>– Penicillin/Streptomycin (10.000 U bzw. 10 mg/ml)</li> </ul>
PBS-T	0,1 % Tween-20 in PBS
Phosphat-Puffer (PB), pH 7,4	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Ponceau-Lösung	0,2 % Ponceau S, 1 % Essigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris; pH 6,8
SDS-Lysepuffer	20 mM Tris; pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 % Triton; 2,5 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 1 µg/ml Leupeptin; 3 µg/ml Aprotinin; 1 mM Glycerolphosphat; 1 % SDS
Transferpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 10 % Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris; pH 8,8

### 3.3.3 Kommerzielle Kits

Cytofix/Cytoperm™ Kit	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
In situ cell death detection kit	Roche, Basel, Schweiz
– Label-Lösung	
– Enzym-Lösung	
mirVana™ Paris™ Kit	Ambion by life technologies, Carlsbad, USA
– 2x Denaturierungslösung	
– Waschpuffer 1	
– Waschpuffer 2/3	
– Acid-Phenol: Chloroform	
– Filtereinsatz	
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix, ohne AmpErase UNG	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
– 10x Reverse Transkription Puffer	
– MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 50 U/μl	
– Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), 100 mM	
– RNase Inhibitor, 20 U/μl	
Total Exosome Isolation Kit (from other body fluids)	Invitrogen by life technologies, Carlsbad, USA

### 3.3.4 Primer

RT-Primer (5x)	ID	Hersteller
let-7a	000377	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7b	000378	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7c	000379	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7d	002283	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7e	002406	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7f	000382	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7g	002282	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7i	002221	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-98	000577	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-24	000402	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-16	000391	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-124a	001182	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

qRT-PCR-Primer (20x)	ID	Hersteller
let-7a	000377	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7b	000378	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7c	000379	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7d	002283	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7e	002406	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7f	000382	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7g	002282	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
let-7i	002221	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-98	000577	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-24	000402	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-16	000391	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
mir-124a	001182	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

### 3.3.5 TLR-Liganden

Imiquimod	Invivogen, San Diego, USA
Lipopolysaccharid	Enzo, Farmingdale, USA

#### Synthetische Oligoribonukleotide

miRNA	Sequenz	Hersteller
Neg. Kontrolle	(PHOS)UGA GGU AGA AGG AUA UAA GGA U	Purimex, Grebenstein
let-7a	(PHOS)UGA GGU AGU AGG UUG UAU GGU U	Purimex, Grebenstein
let-7b	(PHOS)UGA GGU AGU AGG UUG UGU GGU U	Purimex, Grebenstein
let-7c	(PHOS)UGA GGU AGU AGG UUG UAU GGU U	Purimex, Grebenstein
let-7d	(PHOS)AGA GGU AGU AGG UUG CAU AGU U	Purimex, Grebenstein
let-7e	(PHOS)UGA GGU AGG AGG UUG UAU AGU U	Purimex, Grebenstein
let-7f	(PHOS)UGA GGU AGU AGA UUG UAU AGU U	Purimex, Grebenstein
let-7g	(PHOS)UGA GGU AGU AGU UUG UAG AGU U	Purimex, Grebenstein
let-7i	(PHOS)UGA GGU AGU AGU UUG UGC UGU U	Purimex, Grebenstein

### 3.3.6 Antikörper

#### Primäre Antikörper für Western Blot

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Flotillin-1 (250 µg/ml)	Maus, monoklonal	1:250	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Human-CD63 (0,5 mg/ml)	Maus, monoklonal	1:250	BD Biosciences, Heidelberg

#### Sekundärer Antikörper für Western Blot

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller
ECL-Anti-Maus-IgG	Schaf	1:5.000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

#### Primäre Antikörper für Immunzytochemie

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-NeuN (1 mg/ml)	Maus, monoklonal	1:1.000	Chemicon/Merck Millipore, Hercules, USA
Anti-Maus-Neurofilament (1 mg/ml)	Maus, monoklonal	1:1.000	MilliPore, Hercules, USA
Anti-Maus-MAP2 (1 mg/ml)	Kaninchen, polyklonal	1:1.000	MilliPore, Hercules, USA
Anti-Maus-GFAP (2,9 g/l)	Kaninchen, polyklonal	1:500	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-Iba1 (50 µg/1ml)	Kaninchen, monoklonal	1:1.000	Wako, Neuss

#### Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-Alexa 488 (2 mg/ml)	Ziege	1:500	Life technologies, Carlsbad, USA
Anti-Maus-Alexa 568 (2 mg/ml)	Ziege	1:500	Life technologies, Carlsbad, USA
Anti-Kaninchen-Alexa 488 (2 mg/ml)	Ziege	1:500	Life technologies, Carlsbad, USA
Anti-Kaninchen-Alexa 568 (2 mg/ml)	Ziege	1:500	Life technologies, Carlsbad, USA

Antikörper für Durchflusszytometrie

Name	Spezies	Hersteller
Anti-TLR7 Alexa 488 Antikörper	Maus IgG1	Imgenex, Littleton, USA

**3.3.7 Nukleinsäure-Anfärbung**

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)	1:10.000 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
--------------------------------------	---------------------------	---------------------------------

**3.3.8 Mäusestämme und Zelllinien**

C57BL/6J-Mäuse (Wild-Typ) stammten aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité. Die Mäuse wurden in den Tierställen der FEM in einer spezifischen pathogenfreien Umwelt gehalten. Zucht und Haltung befolgten die Richtlinien des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (Lageso). Die Tiertötung erfolgte nur zu wissenschaftlichem Zweck.

Die murine Neuroblastomzelllinie N1E-115 entstammt der American Type Culture Collection. Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wurde freundlicherweise von Dr. Markus Hoeltje, Charité – Universitätsmedizin Berlin, überlassen.

**3.3.9 Geräte**

7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Binokular GZ6	Leica microsystems, Mannheim
Elektrophorese Strom-Versorgung	Consort, Turnhout, Belgien
FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Fluoreszenzmikroskop BX51	Olympus, Hamburg
Heizblock	Grant-bio, Cambridgeshire, UK
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
ImageQuant LAS 4000mini	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Kamera IX70	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Lichtquelle KL1500 LCD	Zeiss, Jena
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Microprocessor pH-Meter	WTW, Weilheim
Milli-Q Wasser-Aufreinigung	Millipore, Billerica, USA
NanoPhotometer	Implen, München

Ofen	Heraeus Instruments, Hanau
Pico Fuge	Stratagene, La Jolla, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Power Pac 200	Bio Rad, Hercules, USA
Platten-Leser, Synergy HT	Bio-Tek, Vermont, USA
Präparier-Besteck	FST, Heidelberg
RT-Cycler	Biomol, Hamburg
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Step One Plus Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Sterilbank ANTARES 48	Steril S. P. A., Surbo, Italien
Sterilbank Laminar flow	Steag, Pfuhlingen
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio Rad, Hercules, USA
Ultraschallgerät Ultra-Turrax	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Varioklav Dampfsterilisator	H+P, Oberschleißheim
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen im Breisgau
Waage CP225D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad E160	Lauda, Königshofen
Zellinkubator	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg

### 3.3.10 Sonstige Materialien und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, rund	Carl Roth, Karlsruhe
Immobilon® PVDF-Transfer-Membran	Millipore, Billerica, USA
Immu-Mount	Thermo Scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ Optisch-adhäsive Folie	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
MicroAmp™ qRT-PCR-Reaktions-Platten	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Objektträger (Menzel-Gläser)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen, gestopft, bis 1ml	Sanstedt, Nümbrech
Protein® Blotpapier	Bio Rad, Hercules, USA
Reaktionsgefäße ab 2 ml	Falcon/BD, Heidelberg
Reaktionsgefäße bis 2 ml	Eppendorf, Hamburg
RT-Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten	Falcon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Falcon/BD, Heidelberg
Zellkulturplatte, 24-well	Corning incorporated, Corning, USA

### 3.3.11 Software

7500 Fast Software v2.0.6	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Step One Plus Software v2.2.1	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
FlowJo v9.5.2	FlowJo LLC, Ashland, USA

Die Daten wurden ausgewertet und dargestellt durch Adobe Illustrator CS3 für Windows, San Jose Kalifornien, USA; GraphPad Prism 5.01 für Windows, San Diego Kalifornien, USA; Photoshop CS3 für Windows, San Jose Kalifornien, USA, sowie Microsoft Excel und Word.

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 Zellkultur

Die folgenden Arbeiten fanden unter der Sterilbank mit laminärem Luftzug statt. Alle Instrumente wurden autoklaviert oder heißluftsterilisiert und vor Gebrauch mit Ethanol desinfiziert. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in einer 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

#### 3.4.1.1 Anfertigung primärer Neuronenkulturen

Die Deckgläschen für die Fixierung der Zellen in der Immunzytochemie wurden vor der Benutzung 30 min lang in 100 % Ethanol geschüttelt und anschließend für mindestens 4 Stunden bei 200 °C gebacken. Nach Platzierung in 24-well Platten wurden sie für die Beschichtung mit 1 mg/ml PDL (1:49 verdünnt mit Aqua dest.) für mindestens 2 h inkubiert. Vor Benutzung wurden die Wells dreimal mit sterilem PBS gewaschen.

Primäre Neuronenkulturen wurden aus 17 Tage alten Embryos aus C57BL/6J-E17-Mäusen präpariert. Das Muttertier wurde durch einen Genickbruch getötet, die Embryos nach medianer Laparatomie entnommen und dekapitiert. Die abgetrennten Köpfe wurden in eine Petrischale mit HBSS (-Ca<sup>2+</sup>/-Mg<sup>2+</sup>) überführt. Unter dem Binokular wurden die Cortices mit Pinzetten entnommen, von den Hirnhäuten befreit und danach in einem Falcon-Gefäß auf Eis gekühlt. Die Kortexhälften wurden zweimal mit HBSS (-Ca<sup>2+</sup>/-Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Der Puffer wurde bis auf 2,5 ml abgenommen. 500 µl 2,5 %iges Trypsin wurden hinzugegeben und wirkte unter gelegentlichem Schwenken im 37 °C warmen Wasserbad für 20 min. Im Anschluss wurde das Trypsin mit 3 ml fetalem Kälberserum neutralisiert. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit HBSS (+Ca<sup>2+</sup>/+Mg<sup>2+</sup>); beim letzten Waschgang wurden 2 ml im Falcon belassen und 100 µl DNase I (c<sub>end</sub>=1 mg/ml) für 30 sec hinzugegeben. Die Zellen wurden zweimal mit Neurobasalmedium gewaschen und dann mit einer Pipette vorsichtig in 2 ml Neurobasalmedium



dissoziiert. Das Zell-Medium-Gemisch wurde in ein 50 ml-Falcon überführt und in 10 ml Medium resuspendiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 g und 4 °C für 5 min. Nach Überführen des Überstandes in ein neues Falcon wurde dieses ein zweites Mal bei 1.200 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und  $5 \times 10^3$  Zellen/500  $\mu$ l in einem 24er-well ausplattiert.

Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Mediums durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt.

Die Reinheit der Kulturen wurde durch Immundoppelfärbungen von Neuronen und Astrozyten beziehungsweise Neuronen und Mikroglia überprüft. Dafür wurden die Kulturen am Differenzierungstag drei fixiert und mit Anti-GFAP für Astrozyten und Anti-Iba1 für Mikroglia sowie NeuN für Neurone angefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

#### **3.4.1.2 Kultivierung von N1E-115- und SH-SY5Y-Zellen**

Nach zügigem Auftauen wurden die Zellen in 20 ml DMEM gelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der noch Gefriermedium enthaltende Überstand verworfen und die Zellen erneut in DMEM resuspendiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen überführt. Ungefähr alle sieben Tage (bei ungefähr 80 % Zellrasen) wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 geteilt und mit frischem Medium versetzt. SH-SY5Y-Zellen wurden von der Zellkulturflasche durch Trypsinisierung abgelöst.

#### **3.4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Nach Zentrifugation wurde das erhaltene Zellpellet tropfenweise in frischem 4 °C kaltem Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) gelöst und je 1 ml (10.000.000 Zellen) in ebenfalls auf 4 °C vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in Isopropanol kontrolliert mit 1 °C/min bis auf -80 °C heruntergekühlt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen unter Schwenken im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde auf 37 °C vorgewärmtes Medium (RPMI und 10 % FCS) tröpfchenweise hinzugefügt. Die Zellen wurden dann vorsichtig in 5 ml des warmen Mediums resuspendiert und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml frischem Medium vorsichtig resuspendiert. Abschließend wurde die Zellzahl mit Trypanblau bestimmt.

#### **3.4.1.4 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung, welche tote Zellen markiert, in einer Neubauer-Zählkammer erfasst. Hierfür wurden 10  $\mu$ l Zellsuspension im Verhältnis 1:4 mit

0,5 %iger Trypanblaulösung gemischt. 10 µl dieses Gemisches wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben; dort wurde in den 4 großen äußeren Quadranten die Zahl der ungefärbten (lebenden) Zellen ermittelt. Die gesamte Zellzahl konnte hieraus folgendermaßen ermittelt werden:  $\text{Zellzahl/ml} = (\text{gezählte Zellen}/4) \times \text{Verdünnungsfaktor} (4) \times 10^4$ .

Im Anschluss wurden die Zellen auf eine Standardkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml verdünnt.

### 3.4.1.5 Stimulation von Neuronen

Die Stimulation der primären Neuronenkulturen wurde am Differenzierungstag drei durchgeführt. Die Zellen wurden mikroskopisch auf Dichte und Vitalität hin begutachtet. Vor Stimulation erfolgte ein halber Mediumwechsel und Reduktion des Mediums auf 400 µl. N1E-Zellen und SH-SY5Y-Zellen wurden in einer 24-well-Zellkulturplatte mit jeweils 8.000 Zellen in 500 µl/Well ausplattiert. 24 h nach dem Ausplattieren und nach halbem Mediumwechsel wurden sie stimuliert. Für jede Kondition wurden zwei unabhängige Wells stimuliert. Die Neurone wurden für 4 Tage mit 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml der jeweiligen miRNA (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i und Negativkontrolle) oder für 12 h, 48 h, 4 Tage und 6 Tage mit 10 µg/ml der jeweiligen miRNA inkubiert. Die Zellen wurden bis zum Ende der Stimulationszeit im Inkubator belassen. Imiquimod (10 µg/ml) wurde als Positivkontrolle für TLR7-vermittelten Zelltod und LPS (100 ng/ml) als Negativkontrolle für TLR4-vermittelten Zelltod eingesetzt.

Für die nachfolgende immunzytochemische Analyse wurden die Zellen zu den angegebenen Zeiten dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA für 20 min fixiert.

## 3.4.2 Immunzytochemie

### 3.4.2.1 Anfärbung von Neuronenkulturen

Zur Permeabilisierung der mit PFA fixierten Zellen und Blockierung unspezifischer Bindungen wurden 175 µl Blockpuffer (1x PBS mit 0,1 % Triton X 100 und 2 % NGS) in jedes Well gegeben. Darin wurden auch die jeweiligen primären Antikörper gelöst und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde abgedunkelt bei RT mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 0,1 % Triton X 100 und 2 % NGS in PBS gelöst. Bevor die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen wurden, wurden sie für 1 min mit DAPI (1:10.000 H<sub>2</sub>O), einem Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA, gefärbt. Abschließend wurden die Deckgläser mit Immu-Mount auf den Objektträgern fixiert.

### 3.4.2.2 Apoptosefärbung

Die TUNEL- (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) Färbung ist eine enzymatische Methode zur Quantifizierung von apoptotischem Zelltod. Bei der Apoptose wird genomische DNA gespalten. Dabei entstehen doppelsträngig niedrig-molekulare DNA-Fragmente sowie einzelsträngige DNA mit hohem Molekulargewicht. Diese DNA-Brüche können durch die terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) markiert werden. TdT katalysiert die Polymerisation von markierten Nukleotiden am freien 3'-OH-Ende der DNA (Negoescu et al., 1998).

Die Apoptosefärbung wurde mit dem In-Situ-Cell-Detection-Kit (Roche) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach der oben beschriebenen Fixierung durch PFA wurden die Zellen mit einer frisch angesetzten Permeabilisierungslösung, bestehend aus 1x PBS mit 0,1 % Triton X 100 und 0,1 % Natriumcitrat, für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 10 min mit DNase behandelt und dann zweimal mit PBS gewaschen. In einer feuchten Kammer wurden auf jedes Glasplättchen 10 µl TUNEL-Lösung gegeben, welche 9 µl Label-Lösung, 0,1 µl Enzym-Lösung und 0,9 µl PBS enthielt. Die Negativkontrolle wurde ausschließlich mit der Label-Lösung behandelt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und standen für weitere Antikörper-Färbungen zur Verfügung. Nach der Apoptosefärbung wurden die Zellen immunzytochemisch weiterbehandelt.

### 3.4.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzfärbungen wurden an einem Olympus BX51-Mikroskop ausgewertet. Mit einer IX70-Olympus-Kamera und der Software Magnafire (Optronics) wurden die gefärbten Kulturen fotografiert.

Unter dem Mikroskop wurden in 6-12 repräsentativen Feldern des Deckglases NeuN-positive Zellen mäanderförmig in x60-Vergrößerung ausgezählt. Bei TUNEL-Färbungen wurden 12 Felder ausgewählt, um den größeren Zellzahlschwankungen der apoptotischen Zellen innerhalb eines Deckgläschens gerecht zu werden. Die Auszählung erfolgte verblindet.

In der Auswertung der NeuN+-Zellen wurden die Werte der Negativkontrolle gleich 100 % gesetzt und die Werte der übrigen Konditionen darauf bezogen. In der Auswertung der TUNEL+-Zellen wurde das Verhältnis TUNEL-positiver zu NeuN-positiven Zellen ermittelt und für die Negativkontrolle gleich 1 gesetzt; die übrigen Konditionen wurden darauf bezogen.

### **3.4.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.4.3.1 Herstellung von Zellysat aus Hirngewebe**

Die Arbeiten fanden auf Trockeneis statt. Alle Arbeitsgeräte wurden vorher gebacken, um RNasen zu eliminieren, und vor der Verwendung vorgekühlt. Das Hirngewebe (ca. 5,4 mg) wurde unter Zugabe von Flüssigstickstoff fein gemörsert, in das 7-fache Volumen eiskalten Cell-disruption-Puffer (life technologies) überführt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend konnte das Lysat zur RNA-Isolation weiter prozessiert werden.

#### **3.4.3.2 Exosomen-Isolation**

Exosomen wurden mit dem Total-Exosome-Kit (Invitrogen by life technologies) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Das Wirkprinzip des Kits beruht auf der Bildung von Bindungen zwischen den Wassermolekülen mittels Dynabeads. Dadurch werden weniger lösliche Komponenten aus der wässrigen Lösung verdrängt. Diese Komponenten, wie beispielsweise Exosomen, lassen sich nach Zentrifugation gewinnen.

Im Detail wurden die Exosomen für eine anschließende RNA-Isolation oder Analyse mittels Western Blot in der folgenden Weise bearbeitet: 200 µl Liquor (für nachfolgende RNA-Isolation) oder 400 µl Liquor (für anschließende Analyse mittels Western Blot) wurden als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die auf Eis aufgetauten Liquorproben wurden zuerst bei 10000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit dem Exosomen-Isolationpuffer gemischt. Im Anschluss daran wurde das Homogenat für 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend für 1 h bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den darin befindlichen Exosomen resuspendiert – für die RNA-Isolation in 200 µl PBS und für die Protein-Isolation in 25 µl eiskaltem Exosome-Resuspension-Buffer. Die Proben wurden zur vollständigen Lösung des Pellets jeweils für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.3.3 RNA-Präparation**

MiRNA wurde mit dem mirVana-Paris-Kit (Ambion by life technologies) nach Anleitung des Herstellers für ‚Total‘ RNA isoliert. Arbeitsflächen und Instrumente wurden mit RNaseZap® (Ambion by life technologies) dekontaminiert. Es wurden sterile, autoklavierte Einmalprodukte benutzt. 400 µl der auf Eis aufgetauten Liquorproben wurden mit dem gleichen Volumen (400 µl) 2x-Denaturierungslösung bei RT versetzt und durch Invertieren gemischt. Diesem Gemisch wurde das äquivalente Volumen (800 µl) Acid-Phenol:Chloroform zugegeben und anschließend für 45 sec durch Vortexen gründlich gemischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei

12.000 g und RT konnte die obere wässrige, RNA-enhaltende Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Den hierbei erhaltenen 650 µl wurde das 1,25-fache Volumen (812,5 µl) 100 %igen Ethanols hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Diese Lösung wurde auf die Filterkartuschen gegeben und für 30 sec bei 9.000 g zentrifugiert. Die Filter enthalten Glasfasern, die RNA immobilisieren. Der Durchfluss wurde verworfen. Der Filter wurde nun einmal mit 700 µl Waschpuffer 1 gewaschen und für 15 sec bei 9.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Dann wurde der Filter zweimal mit 500 µl Waschpuffer 2/3 gewaschen und jeweils für 15 sec bei 9.000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses folgte eine einminütige Trocken-Zentrifugation. Im Anschluss wurde der Filter in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 100 µl 95 °C warmem RNase-freiem Wasser eluiert. Nach einer Zentrifugation für 30 sec bei 9.000 g konnte das RNA-enhaltende Eluat gewonnen werden.

#### 3.4.3.4 Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

RNA-Konzentration und Reinheit wurden durch die Messung der optischen Dichte (OD) mittels eines Spektrometers bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Das Photometer sendet Licht durch eine Quarzküvette, in der sich die Probe befindet, und misst deren Absorption. H<sub>2</sub>O dient dabei als Referenz. Die Konzentration wird anhand des Lambert-Beerschen-Gesetzes ermittelt. Nukleinsäuren erreichen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bildet man den Quotienten aus  $OD_{260}/OD_{280}$ , sollte dieser für eine reine RNA-Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### 3.4.3.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Reverse Transkription wurde mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Um miRNA in cDNA umzuschreiben, war für jede miRNA ein spezifischer Primer erforderlich. Da miRNAs nur 22 Nukleotide lang sind, mussten sie vor der Umschreibung verlängert werden. Dafür verfügte der Primer über eine Schleifensequenz, die die Spezifität und Effizienz der Transkription erhöht.

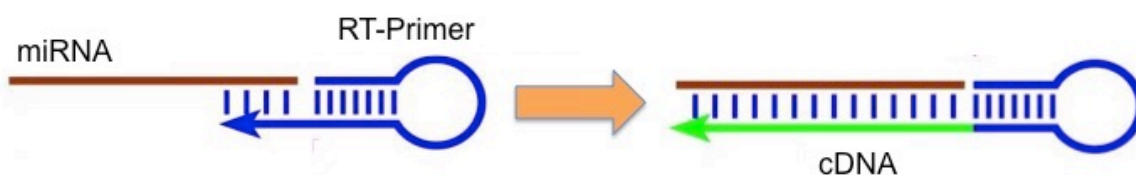


Abbildung 3: cDNA-Synthese von miRNA durch RT-Primer mit Schleifensequenz. Modifiziert nach (Chen et al., 2005).

Für jeden Ansatz wurden 40 ng RNA oder bei zu geringer RNA-Konzentration der Probe 30 ng RNA zur Reversen Transkription eingesetzt. Wegen geringer RNA-Konzentrationen in der Gruppe der CIS-Patienten und in den Proben, aus denen Exosomen isoliert wurden, wurden hier 5 µl RNA verwendet.

Der Ansatz wurde folgendermaßen zusammengestellt:

RNA in H <sub>2</sub> O gelöst	5 µl
Reverse Transkription Puffer (10x)	1,5 µl
Nuklease-freies Wasser	4,16 µl
dNTPs	0,15 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1 µl
RNase-Inhibitor	0,19 µl
Spezifischer miRNA-Primer (5x)	3 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Für die Reverse Transkription wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur
1	30 min	16 °C
2	30 min	42 °C
3	5 min	85 °C
4	∞	4 °C

#### 3.4.3.6 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Zur Amplifikation der cDNA wurde der TaqMan-Mastermix (Applied Biosystems) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Der Mastermix enthält die AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, dNTPs, ROX™ als passive Referenz sowie Puffer-Substanzen. Nach dem Pipettieren wurde die PCR-Reaktions-Platte mit einer optisch adhäsiven Folie überzogen. Jede Probe wurde als Triplikat untersucht. Die Messung der Patienten- und Kontrollproben erfolgte an einem 7500-Real-Time-PCR-System-Gerät. Die Quantifizierungen wurden an einem Step-One-Plus-Gerät durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der dazugehörigen Software.

Wenn bei einem Triplikat mehr als einer von drei Messwerten einen CT-Wert > 40 aufzeigte oder die Werte um mehr als einen CT-Wert auseinanderlagen, wurde die miRNA in dieser Probe als nicht nachweisbar bezeichnet und der mittlere CT-Wert gleich 40 gesetzt.

Folgender Ansatz wurde zusammengestellt:

cDNA	1,33 $\mu$ l
TaqMan Universal MasterMix (2x)	10 $\mu$ l
Spezifischer TaqMan Primer	1 $\mu$ l
RNase freies H <sub>2</sub> O	7,67 $\mu$ l
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l

Für die qRT-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1	10 min	95 °C	1
2	15 sec 60 sec	95 °C 60 °C	40

### 3.4.3.7 Berechnung einer Standard-Reihe

Synthetische let-7-miRNAs lagen zunächst lyophilisiert vor. Die Stocklösung (0,4  $\mu$ g/ml) wurde durch Hinzufügen von H<sub>2</sub>O hergestellt. Der erste Standard-Wert hatte eine Konzentration von 32,8 pM (Kroh et al., 2010). Das entspricht  $197,28 \cdot 10^5$  N/ $\mu$ l. Für die Standardreihe wurde die Stocklösung zunächst dreimal im Verhältnis von 1:100 verdünnt. Für einen 100  $\mu$ l Ansatz ist folgende Berechnung notwendig:  $x \square$  Molarität der Lösung [pM] = 100  $\mu$ l \* 32,76 pM

Die Standard-Konzentrationsreihe wurde im Verhältnis von 1:3 verdünnt.

Standard 1	$197,28 \cdot 10^5$ N/ $\mu$ l
Standard 2	$65,762 \cdot 10^5$ N/ $\mu$ l
Standard 3	$21,9206 \cdot 10^5$ N/ $\mu$ l
Standard 4	$73,0685 \cdot 10^4$ N/ $\mu$ l
Standard 5	$24,3561 \cdot 10^4$ N/ $\mu$ l
Standard 6	$81,187 \cdot 10^3$ N/ $\mu$ l
Standard 7	$27,062 \cdot 10^3$ N/ $\mu$ l
Standard 8	9020,8 N/ $\mu$ l
Standard 9	3006,93 N/ $\mu$ l
Standard 10	1002,31 N/ $\mu$ l
Standard 11	334,1 N/ $\mu$ l
Standard 12	111,37 N/ $\mu$ l
Standard 13	37,12 N/ $\mu$ l
Standard 14	12,37 N/ $\mu$ l
Standard 15	H <sub>2</sub> O

### 3.4.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe der Amplikons in der qRT-PCR wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Es wurde ein 3 %iges Agarosegel verwendet, welches sich wie folgt zusammensetzt: 4,5 g Agarose gelöst in 141 ml TAE-Puffer. Diese Mischung wurde auf 100 °C erhitzt. Nach vorsichtigem Abkühlen auf 50 °C wurden 15 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wurde zum Festwerden in eine Kammer gegeben und danach zusammen mit 0,5x TAE-Puffer in eine Laufkammer überführt. Neben den qRT-PCR-Produkten wurde auch ein Größenmarker in eine Tasche des Gels gegeben. Es wurde eine Spannung von 40 V für 1 h angelegt. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert.

### 3.4.3.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde mit SY5Y-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden unter Verwendung des BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit dem Anti-TLR7-Antikörper Alexa 488 (Imgenex) gefärbt. Dabei diente ein Alexa 488-konjugierter Isotyp als Negativkontrolle. Die Durchflusszytometrie wurde an einem BD FACSCanto II durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo Version 9.5.2.

## 3.4.4 Proteinbiochemische Techniken

### 3.4.4.1 Proteinextraktion

Alle Arbeitsschritte fanden auf Eis statt. Kurz vor Gebrauch wurden dem SDS-Lysepuffer 10 mM PSMF (in Isopropanol gelöst) im Verhältnis von 1:10 hinzugefügt. Nach Abnahme des Mediums von den Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen; anschließend wurden 200 µl PSMF-SDS-Lysepuffer auf jedes Well gegeben. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Unterstützung der Lysewirkung des Puffers folgte eine Ultraschallbehandlung für 3 sec. Die Zellen wurden 30 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 10 min lang bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das Protein befand, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Die Zellysate aus murinen Neuronenkulturen wurden im Western Blot als Positivkontrollen eingesetzt. Die Protein-Konzentrationsmessung der Proben wurde an einem Plattenreader Synergy HT gemessen. Dafür wurde eine Kalibrierreihe mit BCA, gelöst in PSMF-SDS-Puffer, angesetzt. Die in der Lösung enthaltenen zweiwertigen Kupferionen werden dabei



durch das Protein zu einwertigem Kupfer reduziert. Diese Reaktion bewirkt einen violetten Farbumschwung, der bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann.

#### 3.4.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der Methode nach Lämmli denaturiert SDS die Proteine und unterbindet die Ausbildung von Quartärstrukturen. In der Elektrophorese wandern die Proteine dann im elektrischen Feld zum Plus-Pol und werden dabei im Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mit einem 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel sowie einem vorangehenden Sammelgel, welche sich folgendermaßen zusammensetzten:

	Sammelgel	Trenngel
H <sub>2</sub> O	4,5 ml	6,9 ml
Trenngelpuffer	--	4,0 ml
Sammelgelpuffer	1,9 ml	--
40 % Acrylamid	810 µl	4,8 ml
10 % SDS	75 µl	160 µl
APS	57 µl	80 µl
TEMED	19 µl	32 µl

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,25 Volumen Ladepuffer für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurden der Marker und die Proben-Ladepuffer-Mischung auf das Gel aufgetragen. Bei einer Stromstärke von 15 mA/Gel wurden die Proben ungefähr 2 Stunden lang elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 10 µl des Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards (Bio Rad) eingesetzt.

#### 3.4.4.3 Proteintransfer

Das Gel und das Blotpapier wurden in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF- (Polyvinylidendifluorid) Membran wurde zuerst in Methanol zum Quellen gebracht, dann in Aqua dest. gewaschen und anschließend ebenfalls in Transferpuffer überführt. Der Proteintransfer wurde bei einer konstanten Spannung von 15 V für 60 min in einem halbtrockenen System durchgeführt, die Stromstärke betrug dabei 0,1–0,4 mA. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran für 10 min mit Ponceau-Lösung inkubiert, um die Proteinbanden unspezifisch anzufärben.

#### 3.4.4.4 Immunfärbung

Die nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritte fanden alle auf einem Schüttler statt. Nach dem Blotten wurde die Membran für 15 min in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für 1 h bei RT in 10 %iger Milchlösung geblockt und anschließend dreimal für je 15 min mit PBS-T gewaschen. Das hinzugegebene Tween-20 verhinderte als Detergens zusätzlich unspezifische Bindungen. Der erste Antikörper wurde in 2 ml PBS-T gelöst und mit der Membran in Folie eingeschweißt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag erneut dreimal für je 15 min mit PBS-T gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der zweite Antikörper wurde in 10 ml PBS-T gelöst, für 1 h bei RT auf der Membran belassen und anschließend dreimal für je 15 min mit PBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper war an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Diese katalysiert die Oxidation von Luminol aus der ECL-Lösung, was zu einer Chemolumineszenz-Reaktion führte. Die Chemolumineszenz wurde in einem ImageQuant LAS 400 gemessen, wobei die Lumineszenz der ECL-Lösung (1 ml Lösung A, 100 µl Lösung B, 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) auf der Membran für 10 min gemessen wurde. Die Markerbanden wurden im Anschluss abphotographiert. In der Bildbearbeitung in Photoshop CS3 wurden die beiden erhaltenen Bilder der Chemolumineszenz-Reaktion und der Markerbanden übereinander gelegt, sodass die Proteinbanden mit den Markerbanden verglichen werden konnten. So wurde die Größe des detektierten Proteins bestimmt.

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Graphpad Prism Version 5.01 für Windows ausgeführt.

Die unterschiedliche Expression von let-7-miRNAs im Liquor von Patienten mit AD, FTD und Depression jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde mithilfe des ungepaarten Student's t-test analysiert und auf Signifikanz hin getestet. Die Untersuchung hinsichtlich signifikanter Unterschiede von miRNA-Expression in Exosomenfraktion und Überstand erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Multiple comparison post hoc Test. Statistische Unterschiede sämtlicher Konditionen *in vitro* wurden ebenfalls mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Multiple comparison post hoc Test untersucht.

Die verwendeten Tests werden in den jeweiligen Abbildungslegenden genannt. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen definiert: \*/#, wenn  $P \leq 0.05$ , \*\*/##, wenn  $P \leq 0.01$ , und \*\*\*/###, wenn  $P \leq 0.001$ .

## 4 Ergebnisse

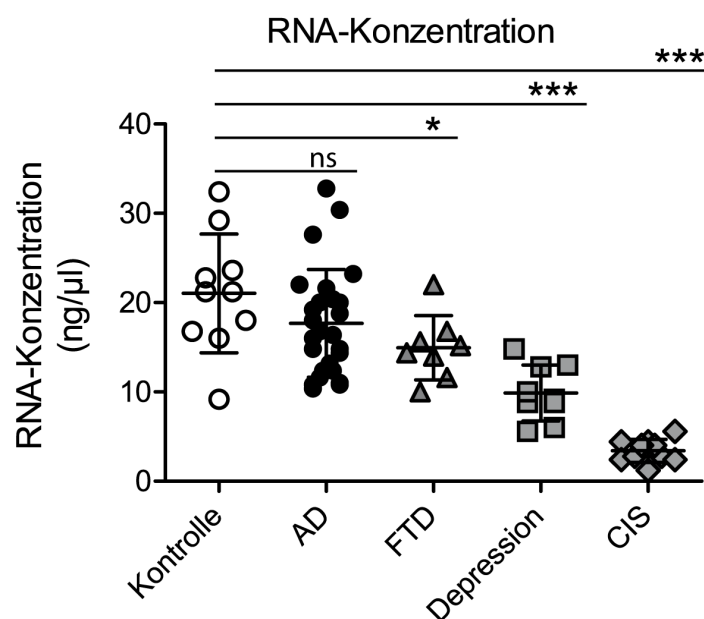
Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Vorkommen von Mitgliedern der let-7-miRNA-Familie in humanem Liquor analysiert (4.1). Im zweiten Abschnitt wurden ausgewählte Mitglieder der let-7-miRNA-Familie *in vitro* auf eine potentiell neurotoxische Wirkung hin untersucht (4.2).

### 4.1 Untersuchung der let-7-miRNAs in humanem Liquor

Die im Folgenden durchgeführten Analysen an menschlichem Gehirn und Liquor basieren auf dem Einsatz der qRT-PCR. Die Gesamt-RNA wurde zuerst aus Liquor beziehungsweise Gehirn isoliert, dann in cDNA umgeschrieben und schließlich mittels qRT-PCR quantifiziert.

#### 4.1.1 Die let-7-miRNA- Familie im Liquor von Patienten mit AD

Nach Isolation der Gesamt-RNA aus dem Liquor wurde der Gesamt-RNA-Gehalt jeder Probe gemessen. Die mittlere RNA-Konzentrationen lagen bei 21,2 ng/ $\mu$ g in der Kontrollgruppe und 17,4 ng/ $\mu$ g in der AD-Gruppe und unterschieden sich in einer t-test-Analyse nicht signifikant zwischen diesen beiden Gruppen (Abbildung 4). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war die RNA-Konzentration isoliert aus dem Liquor von Patienten mit FTD (ca. 15 ng/ $\mu$ g), Depression (ca. 10 ng/ $\mu$ g) und CIS (ca. 6,7 ng/ $\mu$ g) signifikant geringer.



**Abbildung 4: Die Gesamt-RNA-Konzentrationen in Kontroll- und AD-Gruppe zeigen keinen signifikanten Unterschied.** Gesamt-RNA wurde aus Liquor von Patienten mit AD und gesunden Kontrollen isoliert und spektrophotometrisch quantifiziert. Resultate sind dargestellt als Einzelwerte sowie MW  $\pm$  SD. Es wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. ns = nicht signifikant; AD: n = 26; Kontrolle: n = 10; FTD: n = 8; Depression: n = 10; CIS: n = 10.

Anschließend sollte untersucht werden, ob die let-7-miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i sowie die verwandte miR-98 im Liquor von AD- und Kontrollpatienten nachgewiesen werden können. Aufgrund unterschiedlicher RNA-Konzentrationen in den Proben wurde in diesem sowie in folgenden Versuchen eine einheitliche RNA-Menge von jeweils 30–40 ng RNA zur Reversen-Transkription eingesetzt.

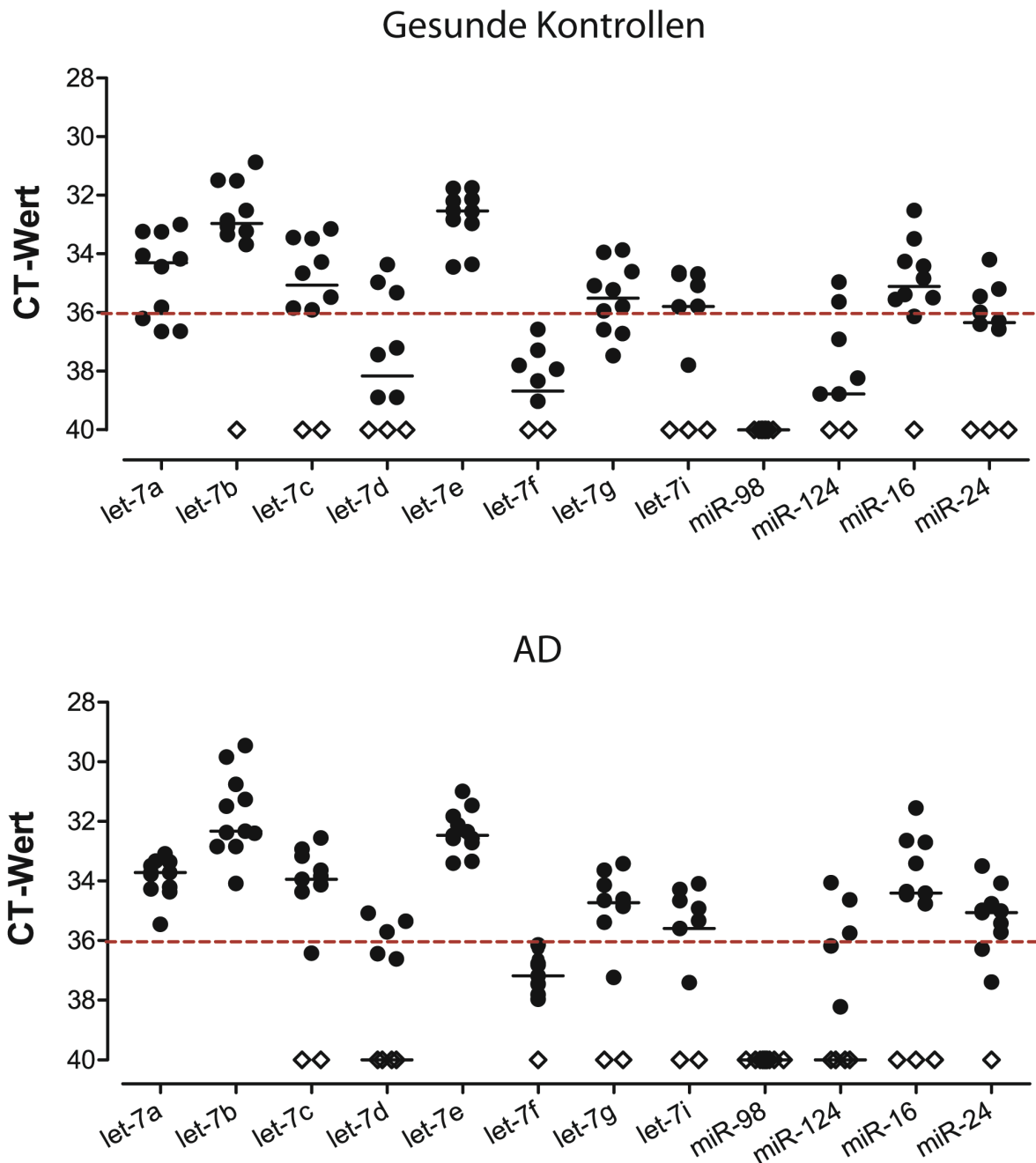
In der Kontrollgruppe, bestehend aus 10 verschiedenen Patientenproben, wie auch in der Alzheimergruppe, bestehend aus 11 verschiedenen Patientenproben, konnten die oben genannten miRNAs mittels qRT-PCR folgendermaßen nachgewiesen werden (Abbildung 5): je niedriger der CT-Wert, desto höher ist die Konzentration der jeweiligen miRNA. Niedrige Median-CT- (mCT) Werte wiesen let-7a (Kontrolle 34,3; AD 33,71), let-7b (Kontrolle 32,96; AD 32,33) und let-7e (Kontrolle 32,53; AD 32,46) auf. In beiden Gruppen imponierten bei einem Großteil der Proben der miRNAs let-7c (Kontrolle mCT 35,06; AD mCT 33,94), let-7g- (Kontrolle mCT 35,51; AD mCT 34,72) und let-7i (Kontrolle mCT 35,79; AD mCT 35,59) zwar ebenfalls niedrige CT-Werte; einzelne Proben dieser miRNAs lagen aber knapp unter bzw. außerhalb der Nachweisgrenze (definiert als CT-Wert  $\geq 40$ ). Ab einem CT-Wert von 36 konnte eine Zunahme der Streuung innerhalb eines Triplikats beobachtet werden, weshalb eine zuverlässige Nachweisgrenze bei CT 36 festgelegt wurde. In der AD- und in der Kontrollgruppe lagen let-7d (Kontrolle 38,16; AD 40), let-7f (Kontrolle 38,68; AD 37,2) und miR-98 (Kontrolle 40,0; AD 40,0) bei einem mCT von größer 36 oder waren, wie miR-98, in keiner Probe nachweisbar. In der Alzheimer-Gruppe ließ sich let-7f-miRNA in 9 von 10 Liquores detektieren, in der Kontrollgruppe nur in 5 von 9.

Zusätzlich wurde miR-124 als die im Hirngewebe am stärksten exprimierte miRNA untersucht (Lagos-Quintana et al., 2002, Miska et al., 2004, Wulczyn et al., 2007). Sie lag im Median mit mCT 40 (AD) und 38,77 (Kontrolle) deutlich über einem CT-Wert von 36 und war in 5 von 11 der AD- und 4 von 10 der Kontroll-Liquores nicht nachzuweisen.

Außerdem wurde das Vorkommen von miR-16 und miR-24 im Liquor mittels qRT-PCR analysiert, zwei miRNAs, die bereits als Housekeeping-miRNAs beschrieben und als Referenz-miRNAs zur Normalisierung von qRT-PCR-Daten genutzt wurden (Pigati et al., 2010, Baraniskin et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden, da miR-16 und miR-24 zum einen insgesamt in nicht ausreichend hoher Konzentration vorhanden (in der Kontrollgruppe: miR-16 mCT 35,1 und miR-24 mCT 36,34, in der AD-Gruppe miR-16 mCT 34,41 und miR-24 mCT 35,06) und zum anderen nicht zuverlässig in jeder Probe nachweisbar waren. Außerdem zeigte sich ein Trend zu höheren Konzentrationen in der AD-Gruppe. Die Ergebnisse wurden im Folgenden daher nicht normalisiert, sondern als rohe CT-Werte dargestellt. Aus diesem Grund sind in der folgenden Darstellung nur Vergleiche der

miRNAs innerhalb einer Patientenprobe beziehungsweise innerhalb einer Patientengruppe möglich, nicht jedoch der Vergleich einer einzelnen miRNA zwischen der AD- und der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die let-7-miRNAs let-7a-, let-7b- und let-7e-miRNA sowie in geringerer Kopienzahl let-7c, let-7g und let-7i in humanem Liquor von Patienten mit AD sowie einer Kontrollgruppe in der qRT-PCR detektiert wurden. Let-7d-, let-7f- und mir-98-miRNA ließen sich in diesem Versuch nicht bzw. nicht zuverlässig nachweisen.



**Abbildung 5:** Alle getesteten let-7-miRNAs sind im Liquor von AD-Patienten sowie von gesunden Kontrollindividuen nachweisbar. Liquores wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, miR-98, miR-124, miR-16 oder miR-24 untersucht. Resultate sind dargestellt als Kreis, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Liquorprobe entspricht, sowie als Median für jede

miRNA. Leere Vierecke stellen Messungen dar, die außerhalb der Nachweisgrenze lagen und deren CT-Wert gleich 40 gesetzt wurde. AD: n = 11; Kontrolle: n = 10.

#### 4.1.1.1 Expression der let-7-miRNA-Familie im humanen Gehirn

Let-7-miRNA gilt verglichen mit anderen miRNAs als besonders stark im Gehirn exprimiert (Lagos-Quintana et al., 2002). Im folgenden Versuch sollte die Expression der let-7-miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g und miR-98 in menschlichem Hirngewebe geprüft werden.

Die Gesamt-miRNA wurde aus Zelllysat des Corpus Callosum isoliert. Mittels qRT-PCR wurden die miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i und die verwandte miR-98 sowie die im Gehirn stark exprimierte miR-124 untersucht. MiR-16 und miR-24 wurden in Hinblick auf ihre mögliche Funktion als Housekeeping-miRNAs ebenfalls getestet.

Jede dieser zwölf miRNAs ließ sich mittels qRT-PCR im Hirngewebe zuverlässig nachweisen (Tabelle 2). Die CT-Werte reichten von CT 18,1 für let-7e bis zu CT 24,8 für miR-98, lagen also im Gehirn in deutlich höherer Kopienzahl als im zellfreien Liquor vor (siehe Abbildung 4).

miRNA	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e	let-7f	let-7g	let-7i	miR-98	miR-124a	miR-16	miR-24
CT	20,0	19,8	21,3	21,7	18,1	23,8	21,9	21,6	24,8	21,2	19,4	21,0

**Tabelle 2: Das Vorkommen der let-7-miRNAs im menschlichen Gehirn.** Es wurden 30 ng RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. MW aus Triplikate; n = 1.

#### 4.1.2 Die miRNAs let-7b und let-7e sind in AD-Liquor quantitativ erhöht

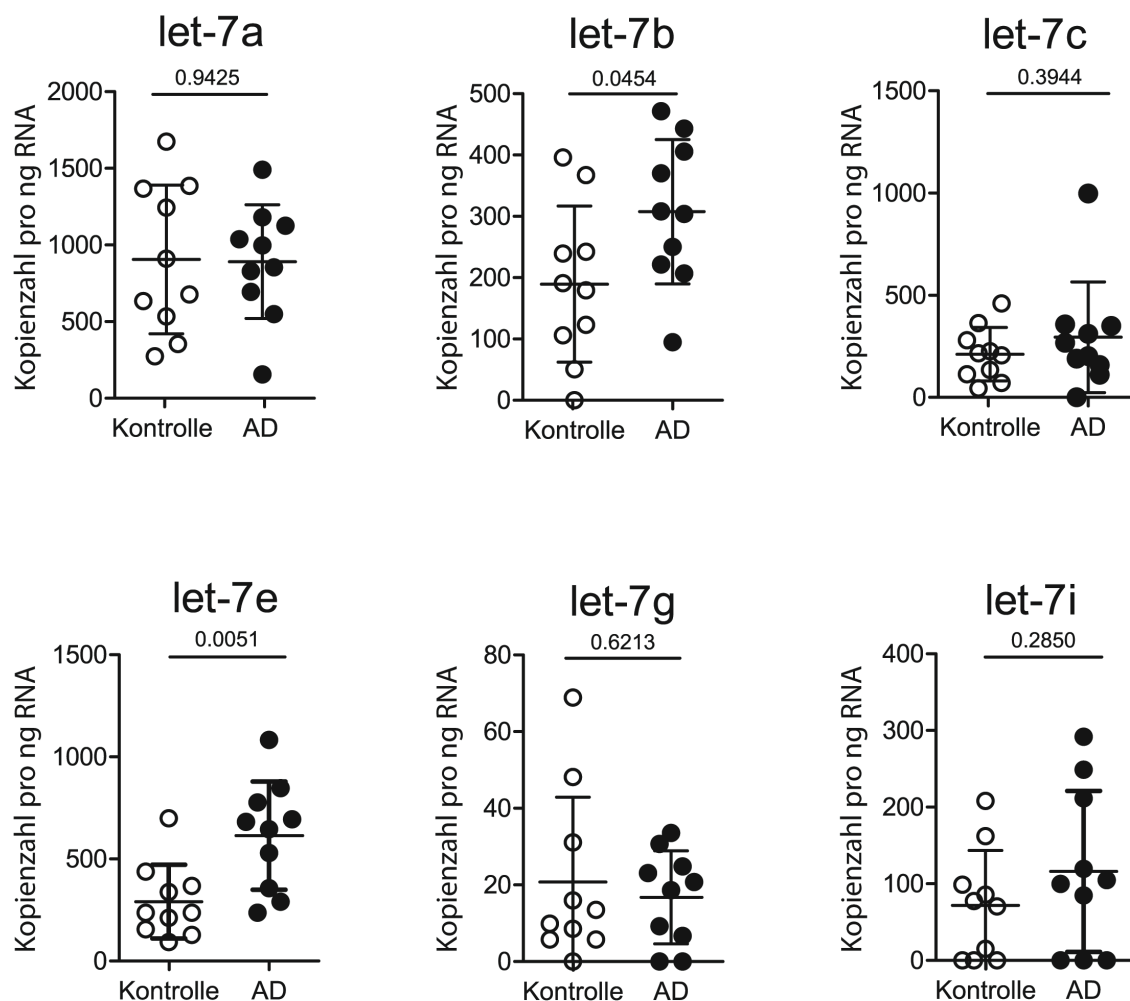
Die im vorigen Versuchsteil im Liquor untersuchten miRNAs wurden mit Hilfe einer Standardkurve absolut quantifiziert (Abbildung 6). Für die Quantifizierung wurden diejenigen Mitglieder der let-7-Familie ausgewählt, deren CT-Werte in der vorangegangenen Übersichtsmessung im Median unter 36 lagen und damit eine zuverlässige Detektion erlaubten: let-7a, let-7b, let-7c, let-7e, let-7g und let-7i.

Mit synthetisch hergestellten let-7-miRNAs der genannten let-7-Familien-Mitglieder wurde eine Standardreihe, deren exakte miRNA-Konzentration bekannt war, angesetzt. Für die Untersuchung einer miRNA wurden die Proben aus der AD- und aus der Kontrollgruppe zusammen mit der Standardkonzentration auf einer qRT-PCR-Platte gemessen, was es möglich machte, den CT-Wert auf die genaue Kopienzahl pro Nanogramm eingesetzter RNA umzurechnen.

Es imponierte eine signifikante Erhöhung der Kopienzahl von let-7b-miRNA in der AD-Gruppe gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ( $P = 0,0454$ ). In noch höherem Maße zeigten sich Unterschiede zwischen Liquorproben von AD-Patienten und Kontrollindividuen hinsichtlich der Expression der miRNA let-7e, nämlich eine erhöhte Kopienzahl in der AD-

Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $P = 0,0051$ ). Die übrigen miRNAs, let-7a, let-7c, let-7g und let-7i, wiesen weder signifikante Veränderungen noch Tendenzen hinsichtlich ihrer Expression zwischen beiden Gruppen auf.

Die Kopienzahlen der miRNAs let-7b und let-7e waren im Liquor von AD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei den miRNAs let-7a, let-7c, let-7g und let-7i bestanden keine Unterschiede hinsichtlich der Expression zwischen den Gruppen.



**Abbildung 6: Let-7b und let-7e Kopien sind im AD-Liquor erhöht.** Liquores wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7a, let-7b, let-7c, let-7e, let-7g oder let-7i untersucht und auf die Standardkurve der jeweiligen synthetischen miRNA normalisiert. Resultate sind dargestellt als Kreis, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Liquorprobe entspricht, sowie als  $MW \pm SD$  für die jeweilige Patientengruppe. Zwischen Kontrolle und AD wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Kopienanzahl pro ng eingesetzte RNA;  $n = 10$  in beiden Gruppen.

#### 4.1.3 Nachweis ausgewählter let-7-miRNAs im Liquor von FTD, MDE und CIS

Nachdem sich eine selektiv erhöhte Expression von let-7b- und let-7e-miRNA im AD-Liquor zeigte, sollten neben den AD-Liquores Liquores von Patienten mit weiteren ZNS-Erkrankungen analysiert werden. Es wurden Liquores von Patienten mit FTD, der zweithäufigsten Demenzerkrankung, mit Depression mit kognitiven Einschränkungen als möglicher

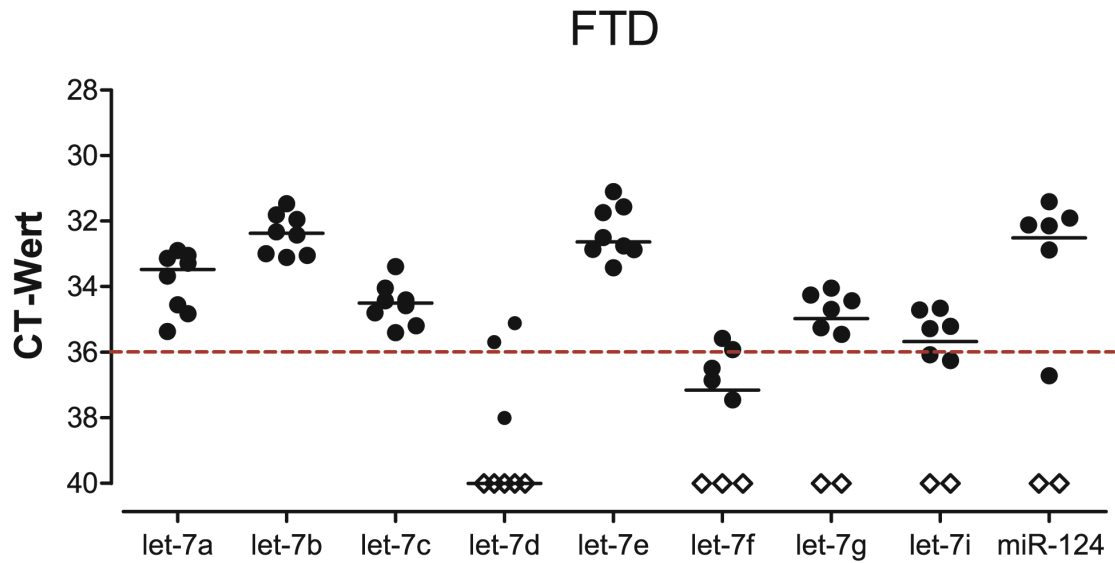
Prodromalmanifestation der AD sowie mit CIS, der Erstmanifestation einer möglichen MS, als typischer, primär neuroinflammatorischer Erkrankung ausgewählt.

Nachfolgend wurde die Expression von let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g und let-7i mit qRT-PCR untersucht. Die hochverwandte miR-98 wurde nicht untersucht, da miR-98 zuvor weder in den Liquores der AD- noch in denen der Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte.

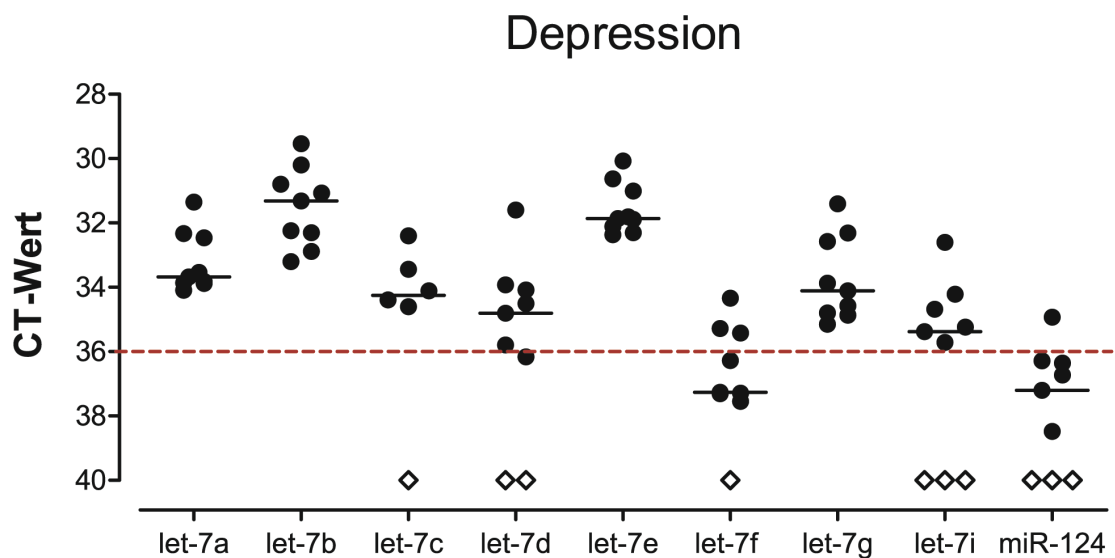
Die Expression aller zu analysierenden miRNAs wurde aus dem Liquor jeweils eines Patienten auf einer qRT-PCR-Platte gemessen. Wie schon in der Kontroll- und der AD-Gruppe waren auch in den Liquores der genannten weiteren ZNS-Erkrankungen die miRNAs let-7b und let-7e am stärksten exprimiert. Der mCT von let-7e-miRNA lag in allen Gruppen um CT 32 (FTD: mCT 32,63, MDE: mCT 31,86, CIS: mCT 32,1). Let-7b-miRNA war bei FTD (mCT 32,37) und MDE (mCT 31,32) die am stärksten exprimierte miRNA (siehe Abbildung 7 bis Abbildung 9). Nur in den CIS-Liquores war let-7b-miRNA bei einem mCT-Wert von 33,46 relativ – verglichen mit let-7e (mCT 32,1) – geringer exprimiert (siehe Abbildung 7). In der FTD-Gruppe war let-7d-miRNA nur in 3 von 8 Liquores nachweisbar, let-7i-miRNA nur in 2 von 10 in der CIS-Kohorte. Hingegen wurden die miRNAs let-7d (mCT 34,81) in der MDE-Gruppe mit durchschnittlich niedrigerem CT-Werten und miR-124 (mCT 32,51) in der FTD-Gruppe in mehr Patientenproben als in den anderen Gruppen detektiert.

Alle untersuchten miRNAs konnten im Liquor von Patienten mit FTD, Depression und CIS nachgewiesen werden. Die mCT-Werte von let-7f-miRNA lagen im Liquor aller drei Erkrankungen und von let-7d im Liquor von Patienten mit FTD über 36 und damit außerhalb der definierten zuverlässigen Nachweisgrenze. Das Expressionsmuster der let-7-miRNAs unterschied sich für jede der untersuchten Erkrankungen.

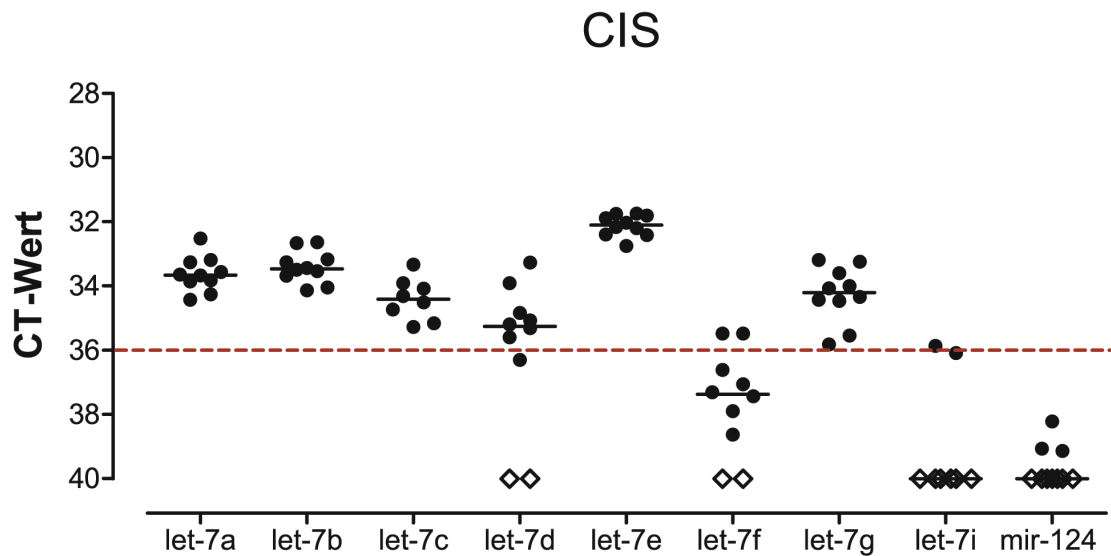




**Abbildung 7: Let-7-miRNAs sind im Liquor von FTD-Patienten nachweisbar.** Liquores wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i und miR-124 untersucht. Resultate sind dargestellt als Kreis, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Liquorprobe entspricht, sowie als Median für jede miRNA. Leere Vierecke stellen Messungen dar, die außerhalb der Nachweisgrenze lagen und deren CT-Wert gleich 40 gesetzt wurde. n = 8.



**Abbildung 8: Let-7-miRNAs sind im Liquor von Patienten mit Depression nachweisbar.** Liquores wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i und miR-124 untersucht. Resultate sind dargestellt als Kreis, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Liquorprobe entspricht, sowie als Median für jede miRNA. Leere Vierecke stellen Messungen dar, die außerhalb der Nachweisgrenze lagen und deren CT-Wert gleich 40 gesetzt wurde. n = 9.



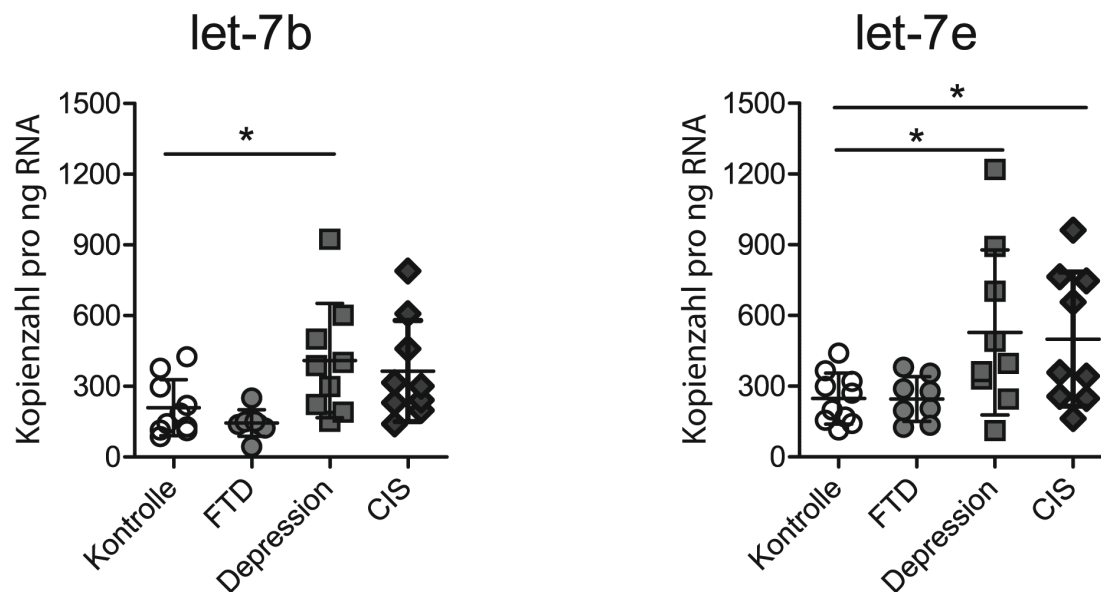
**Abbildung 9: Let-7-miRNAs sind im Liquor von CIS-Patienten nachweisbar.** Liquores wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i und miR-124 untersucht. Resultate sind dargestellt als Kreis, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Liquorprobe entspricht, sowie als Median für jede miRNA. Leere Vierecke stellen Messungen dar, die außerhalb der Nachweisgrenze lagen und deren CT-Wert gleich 40 gesetzt wurde.  $n = 10$ .

#### 4.1.4 Quantifizierung der miRNAs let-7b und let-7e bei FTD, MDE und CIS

Die miRNAs let-7b und let-7e wiesen in allen getesteten Patientengruppen den jeweils niedrigsten CT-Wert auf, was bedeutet, dass von ihnen die meisten Kopien im Liquor nachgewiesen werden konnten. Das Vorkommen von let-7b- und let-7e-miRNA in der AD-Gruppe war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe auch Abbildung 6). Daher sollten diese beiden miRNAs zum Vergleich auch in den Liquores der FTD-, MDE- und CIS-Patienten quantifiziert werden. Die absolute Kopienzahl wurde mit Hilfe einer Standardreihe mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei imponierten in der Depressionsgruppe signifikant höhere Kopienzahlen von let-7b-miRNA als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,03$ ). Die Analyse der CIS-Proben ergab einen Trend in Richtung höherer let-7b-Kopienzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe, war aber nicht signifikant ( $P = 0,06$ ). Die Kopienzahl von let-7e-miRNA war trotz großer Streuung bei Depression und CIS verglichen mit den Kontrollproben signifikant erhöht ( $P = 0,0274$  und  $P = 0,0185$ ). Die CT-Werte der FTD-Proben wiesen im Vergleich zu Depression und CIS eine geringe Streuung auf, die Kopienzahl von let-7b miRNA lag dabei im Median (145,2 Kopien/ng RNA) geringfügig unter der Kopienzahl der Kontrollgruppe (Median: 164,9 Kopien/ng RNA) und die Kopienzahl von let-7e-miRNA auf gleichem Expressionsniveau wie in der Kontrollgruppe.

In den Liquores von Patienten mit Depression waren sowohl die Expression der miRNA let-7b als auch let-7e im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Kopienzahl von let-

7e-miRNA war außerdem in den CIS-Liquores signifikant erhöht. Im Liquor von FTD-Patienten unterschieden sich die Kopienzahlen sowohl von let-7b- als auch let-7e-miRNAs nicht von denen der Kontrollgruppe.



**Abbildung 10: Let-7b-miRNA weist eine signifikant höhere Kopienanzahl in Liquores von Patienten mit Depression auf und let-7e-miRNA in Liquores von Patienten mit Depression und CIS, jeweils verglichen zur Kontrollgruppe.** Liquores wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7b und let-7e untersucht und auf die Standardkurve der jeweiligen synthetischen miRNA normalisiert. Resultate sind dargestellt als Kreis bzw. Viereck, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Liquorprobe entspricht, sowie als MW  $\pm$  SD für die jeweilige Patientengruppe. Zwischen Kontrollgruppe und jeweiliger Patientengruppe wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt mit  $*P < 0,05$ . Kopienanzahl pro ng eingesetzte RNA. n = 8–10.

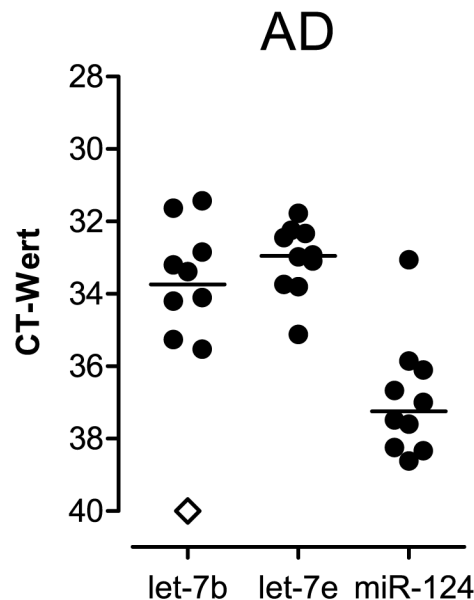
#### 4.1.5 Stabilität von miRNAs im humanen Liquor

MiRNAs in Körperflüssigkeiten gelten als äußerst stabil und resistent gegenüber Nukleasen (Baraniskin et al., 2011, Machida et al., 2013). Diese Eigenschaft macht miRNAs besonders attraktiv für eine Verwendung als Marker biologischer Prozesse. Ob auch die let-7-miRNA-Familie im Liquor diese Stabilität besitzt, ist bisher nicht untersucht worden. Im folgenden Versuch sollte daher überprüft werden, ob ausgewählte let-7-miRNAs in AD-Liquores über längere Zeit stabil und mittels qRT-PCR nachweisbar bleiben.

Die Liquores wurden, genau wie die bisher untersuchten Proben, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Abstand zwischen Lumbalpunktion und RNA-Isolation war mit  $85,1 \pm 29,2$  Monaten um mehr als das Vierfache größer verglichen mit  $19,3 \pm 10,2$  Monaten bei den zuvor getesteten AD-Proben (MW  $\pm$  SD). Mittels qRT-PCR wurden exemplarisch die beiden am stärksten im Liquor vertretenen Mitglieder der let-7-miRNA-Familie, let-7b und let-7e, sowie die im Hirngewebe stark exprimierte miR-124 untersucht. Jede dieser drei miRNAs war in den über lange Zeit gelagerten Liquores nachweisbar, wenn auch mit leicht höheren CT-Werten als bei den Proben

mit kürzerer Lagerungsdauer: let-7b-miRNA mit mCT 33,74, let-7e-miRNA mit mCT 32,95 und miR-124 mit mCT 37,24 (siehe Abbildung 11 und zum Vergleich Abbildung 5).

Somit sind die miRNAs let-7b und let-7e über einen langen Zeitraum im Liquor stabil. Diese Eigenschaft ist wichtig für eine mögliche klinische Anwendung als Biomarker.

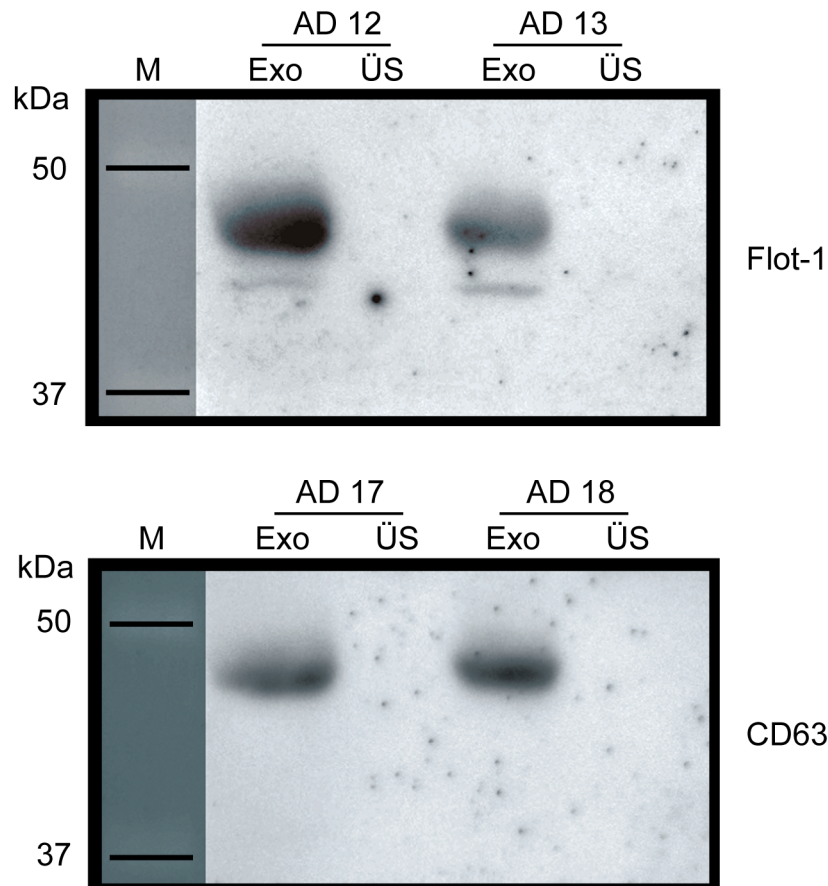


**Abbildung 11: Let-7b- und let-7e-miRNAs sind auch nach langer Lagerung im Liquor von AD-Patienten nachweisbar.** Liquores wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7b, let-7e und miR-124 untersucht. Resultate sind dargestellt als Kreis, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Liquorprobe entspricht, sowie als Median für jede miRNA. Leere Vierecke stellen Messungen dar, die außerhalb der Nachweisgrenze lagen und deren CT-Wert gleich 40 gesetzt wurde. n = 10.

#### 4.1.6 Exosomen lassen sich aus AD-Liquor isolieren

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass let-7b- und let-7e-miRNAs selbst nach mehrjähriger Lagerung noch sicher im Liquor nachweisbar sind. Ein Mechanismus zum Schutz vor extrazellulärem Abbau ist die Bindung an membranöse Vesikel wie Mikrovesikel, Apoptose-Körperchen oder Exosomen (Chen et al., 2012). Um zu untersuchen, ob auch let-7-miRNAs im Liquor an Vesikel gebunden sind, wurden Exosomen aus AD-Liquor isoliert. Bei der Isolation ergeben sich zwei Fraktionen: ein Exosomen-enthaltendes Pellet sowie ein Exosomen-freier Überstand. Um zu prüfen, ob die Isolation von Exosomen gelungen ist, wurde ein Western Blot mit Flotillin-1 (Flot-1) und CD63, zwei charakteristischerweise in Exosomen enthaltenen Proteinen, durchgeführt (Palma et al., 2012, Grapp et al., 2013). Beide Marker konnten in jeweils zwei unterschiedlichen AD-Liquores mittels Western Blot nachgewiesen werden. In den ebenfalls untersuchten Überständen wurde weder Flot-1 noch CD63 detektiert (Abbildung 12).

Zusammengefasst wurde in diesem Versuch nachgewiesen, dass Exosomen im AD-Liquor vorhanden sind und ihre Isolation möglich ist. Die gesamte Exosomen-Fraktion befand sich ausschließlich im Pellet. Es wurden keine Exosomen im Überstand nachgewiesen.



**Abbildung 12: Isolierung von Exosomen aus Liquor von AD-Patienten.** Das während der Isolation erhaltene Exosomenpellet und der Überstand wurden im Western Blot mit Flot-1 und CD63, Exosomen-spezifischen Markern, inkubiert. M: Marker, Exo: Exosomenfraktion, ÜS: Überstand. Belichtungszeit: 10 min. n = 2.

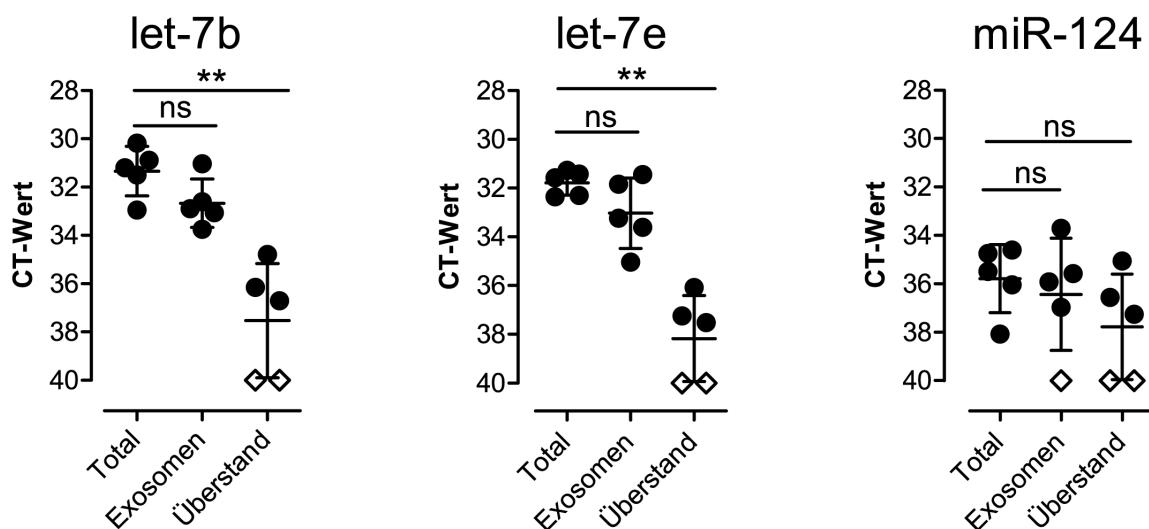
#### 4.1.7 Let-7b- und let-7e-miRNAs aus humanem Liquor sind mit Exosomen assoziiert

Im vorangegangenen Versuch wurden Exosomen erfolgreich aus dem Liquor von AD-Patienten isoliert. Als nächstes sollte untersucht werden, ob die miRNAs let-7b und let-7e mit diesen Exosomen assoziiert sind. MiR-124 wurde als im Gehirn stark exprimierte miRNA ebenfalls untersucht.

Die Gesamt-RNA („Total“) wurde nach der auch in den vorigen Versuchen eingesetzten Standard-Protokollen isoliert. Zusätzlich wurde RNA aus der Exosomenfraktion sowie dem Überstand der Liquores von AD-Patienten isoliert. Dabei wurde aus dem Liquor jeweils eines Patienten sowohl die Gesamt-RNA mit vorhergehender Exosomenisolation (Pellet und Überstand) als auch die Gesamt-RNA „Total“ nach Standard-Protokoll untersucht.

Die CT-Werte von let-7b- und let-7e-miRNA aus der RNA-Isolation nach Standardprotokoll unterschieden sich nicht von denen der exosomalen RNA-Isolation (let-7b: CT 31,3 [Total] und CT 32,7 [Exosomen] bzw let-7e: CT 31,8 [Total] und CT 33,0 [Exosomen]). Im Überstand lagen die Kopienzahlen von let-7b und let-7e außerhalb der Detektionsgrenzen bzw. waren signifikant niedriger als in der Exosomenfraktion und in der Fraktion nach Standardprotokoll. Für die miRNA miR-124 bestanden keine signifikanten CT-Wert-Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen. Es imponierte jedoch eine insgesamt geringere miR-124-Expression im Liquor mit durchschnittlichen CT-Werten von über 36.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass let-7b- und let-7e-miRNAs im Liquor von AD-Patienten vollständig an Exosomen gebunden vorliegen.



**Abbildung 13: Let-7b- und let-7e-miRNAs sind in Exosomen aus Liquor von AD-Patienten angereichert.** RNA wurde isoliert aus Liquor (Total) sowie aus Exosomen-Pellet und Überstand jeweils aus Liquor desselben AD-Patienten. Die Proben wurden mittels qRT-PCR unter Benutzung spezifischer Primer für let-7b, let-7e und miR-124 untersucht. Resultate sind dargestellt als Kreis, was dem Mittelwert eines Triplikats einer Probe entspricht, sowie als  $MW \pm SD$ . Leere Vierecke stellen Messungen dar, die außerhalb der Nachweisgrenze lagen und deren CT-Wert gleich 40 gesetzt wurde. Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test mit  $**P < 0,005$ , ns = nicht signifikant. Total: RNA-Isolation nach Standardprotokoll ohne vorhergehende exosomale Isolation; Exosomen: RNA-Isolation aus exosomenenthaltendem Pellet; Überstand: RNA-Isolation aus exosomenfreiem Überstand; n = 5.

#### **4.1.8 Zusammenfassung: Untersuchung der let-7-miRNAs in humanem Liquor**

Die let-7-miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, let-7e, let-7g und let-7i wurden zuverlässig im Liquor von Patienten mit AD und in Liquores von gesunden Kontrollindividuen nachgewiesen. Auch im Liquor von Patienten mit FTD, MDE und CIS lagen diese let-7-miRNAs in jeweils krankheitsspezifischen Expressionsmustern vor. Die Kopienzahlen von let-7b- und let-7e-miRNA waren im Liquor von AD-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Let-7e-Kopienzahlen waren außerdem signifikant erhöht in Liquores von Patienten mit Depression und CIS. In Liquores von Patienten mit Depression waren zusätzlich die Kopienzahlen von let-7b-miRNA signifikant erhöht. Let-7b- und let-7e-miRNA waren im AD-Liquor auch nach langer Lagerung nachweisbar. Sie lagen im Liquor von Patienten mit AD vollständig exosomal gebunden vor und konnten aus Exosomen isoliert werden.

## 4.2 Die let-7-miRNA-Familie wirkt neurotoxisch *in vitro*

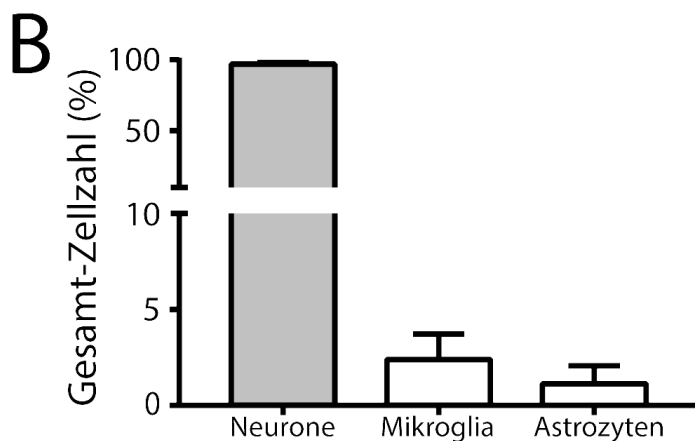
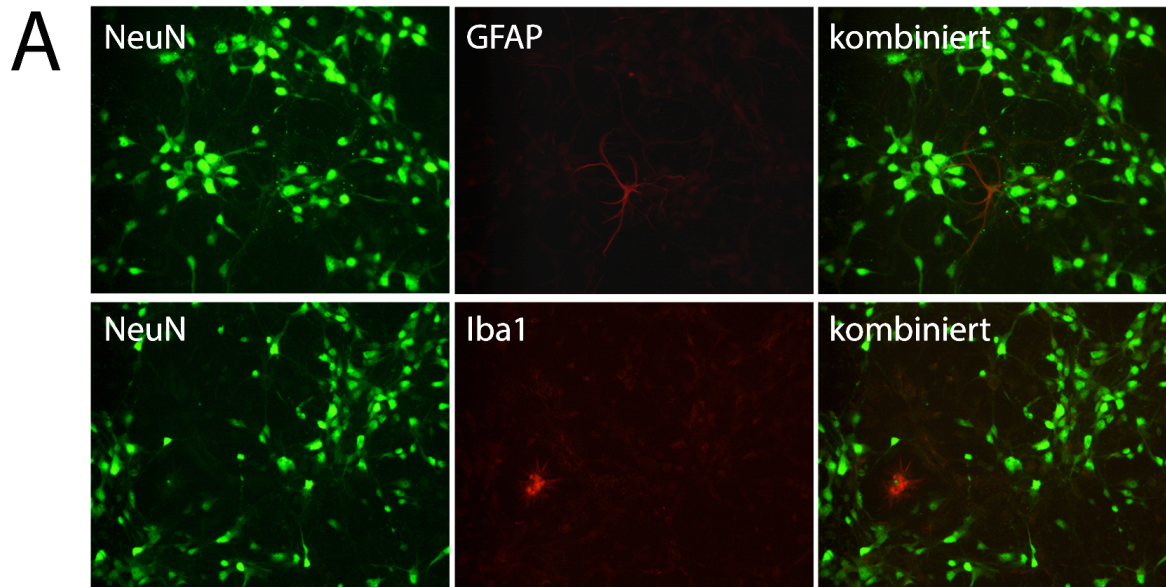
Die extrazelluläre miRNA let-7b wurde 2012 von Lehmann et al. als TLR7-Ligand identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass sie über Stimulation von TLR7 Neurodegeneration induziert (Lehmann et al., 2012).

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Kopienzahlen ausgewählter let-7-miRNAs im Liquor von Alzheimer-Patienten selektiv erhöht sind, sollte nun untersucht werden, ob let-7-miRNAs eine neurotoxische Wirkung haben. Hierzu wurden murine kortikale Neurone sowie murine und humane Neuroblastomzellen mit den jeweiligen synthetischen let-7-miRNAs stimuliert.

In den Untersuchungen von Lehmann et al. wurden synthetisch hergestellte Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide eingesetzt. Diese Modifizierungen erhöhen die Stabilität der miRNA gegenüber Nukleasen (Uhlmann et al., 1997). In den nachfolgenden Versuchen sollten nun systematisch alle let-7-miRNA-Familienmitglieder in Hinblick auf ihre neurotoxische Wirkung untersucht werden. Zudem sollte geprüft werden, ob sich auch mit unphosphorylierten, nicht-modifizierten let-7-miRNAs neurotoxische Effekte erzielen lassen.

Da es über eine mikrogliale Kontamination durch Ausschüttung von mikroglialen Zytokinen möglicherweise zu einem verstärkten neuronalen Zelltod kommen kann, wurden die primären Neuronenkulturen zuerst auf ihre Reinheit hin getestet. Immunodoppelfärbungen von Neuronen und Astrozyten beziehungsweise Neuronen und Mikroglia mit Anti-NeuN-, Anti-GFAP- und Iba1-Antikörpern und die nachfolgende mikroskopische Untersuchung zeigten, dass die Kulturen zu über 95 % aus Neuronen bestanden.





**Abbildung 14: Reinheit primärer Neuronenkulturen.** Primäre kortikale Neuronenkulturen von C57BL/6-Mäusen wurden an Differenzierungstag drei fixiert und mit Anti-NeuN und Anti-GFAP beziehungsweise Anti-Iba1 inkubiert. NeuN+, GFAP+ und Iba1+ Zellen wurden im Anschluss quantifiziert. n = 3. Repräsentative Abbildung.

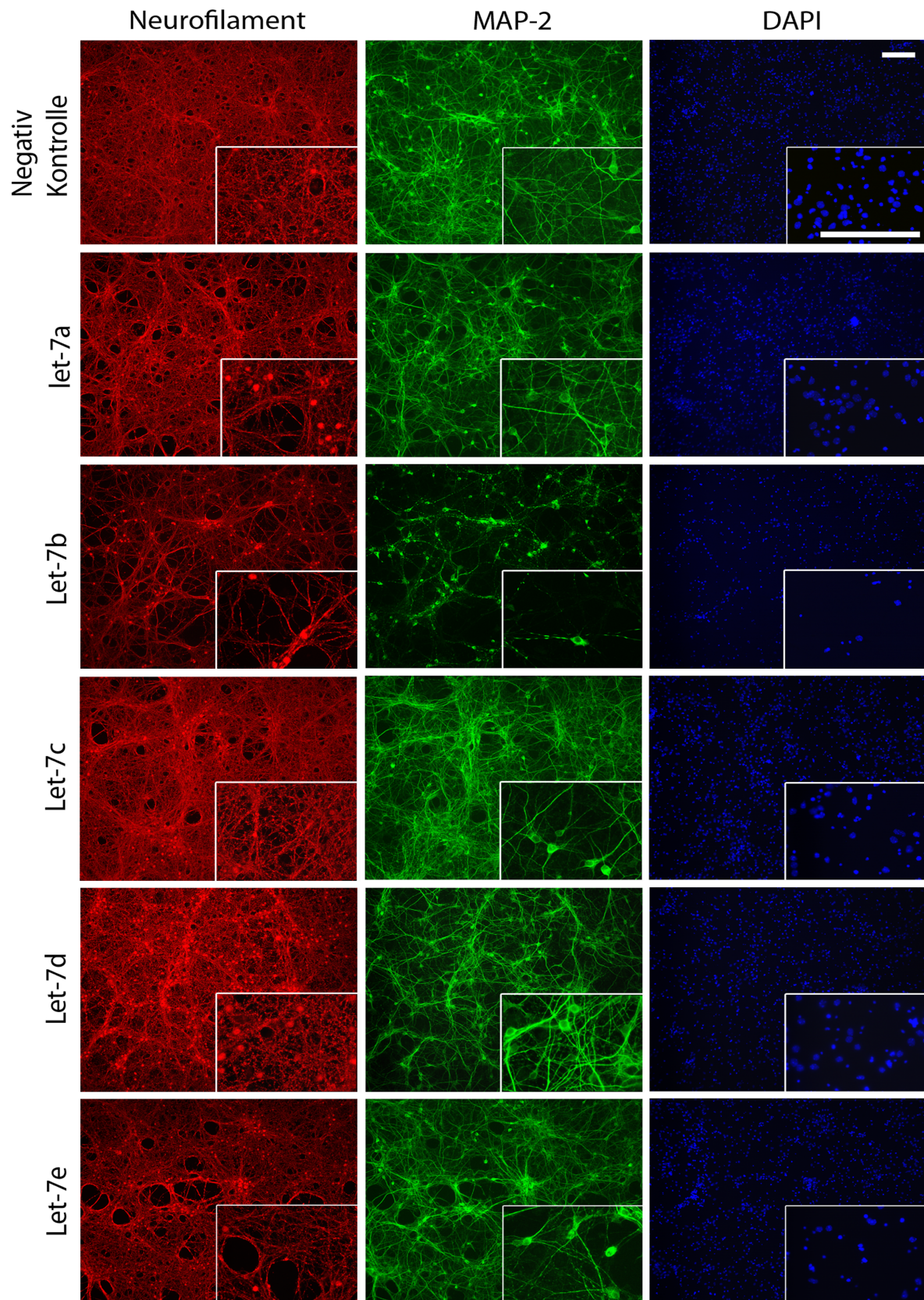
#### 4.2.1 Let-7-miRNAs verursachen morphologische Veränderungen an Neuronen

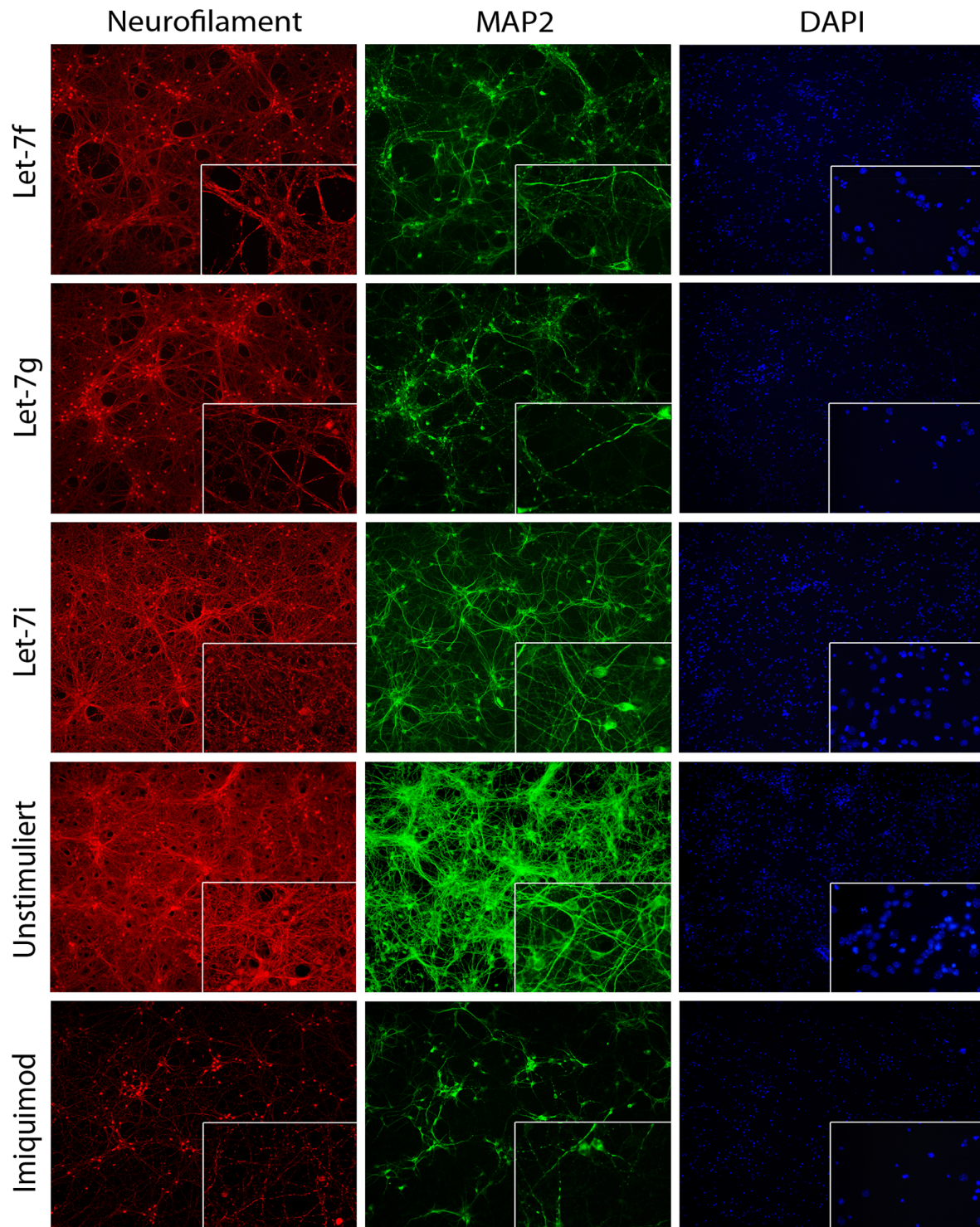
Um zunächst den Einfluss von let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g und let-7i auf die Zellmorphologie zu untersuchen, wurden die Neurone mit Markern für Axone und Dendriten angefärbt. Es wurden dabei die neuronalen Marker für Intermediärfilamente verwendet: Anti-Neurofilament und Anti-MAP-2 (microtubule-associated protein 2), wobei Neurofilament in Axonen und MAP-2 in Dendriten vorkommt. Die Zellkerne aller Zellen wurden mit dem DNA-markierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Neben den genannten Mitgliedern der let-7-miRNA-Familie wurde ein ‚gescrambeltes‘ Oligoribonukleotid ohne Sequenzhomologie zu anderen miRNAs als Negativkontrolle verwendet. Außerdem wurde die Wirkung von zwei weiteren TLR-Liganden untersucht: Imiquimod und LPS. Imiquimod, ein synthetischer Immunmodulator, der zur Behandlung genitaler und perianaler Warzen eingesetzt wird, entfaltet seine antivirale Wirksamkeit über TLR7-Aktivierung. Imiquimod ist ein etablierter TLR7-Ligand

und wurde als Positivkontrolle für TLR7-vermittelten neuronalen Zelltod verwendet. LPS ist ein etablierter TLR4-Ligand. Mikroglia exprimieren im Gegensatz zu Neuronen TLR4; bei Aktivierung von mikroglialen TLR4 durch LPS käme es zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine und dadurch letztlich auch zu einem Absterben von Neuronen. Bewirkt die LPS-Stimulation keinen neuronalen Zelltod, kann eine wesentliche mikrogliale Kontamination ausgeschlossen werden (Lehnardt et al., 2002).

In der Neurofilament-/MAP-2-Doppel-Färbung kam es 5 Tage nach Beginn der Inkubation mit den miRNAs let-7b, let-7f und let-7f zu sichtbarem Zelluntergang sowie Axon- und Dendritendegeneration (Abbildung 16), was durch Rarefizierung und perlschnurartige Umwandlung gekennzeichnet ist. Insgesamt zeigte sich bei allen untersuchten let-7-miRNAs eine Auflockerung des Zellverbandes, vermehrte Zellverklumpung sowie Zeichen der Axon- oder Dendritenschädigung.

Somit führte die Inkubation mit allen untersuchten let-7-Familienmitgliedern zu neuronaler Schädigung *in vitro*, wenn auch in unterschiedlichem Maße.





**Abbildung 16: Die Inkubation primärer Neurone mit extrazellulären Oligoribonukleotiden der let-7-miRNA-Familie führt zu axonaler Degeneration und Dendritenverlust.** Kortikale Neurone von C57BL/6-Mäusen wurden für 5 Tage mit 10 µg/ml let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, 10 µg/ml eines Kontroll-Oligoribonukleotid, das als Negativkontrolle diente, 10 µg/ml Imiquimod oder 100 ng/ml LPS inkubiert bzw. im Falle der unstimulierten Kondition keine Stimulation durchgeführt. Die Zellen wurden mit Maus-anti-Maus-Neurofilament und Ziege-anti-Maus (A568, rot), Kaninchen-anti-MAP-2 und Ziege-anti-Kaninchen (A488, grün) sowie DAPI gefärbt. Repräsentative Bilder aus n = 3. Maßstab = 100 µm.

#### 4.2.2 Let-7-miRNAs verursachen neuronalen Zelltod

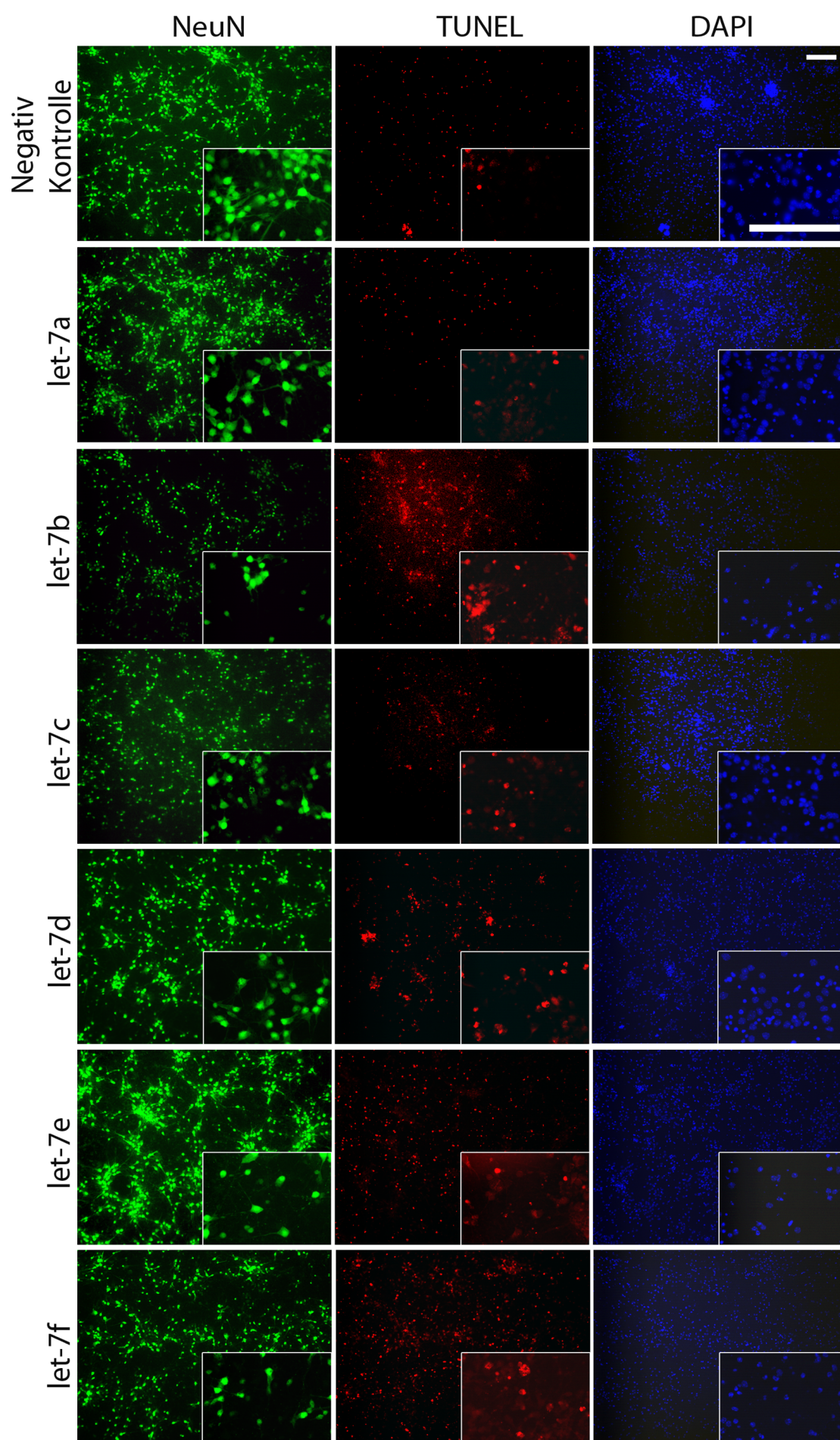
Die let-7-miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g und let-7i wirken über Axon- und Dendritenschädigung neurotoxisch. Ob sie auch zu neuronalem Zelltod führen und ob es dabei zu Apoptose kommt, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden. Die Inkubation mit dem zuvor genannten Kontroll-Oligoribonukleotid sowie mit dem TLR7-Liganden Imiquimod und dem TLR4-Liganden LPS dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

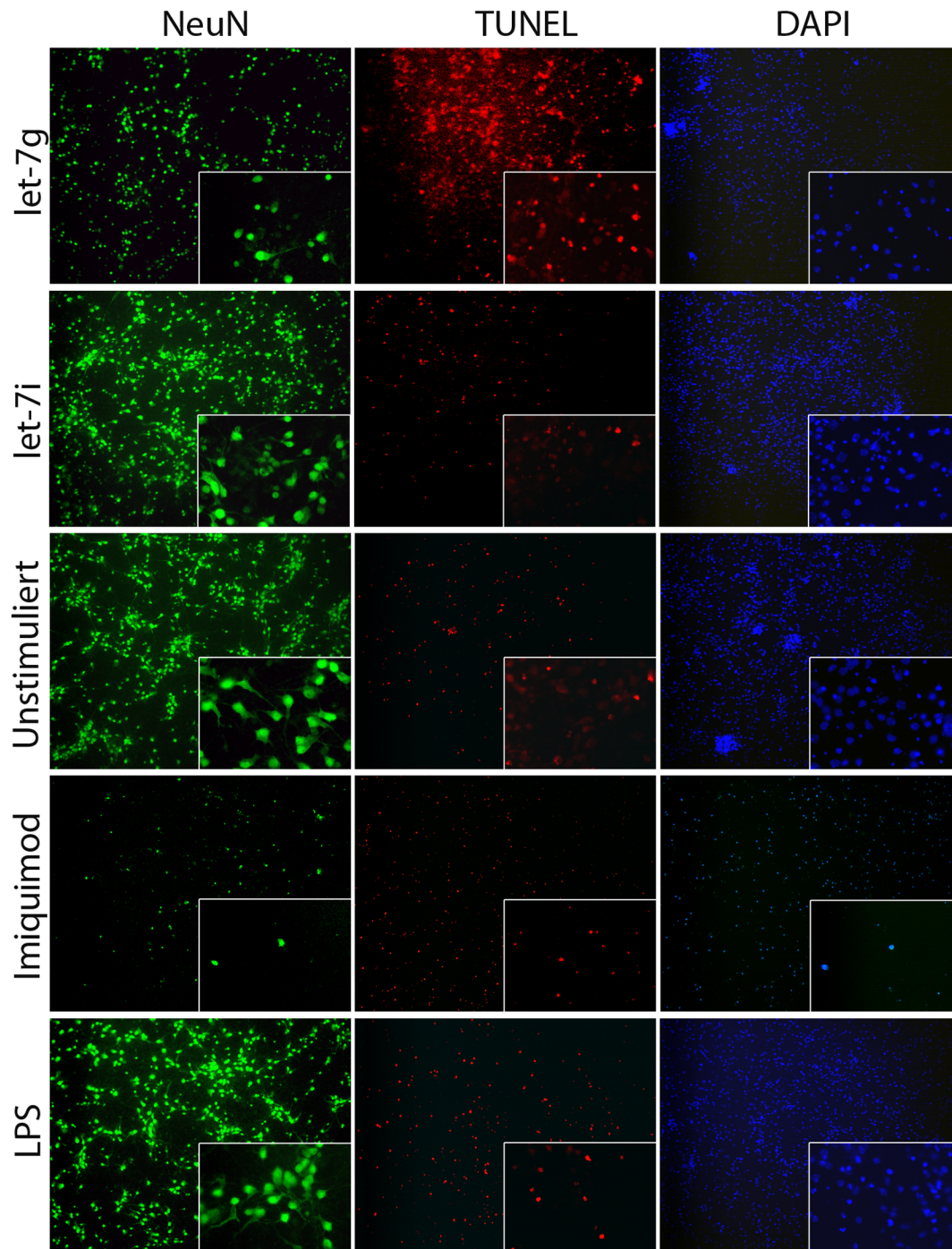
Das Überleben der Neurone wurde durch Quantifizierung kerngefärbter Neurone bestimmt. Hierzu wurden die Neurone mit einem Antikörper gegen das neuronale Kernprotein (*Neuronal Nuclei*, NeuN) inkubiert, das in den meisten Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems vorkommt. Mit einer zusätzlichen TUNEL-Färbung, die Zellen kennzeichnet, welche sich in der Apoptose befinden, wurde überprüft, ob an den Neuronen Zeichen der Apoptose auftraten. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert.

Abbildung 17 zeigt eine Kultur von primären murinen Neuronen nach 4 Tagen Inkubation mit let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i sowie dem Kontroll-Oligonukleotid, Imiquimod und LPS. Umstimulierte Neurone dienten als weitere Negativkontrolle. NeuN- und TUNEL-Signal der Neurone unterschieden sich nicht zwischen Negativ-Kontrolle und unstimulierter Kondition: Beide zeigten eine gleichmäßige, intensive NeuN-Färbung der neuronalen Zellkörper, die sich mit der Kernfärbung DAPI deckte, sowie nur vereinzelte TUNEL+-Zellen. Bei den mit den oben genannten let-7-miRNAs stimulierten Zellen fand sich im Vergleich zur Negativkontrolle vor allem nach Inkubation mit den miRNAs let-7b, let-7e, let-7f und let-7g ein Verlust von NeuN+-Zellen. Die im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls erhöhte Anzahl von TUNEL+-Zellen deutete auf eine vermehrte Apoptose hin (siehe auch Abbildung 18 und Abbildung 19). Let-7a-, let-7c-, let-7d- und let-7i-miRNA induzierten keine eindeutige Signalabnahme in der NeuN-Färbung bzw. -zunahme in der TUNEL-Färbung.

Die Behandlung mit Imiquimod bewirkte in allen Kulturen eine Abnahme der Zellzahl um über 90 % und eine Zunahme der Apoptose um mehr als das 100-fache (siehe auch Abbildung 18 und Abbildung 19). LPS induzierte keine signifikante Reduktion des neuronalen Überlebens und keinen Anstieg der apoptotischen Zellzahl, womit eine wesentliche Kontamination mit Mikroglia ausgeschlossen werden konnte. Die Inkubation mit dem Kontroll-Oligonukleotid führte weder zu vermehrtem Neuronenuntergang noch zu vermehrter Apoptose im Vergleich zur unstimulierten Kondition.

Zusammengefasst führte die Stimulation mit allen untersuchten let-7-miRNAs entweder zu einer Abnahme der Anzahl von Neuronen und/oder zu einer gesteigerten neuronalen Apoptose.





**Abbildung 17: Stimulation mit extrazellulären miRNAs der let-7-Familie führt zu Reduzierung der neuronalen Zellen und Zunahme der Apoptoserate.** Korticale Neurone von C57BL/6-Mäusen wurden für 4 Tage mit 10 µg/ml let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, 10 µg/ml eines Kontroll-Oligoribonukleotid, das als Negativkontrolle diente, 10 µg/ml Imiquimod oder 100 ng/ml LPS inkubiert bzw. keine Stimulation durchgeführt im Falle der unstimulierten Kondition und anschließend mit TUNEL (rot), DAPI (blau) sowie Maus-anti-NeuN gefolgt von Ziege-anti-Maus (A488, grün) gefärbt. Repräsentative Bilder von n = mindestens 3, jeweils als Duplikat; Maßstab = 100 µm.

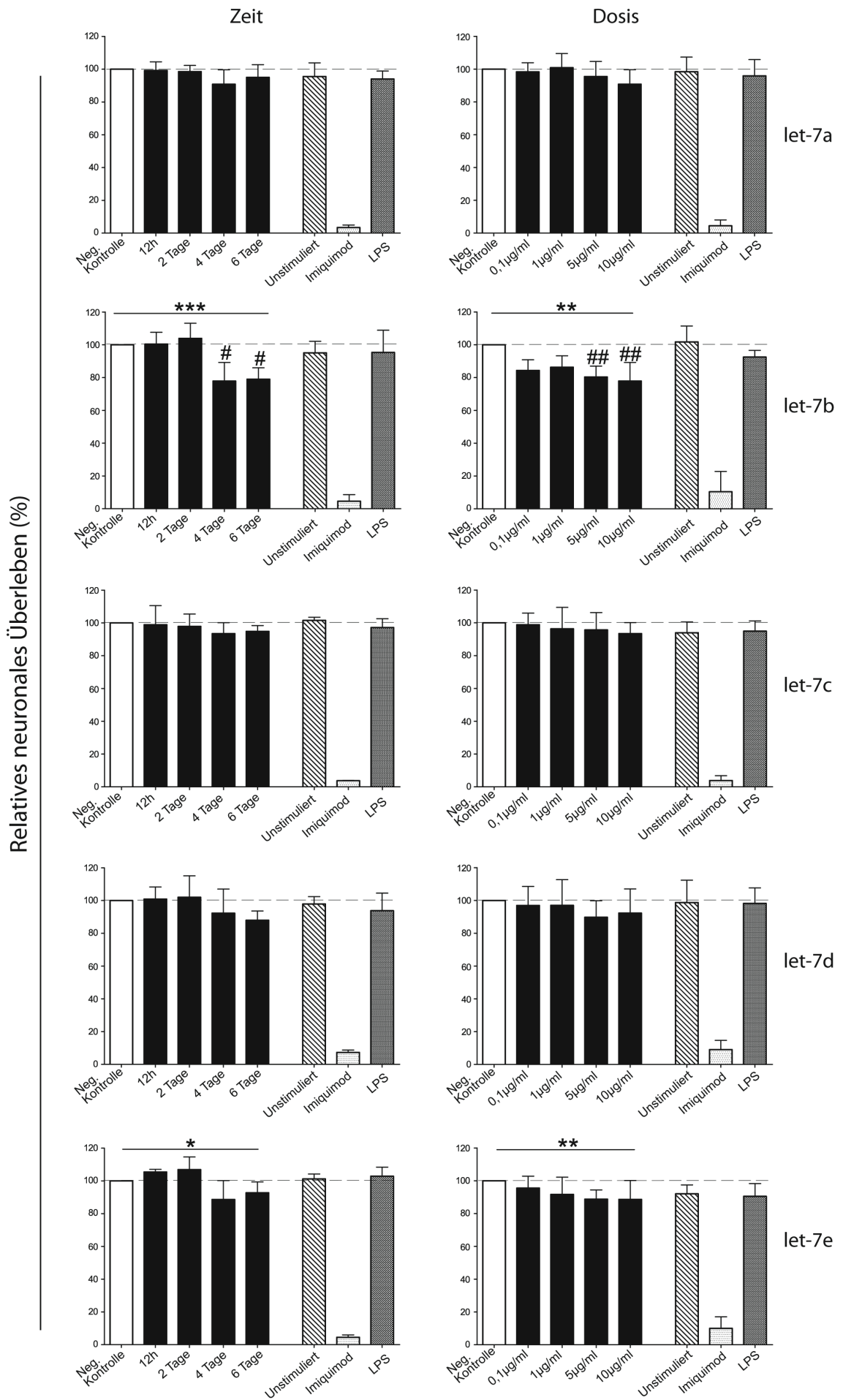
### 4.2.3 Der neuronaler Zelltod induziert durch let-7-miRNAs ist dosis- und zeitabhängig

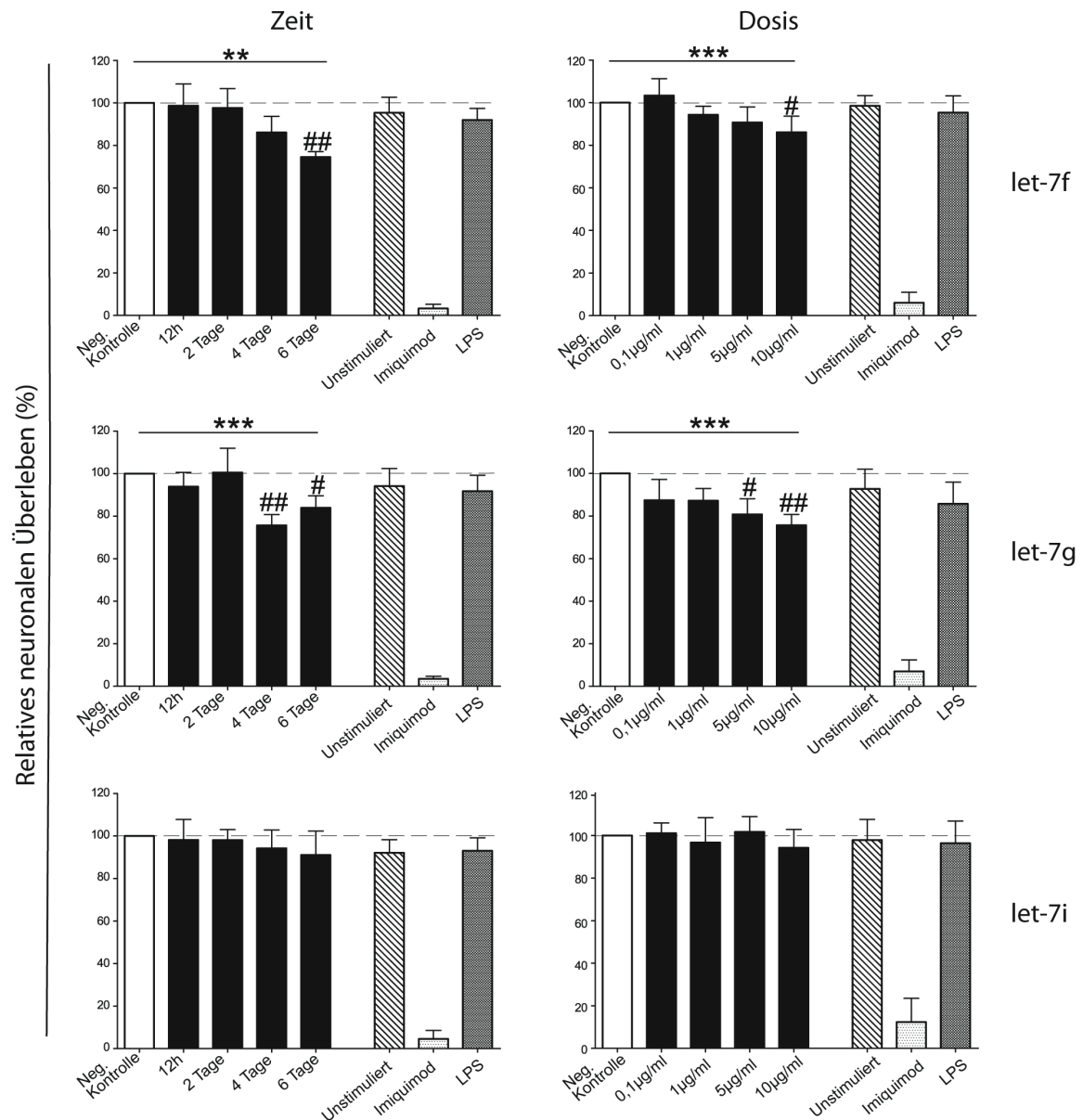
Im folgenden Versuch sollten Dosis- und Zeitabhängigkeit der let-7-miRNA-induzierten Neurotoxizität untersucht werden. Nach Stimulation mit let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i sowie dem Kontroll-Oligonukleotid, Imiquimod und LPS erfolgte nach Anfärbung mit Anti-NeuN (siehe Abbildung 18), der TUNEL-Methode (siehe Abbildung 19) und DAPI eine quantitative Auswertung. Unstimulierte Neurone dienten erneut als weitere Negativkontrolle.

Die Stimulation mit let-7b, let-7f und let-7g führte zur einer signifikanten Abnahme der Neuronenzahl im Vergleich zur Stimulation mit dem Kontroll-Oligoribonukleotid: bei let-7b um 21 %, bei let-7f um 25,5 % und bei let-7g um 16,1 % nach 6 Tagen Inkubation mit 10 µg/ml miRNA (siehe Abbildung 18). Eine Abnahme der Neuronenzahl trat frühestens nach 4 Tagen Inkubation auf. Eine signifikante Zellabnahme konnte ab einer eingesetzten miRNA-Dosis von 5 µg/ml bei Inkubation mit let-7b und let-7g und von 10 µg/ml bei let-7f beobachtet werden. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurden Zeit- und Dosisabhängigkeit statistisch ausgewertet. Dabei imponierte bei let-7b ( $P < 0,0001$  und  $P = 0,0036$ ), let-7f ( $P = 0,0011$  und  $P = 0,0001$ ), let-7g ( $P < 0,0001$  und  $P < 0,0001$ ) sowie let-7e ( $P = 0,0107$  und  $P = 0,002$ ) eine signifikante zeit- und dosisabhängige Zellzahlabnahme. Aber auch bei den anderen untersuchten miRNAs – let-7a, let-7c, let-7d und let-7i – zeigte sich ein zeit- und dosisabhängiger Trend zu vermindertem neuronalem Überleben.

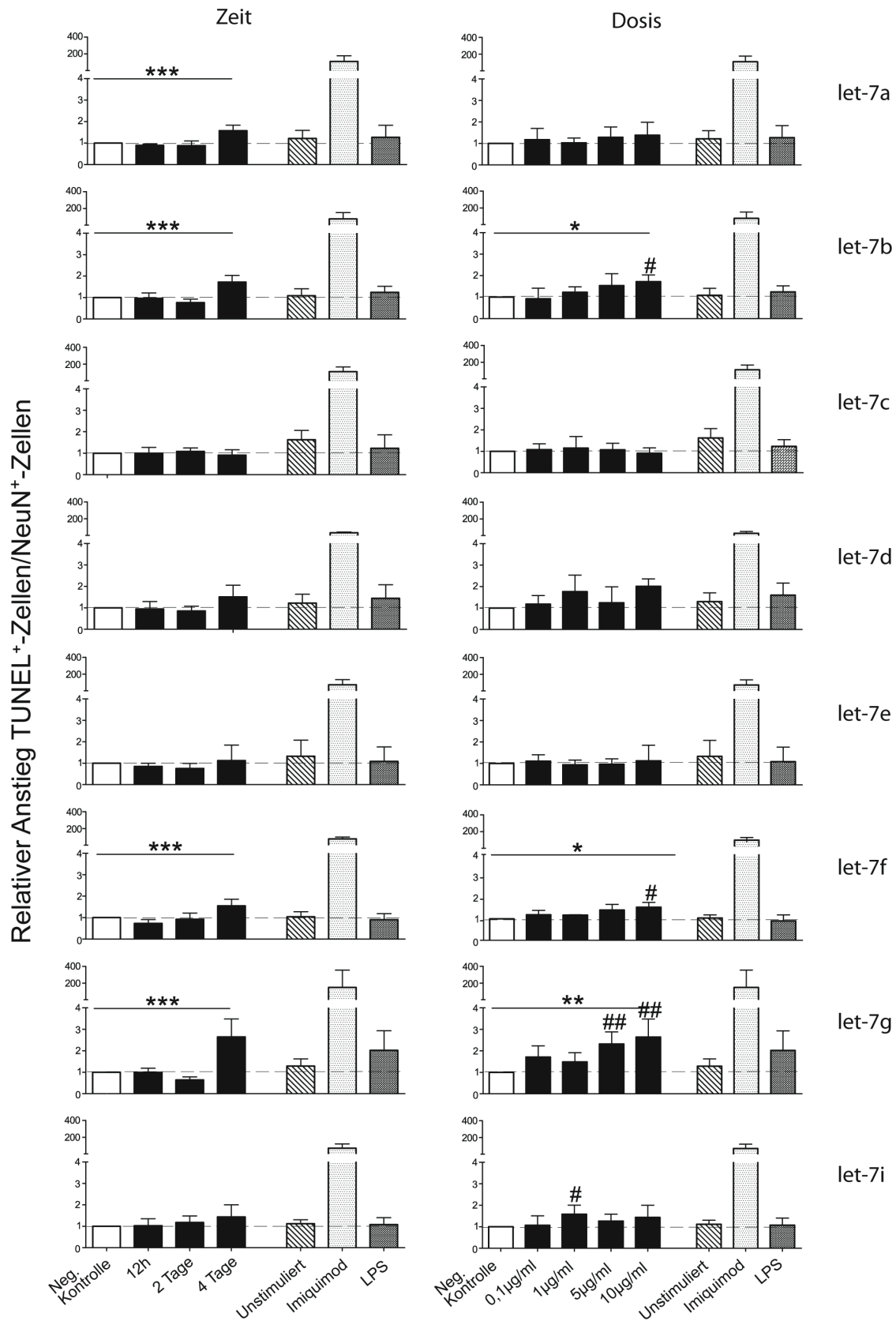
Dass der neuronale Zelltod durch Apoptose verursacht wurde, konnte mit Hilfe einer TUNEL-Färbung bestätigt werden: ein 1,7-facher Anstieg apoptotischer Zellen bei let-7b, ein 1,5-facher Anstieg bei let-7f und ein 2,6-facher Anstieg bei let-7g nach 4 Tagen Inkubation mit 10 µg/ml miRNA im Vergleich zur Inkubation mit dem Kontroll-Oligoribonukleotid (siehe Abbildung 19). Eine Zunahme apoptotischer Zellen konnte man frühestens nach 4 Tagen Inkubation beobachten. Bei einer Dosis von 5 µg/ml miRNA induzierte let-7g als einzige miRNA einen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen ( $P < 0,005$ ). Ab 10 µg/ml eingesetzter miRNA lösten neben let-7g ( $P < 0,005$ ) auch die miRNAs let-7b ( $P < 0,05$ ) und let-7f ( $P < 0,05$ ) eine signifikante Zunahme der Apoptose aus. Bei Stimulation mit let-7a- ( $P = 0,0008$ ), let-7b- ( $P = 0,0005$ ), let-7f- ( $P = 0,0009$ ) und let-7g-miRNA ( $P = 0,0005$ ) ergab sich eine zeitabhängige Zunahme apoptotischer Zellen. Let-7b- ( $P = 0,0136$ ), let-7f- ( $P = 0,0152$ ) und let-7g-miRNA ( $P = 0,0023$ ) entfalteten außerdem eine dosisabhängige apoptotische Wirkung. Spiegelbildlich zur Abnahme des neuronalen Überlebens wurde in der Untersuchung mit TUNEL-Färbung eine Zunahme der apoptotischen Zellen bei Stimulation mit allen getesteten let-7-miRNAs detektiert.







**Abbildung 18: Let-7-miRNAs induzieren Neuronenverlust *in vitro*.** Korticale Neurone von C57BL/6-Mäusen wurden für 12 h, 2 Tage, 4 Tage und 6 Tage mit 10 µg/ml let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, 10 µg/ml eines Kontroll-Oligoribonukleotid, das als Negativkontrolle diente, 10 µg/ml Imiquimod oder 100 ng/ml LPS stimuliert bzw. im Falle der unstimulierten Kondition keine Stimulation durchgeführt; Neurone wurden zudem mit Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 5 µg/ml let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g oder let-7i für 4 Tagen inkubiert und anschließend fixiert und mit Maus-anti-NeuN gefolgt von Ziege-anti-Maus (A488) gefärbt und quantifiziert. Jede Kondition wurde als Duplikat gemessen und dann gemittelt. Die Resultate sind als relatives neuronales Überleben und bezogen auf die Negativkontrolle (100 %) dargestellt mit MW ± SD. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt mit \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,005$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ , gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,005$ ; ### $P < 0,0001$ . n = mind. 3.



**Abbildung 19: Gesteigerte Apoptoserate durch Stimulation mit let-7-miRNAs.** Kortikale Neurone von C57BL/6-Mäusen wurden für 12 h, 2 Tage, 4 Tage und 6 Tage mit 10  $\mu\text{g/ml}$  let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, 10  $\mu\text{g/ml}$  eines Kontroll-Oligoribonukleotid, das als Negativkontrolle diente, 10  $\mu\text{g/ml}$  Imiquimod oder 100 ng/ml LPS stimuliert bzw. im Falle der unstimulierten Kondition keine Stimulation durchgeführt; Neurone wurden zudem mit Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  und 5  $\mu\text{g/ml}$  let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g oder let-7i für 4 Tage inkubiert und anschließend fixiert und mit TUNEL und Maus-anti-NeuN

gefolgt von Ziege-anti-Maus (A488) gefärbt und quantifiziert. Jede Kondition wurde als Duplikat gemessen und dann gemittelt. Die Resultate sind dargestellt als relativer Anstieg TUNEL+-Zellen/NeuN+-Zellen bezogen auf die Negativkontrolle mit MW  $\pm$  SD. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt mit  $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,005$ ;  $***P < 0,0001$ , gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test  $\#P < 0,05$ ;  $\#\#P < 0,005$ ;  $\#\#\#P < 0,0001$ . n = mind. 3.

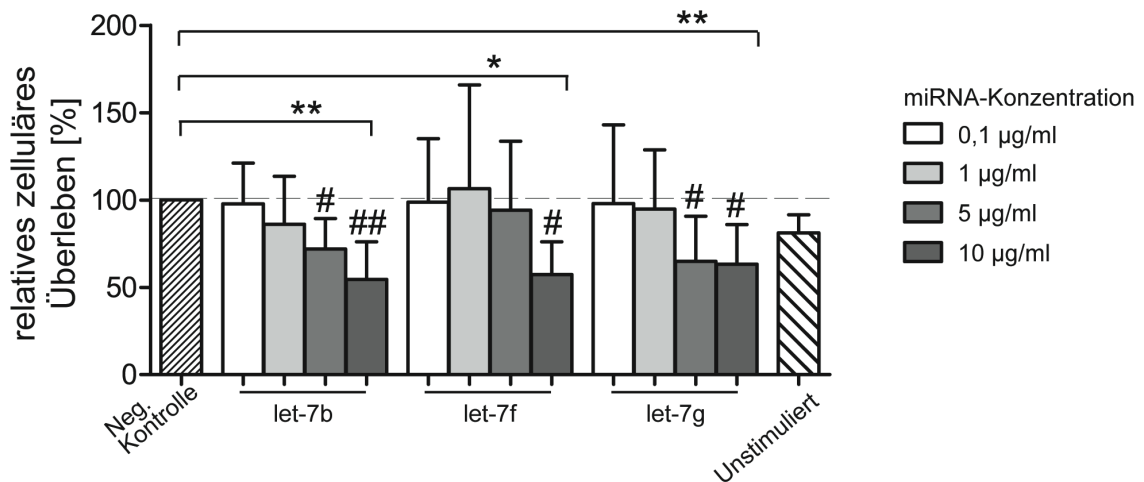
Insgesamt zeigte sich, dass alle getesteten let-7-miRNAs neurotoxisch wirken, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Stimulation mit den let-7-miRNA-Familienmitgliedern let-7b, let-7f und let-7g führte zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate und einem signifikanten Verlust von Neuronen – in Abhängigkeit von Zeit und Dosis. Auch die übrigen let-7-miRNA-Familienmitglieder, let-7a, let-7c, let-7d, let-7e und let-7i, zeigten neurotoxische Effekte, wenn auch in geringerem Ausmaß.

#### **4.2.4 Let-7-miRNAs induzieren neuronale Schädigung in Kulturen einer murinen Neuroblastoma-Zelllinie**

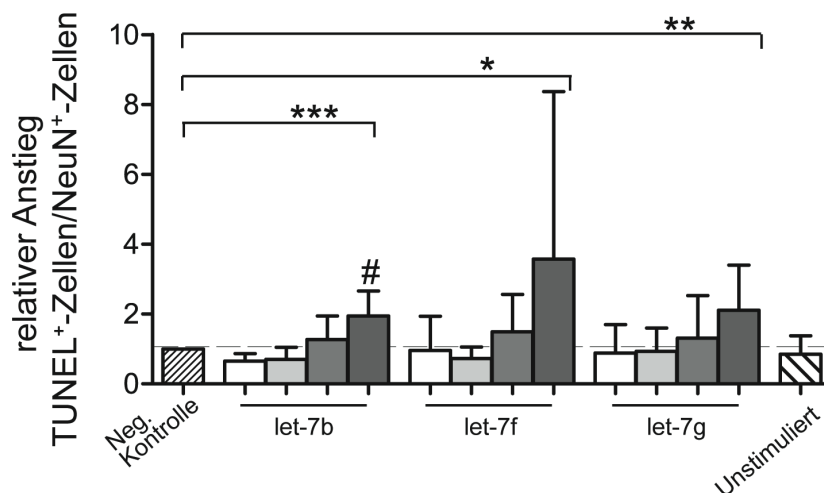
Die verwendeten primären Neuronenkulturen wiesen, wie bereits gezeigt, eine Reinheit von über 95 % auf (siehe Abbildung 14). Andere ZNS-Zellen, wie Mikroglia, exprimieren alle bisher identifizierten TLR und könnten daher bei Aktivierung durch Ausschüttung inflammatorischer Moleküle den neuronalen Zelltod mitverursachen, was eine verstärkte neurotoxische Wirkung der miRNAs zur Folge hätte. Zum vollständigen Ausschluss einer Kontamination mit anderen ZNS-Zellen wurde deshalb eine neuronale Zelllinie untersucht. Bei der hier verwendeten Zelllinie N1E-115 handelt es sich um murine Neuroblastomzellklone.

Es wurde der Einfluss derjenigen miRNAs mit deutlichen neurotoxischen Effekten in Kulturen primärer kortikaler Neurone – let-7b, let-7f und let-7g – auf die murine Neuroblastomzelllinie untersucht (Abbildung 20). Mittels NeuN- und TUNEL-Färbung wurden neuronales Überleben und Apoptose analysiert. Nach 4 Tagen führte die Stimulation mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  let-7b zu einer Zellzahlabnahme von 45,5 %, mit let-7f von 42,7 % und mit let-7g von 36,8 % sowie zu einer 1,9-, 3,6- bzw 2,1-fachen Zunahme der Apoptoserate, jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Zelltod nach Stimulation mit let-7b, let-7f und let-7g wurde ohne Anwesenheit anderer ZNS-Zellen, wie Mikroglia oder Astrozyten, ausgelöst, war also neuronenaunom. Auffällig war dabei, dass der in Abbildung 20 dargestellte Zelltod muriner Neuroblastomzellen deutlich stärker ausfiel als in Kulturen primärer Neurone (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).

A



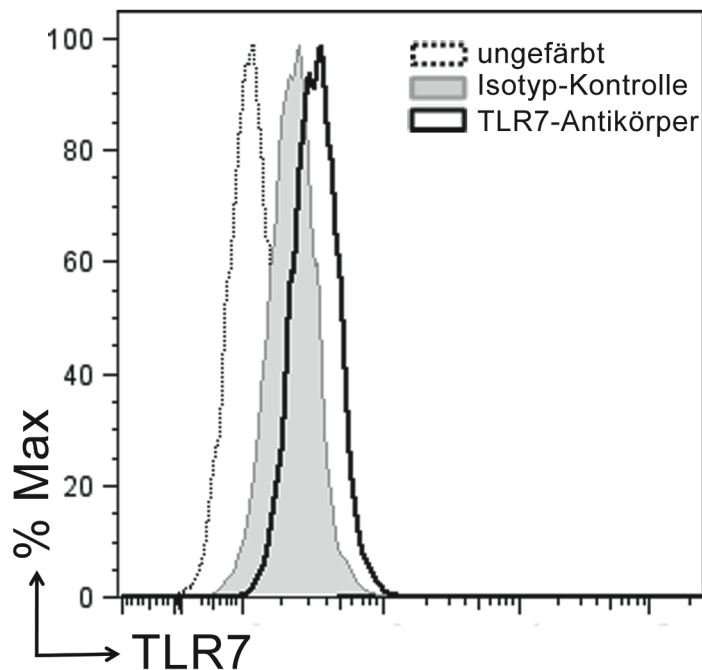
B



**Abbildung 20: Die Stimulation der murinen Neuroblastom-Zelllinie N1E-115 mit let-7b-, let-7f- und let-7g-miRNA führt jeweils sowohl zu einer Abnahme der Neuronenzahl als auch zu einer erhöhten Apoptoserate.** (A) N1E-115-Zellen wurden für 4 Tage mit Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 5 µg/ml oder 10 µg/ml let-7b, let-7f, let-7g oder let-7i, 10 µg/ml eines Kontroll-Oligoribonukleotid, das als Negativkontrolle diente, stimuliert bzw. keine Stimulation durchgeführt im Falle der unstimulierten Kondition, anschließend fixiert und mit TUNEL und Maus-anti-NeuN gefolgt von Ziege-anti-Maus (A488) gefärbt und quantifiziert. Jede Kondition wurde als Duplikat gemessen und dann gemittelt. Die Resultate sind als (A) relatives neuronales Überleben und bezogen auf die Negativkontrolle (100 %) dargestellt mit MW ± SD bzw. als (B) relativer Anstieg der TUNEL+-Zellen/NeuN+-Zellen bezogen auf die Negativkontrolle mit MW ± SD. Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,005$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ ; # $P < 0,05$ ;  $n = \text{mind. } 3$ .

#### 4.2.5 Neurotoxizität in Kulturen einer humanen Neuroblastoma-Zelllinie

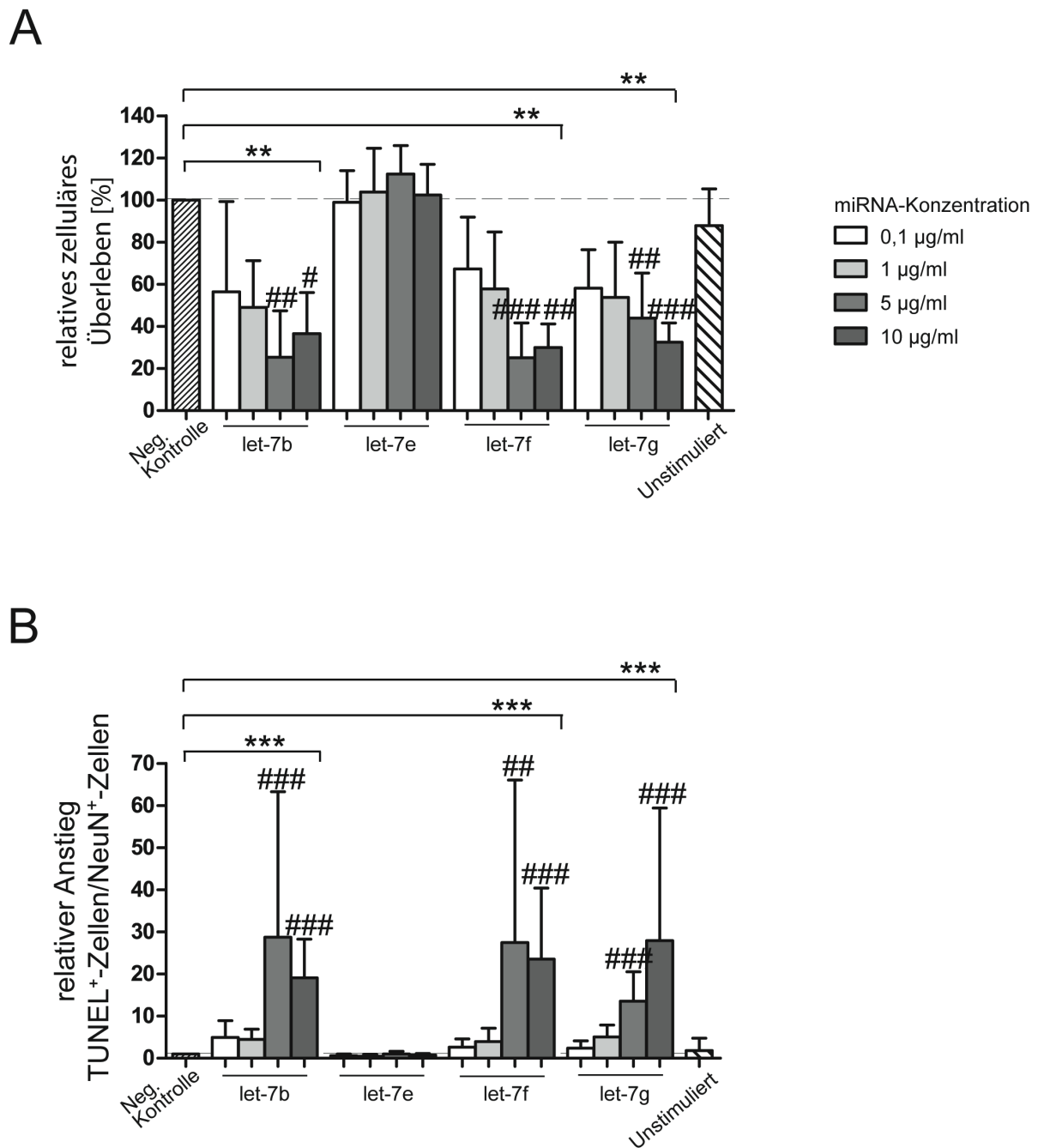
Die bisher gezeigten Daten wurden an murinen Zellen erhoben. Mit Verwendung einer humanen Zelllinie sollte die neurotoxische Wirkung ausgewählter let-7-miRNAs im humanen System untersucht werden. Es wurde die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Diese exprimiert TLR7, wie mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21).



**Abbildung 21: SH-SY5Y-Zellen exprimieren TLR7.** SH-SY5Y-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und inkubiert mit Anti-TLR7-Antikörper (Alexa 488). Im Anschluss erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Als Negativkontrolle diente ein Alexa-488-konjugierter Isotyp.

Die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wurde mit den miRNAs let-7b, let-7e, let-7f und let-7g inkubiert und hinsichtlich Vitalität (NeuN, siehe Abbildung 22A) und Apoptose (TUNEL, siehe Abbildung 22B) im Vergleich zur Negativkontrolle untersucht. Nach 4 Tagen reduzierte die Inkubation mit let-7b-miRNA das zelluläre Überleben dosisabhängig ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  um 74,6 % bzw. bei 10  $\mu\text{g/ml}$  um 63,5 % und steigerte die Apoptoserate um den Faktor 28,8 bzw. 19. Let-7f- und let-7g-miRNA induzierten ab einer Dosis von 5  $\mu\text{g/ml}$  ebenfalls Zelluntergang um 74,9 % bzw. um 56,1 % und eine 27,5- bzw. 13,5fache Steigerung der Apoptose. Let-7e-miRNA induzierte im Gegensatz dazu keinen gesteigerten Zelltod.

Let-7b, let-7f und let-7g induzieren somit auch in humanen neuronalen Zellen Schädigung und Apoptose, und dies in deutlich größerem Maße als in murinen Zellen.



**Abbildung 22: Let-7-miRNAs wirken toxisch in humanen Neuroblastom-Zellen.** SH-SY5Y-Zellen wurden für 4 Tage mit Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 5 µg/ml oder 10 µg/ml let-7b, let-7e, let-7f, let-7g oder let-7i, 10 µg/ml eines Kontroll-Oligoribonukleotid, das als Negativkontrolle diente, stimuliert bzw. keine Stimulation durchgeführt im Falle der unstimulierten Kondition, anschließend fixiert und mit TUNEL und Maus-anti-NeuN gefolgt von Ziege-anti-Maus (A488) gefärbt und quantifiziert. Jede Kondition wurde als Duplikat gemessen und dann gemittelt. Die Resultate sind als (A) relatives neuronales Überleben und bezogen auf die Negativkontrolle (100 %) dargestellt mit MW ± SD bzw. als (B) relativer Anstieg von TUNEL<sup>+</sup>-Zellen/NeuN<sup>+</sup>-Zellen bezogen auf die Negativkontrolle mit MW ± SD. Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,005$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ ; # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,005$ ; ### $P < 0,0001$ ;  $n = 3$ .

#### **4.2.6 Zusammenfassung: Die let-7-miRNA-Familie wirkt neurotoxisch *in vitro***

In diesem zweiten Ergebnisteil wurde eine neurotoxische Wirkung der let-7-miRNA-Familie *in vitro* nachgewiesen.

Alle untersuchten let-7-miRNAs, let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g und let-7i, induzierten in primären murinen Neuronen Zellschädigung im Sinne einer Axon- und Dendritendegeneration. Stimulation mit let-7b-, let-7f- und let-7g-miRNAs bewirkte sowohl in primären murinen Neuronen als auch in einer murinen und einer humanen Neuroblastomzelllinie eine signifikante Abnahme lebender Neurone und eine signifikante Steigerung der Apoptoserate.



## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die miRNA-Familie let-7 hinsichtlich ihres Vorkommen im Liquor von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen sowie hinsichtlich ihrer neurotoxischen Wirkung *in vitro* untersucht.

In der qRT-PCR-Analyse der let-7-miRNA-Familie im Liquor von Patienten mit AD, FTD, Depression mit kognitiven Defiziten und CIS im Vergleich zu einer nicht-dementen Kontrollgruppe konnten alle let-7-Mitglieder detektiert werden, nicht jedoch die hochverwandte miR-98. Es lag eine selektive Erhöhung der Kopienzahlen von let-7b- und let-7e-miRNA in AD-Liquores sowie im Liquor von Patienten mit MDE vor; let-7e-Kopienzahlen waren außerdem im Liquor von Patienten mit CIS selektiv erhöht. Im Liquor von FTD-Patienten zeigten die untersuchten let-7-miRNAs keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Auch nach einer längeren Lagerung konnten let-7b- und let-7e-miRNAs zuverlässig aus AD-Liquor isoliert und mittels qRT-PCR detektiert werden. Es kann vermutet werden, dass die Stabilität der miRNAs mit ihrer Bindung an Vesikel zusammenhängt. In der vorliegenden Arbeit wurden let-7b- und let-7e-miRNAs aus Exosomen aus humanem AD-Liquor isoliert. Außerdem wurde gezeigt, dass let-7b- und let-7e-miRNA im Liquor nahezu vollständig in Exosomen gebunden sind.

Die verschiedenen let-7-miRNAs wurden systematisch auf ihre Fähigkeit hin untersucht, neuronalen Zelltod zu induzieren. Dabei zeigten alle getesteten let-7-miRNAs sowohl in Kulturen primärer muriner Neurone als auch muriner und humaner Neuroblastomzellen eine neurotoxische Wirkung.

### 5.1 Die Ergebnisse im Kontext bisheriger Forschungsergebnisse

#### 5.1.1 Technische Aspekte der miRNA-Untersuchung im Liquor

In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien publiziert, die die miRNA-Expression im Liquor von Patienten mit ZNS-Erkrankungen untersucht haben. Vergleiche zwischen den Studien sind jedoch aufgrund der sehr unterschiedlichen technischen Ansätze schwierig. Angefangen bei der Patienten- und Kontrollenauswahl über die Art der Probengewinnung bis hin zur RNA-Isolation und -Detektion gibt es unterschiedliche Herangehensweisen, die einen direkten Vergleich erschweren (Sheinerman et al., 2013). Patientenproben können sich durch das Krankheitsstadium unterscheiden; Kontrollgruppen können sich aus gesunden Probanden oder aus Patienten mit anderen (neurologischen) Erkrankungen zusammensetzen, wie zum Beispiel

bei Haghikia et al. In der vorliegenden Arbeit wurden für alle Krankheitsentitäten Proben von Patienten in Anfangs- und fortgeschrittenen Stadien gewählt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus Proben von gesunden Patienten zusammen, bei denen im Rahmen rein subjektiver kognitiver Beschwerden Diagnostik erfolgte, jedoch keine neurologische Erkrankung festgestellt werden konnte. Aufgrund der zufälligen Auswahl der Proben aus der Biobank waren in der vorliegenden Studie Geschlecht und Alter zwischen den Gruppen nicht gleich verteilt. Die Altersunterschiede zwischen den Gruppen sind größtenteils durch die spezifischen Eigenheiten der Erkrankungen begründbar, insbesondere, weil die Proben aus einer Observationsstudie gewonnen und die Patienten dafür von ihrem Hausarzt überwiesen wurden. In dieser Population sind Patienten mit einer Depression oder subjektiven Gedächtnisproblemen naturgemäß jünger. Sie handeln eher proaktiv und begeben sich früher in ärztliche Behandlung als Patienten mit AD, die oft wenig Krankheitseinsicht zeigen und sich daher erst spät untersuchen lassen. Der Krankheitsbeginn der FTD ist zudem durchschnittlich früher als bei der AD. Aus diesen erkrankungsspezifischen Eigenschaften resultiert auch ein Altersunterschied zwischen den Gruppen an sich. Das kann insofern problematisch sein, als miRNAs im Liquor bei AD-Patienten nach Van Harten altersabhängig exprimiert werden. Demnach korreliert höheres Alter mit einem durchschnittlich höheren CT-Wert sowie einer insgesamt geringeren Anzahl detektierbarer miRNAs im Vergleich zu Proben von jüngeren Patienten (van Harten et al., 2015). Die in der vorliegenden Arbeit bestehenden Altersunterschiede zwischen den Gruppen könnten grundsätzlich also zu einer Verfälschung der Ergebnisse im Sinne relativ zu hoher Kopienzahlen in der jüngeren Kontrollgruppe geführt haben.

Die Liquorgewinnung kann *post mortem* oder vom lebenden Patienten erfolgen. Post-mortem-Proben haben den Nachteil des bis zu einem gewissen Grad unsicheren und ungleichen Post-mortem-Intervalls, in welchem durch Beendigung des Zellstoffwechsels Veränderungen auftreten, die unabhängig von der Grunderkrankung sind. So bricht zum Beispiel die Bluthirnschranke zusammen und Zellen des Gehirns setzen bei ihrem Zerfall vermehrt miRNA frei. In einem Vergleich zwischen ante- und post-mortem-Proben konnten Sala Frigerio et al. zeigen, dass es große Unterschiede in der Anzahl insgesamt detektierbarer miRNAs gibt: in den ante-mortem-AD-Proben konnten 65, in den post-mortem-AD-Proben 445 unterschiedliche miRNAs nachgewiesen werden (Sala Frigerio et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden nur durch Lumbalpunktion am lebenden Patienten gewonnene Liquorproben verwendet.

Mögliche Kontaminationen mit Blut beeinflussen das Ergebnis maßgeblich, da bei Zerfall zellulärer Blutbestandteile intrazelluläre miRNAs in den Liquor freigesetzt werden und eine falsch hohe RNA-Expression resultieren würde (Muller et al., 2014). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit makroskopisch hämorrhagische Proben ausgeschlossen. Mit einem

standardisierten Zentrifugationsprotokoll wurden Zellen entfernt. Eine Verunreinigung der untersuchten Proben mit (Blut-) Zellen erscheint daher unwahrscheinlich.

Für die miRNA-Isolation kommen verschiedene Verfahren infrage. Burgos et al. testeten 10 verschiedene RNA-Isolationsverfahren für den Liquor und ermittelten die höchste miRNA-Ausbeute bei Benutzung des mirVana Paris Kits von Ambion, welches daher in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Burgos et al., 2013). Dieses Kit erlaubt es, je nach Studie unterschiedliche Liquorvolumina einzusetzen. Für die qRT-PCR-Experimente wurden in der vorliegenden Arbeit pauschal 400 µl Liquor eingesetzt. Dies ist ein eher geringes Volumen (zum Vergleich: bei Burgos et al. wurde je 1 ml Liquor eingesetzt), erlaubte jedoch den Einsatz desselben Liquorvolumens bei allen eingesetzten Proben. Das verbesserte zwar die Vergleichbarkeit innerhalb der Studie, gleichzeitig folgte daraus aber eine vergleichsweise geringe RNA-Konzentration. Baraniskin et al. verwendeten Glykogen bei der Isolation, um den RNA-Ertrag zu steigern (Baraniskin et al., 2011). Glykogen ist in Ethanol unlöslich, sein Präzipitat steigert die Rückgewinnung von Nukleinsäuren bei Alkoholfällung. Vor der qRT-PCR ist bei geringer RNA-Konzentration auch eine Präamplifizierung möglich, wie bei Muller et al. durchgeführt (Muller et al., 2014). Bei einer Präamplifizierung wird die cDNA vor Beginn der qRT-PCR vermehrt. In der vorliegenden Arbeit wurden solche Zwischenschritte bewusst vermieden, um die Gefahr möglicher Verunreinigungen oder zusätzlicher Fehlerquellen zu reduzieren.

RNA-Konzentrationen unter 100 ng/µl konnten in der vorliegenden Arbeit in wiederholten Messungen zuverlässig reproduziert werden (Mülhardt, 2009). Die RNA-Konzentrationen aus Liquor der AD-Gruppe unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppe; die RNA-Konzentrationen in Liquores von FTD-, MDE- und CIS-Patienten waren jedoch deutlich geringer. Um dennoch eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden in der PCR die gleichen RNA-Konzentrationen eingesetzt.

Zur Auswertung der qRT-PCR, insbesondere in Hinblick auf eine Vergleichbarkeit der Daten, ist eine Normalisierung notwendig. Es gibt die Möglichkeit, die Proben mit einer miRNA aus einer anderen Spezies zu versetzen und diese als Referenz zu nutzen. Desweiteren kann man eine ubiquitär vorhandene miRNA als Referenz oder ‚Housekeeping Gene‘ nutzen. Bei ausreichend großer Probenzahl kann der Durchschnitt aller Werte gebildet und als Bezugspunkt für die Normalisierung der einzelnen Werte verwendet werden. Nicht zuletzt ist eine absolute Quantifizierung mit Hilfe einer Standardkurve möglich (Peltier et al., 2008, Sarkar et al., 2009, Kroh et al., 2010, Sanders et al., 2012). MiR-16 und miR-24 sind in mehreren Arbeiten als Referenz-miRNAs beschrieben worden (Kroh et al., 2010, Baraniskin et al., 2011). Der Versuch, miR-16 und miR-24 als Referenzen zu etablieren, ist in der vorliegenden Studie nicht gelungen.

Dies lag vor allem an ihrer niedrigen Konzentration im Liquor und der technisch grenzwertigen Nachweisbarkeit in der qRT-PCR. Nach einer Übersichtsdarstellung aller let-7-miRNAs ohne Referenz wurde in einem zweiten Schritt eine absolute Quantifizierung mittels Standardkurve und Ermittlung der genauen Kopienzahl der jeweiligen let-7-miRNA durchgeführt. Dabei wurde eine synthetische miRNA mit definierter Kopienzahl eingesetzt. Bei dieser Methode ist sicherlich zu beachten, dass geringfügige, unvermeidliche Pipettierungenauigkeiten zu CT-Veränderungen und dadurch zu einer erhöhten oder verringerten Teilchenzahl in den Proben führen können.

Verschiedene Studienergebnisse sind also den vielfältigen technischen Abläufen bei der Gewinnung des Liquors, der Isolierung der RNA und ihrer Detektion sowie Normalisierung geschuldet. Mit dem wachsenden Interesse an miRNAs und ihrer wachsenden Relevanz für die klinische Forschung werden sich die Nachweismöglichkeiten sicher weiter verbessern. Mit einheitlicheren Ansätzen wird eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Studien hergestellt werden können, was wiederum die Anwendbarkeit in der klinischen Routine beschleunigen und vereinfachen wird.

### **5.1.2 Das Vorkommen von let-7-miRNAs im Liquor**

Die miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, let-7e, let-7g und let-7 waren zuverlässig im Liquor von Patienten mit AD, FTD, MDE und CIS sowie von gesunden Kontrollpatienten nachweisbar. Es lagen signifikant höhere Kopienzahlen der miRNAs let-7b und let-7e im Liquor von AD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. In der vorliegenden Arbeit konnten damit die Daten von Lehmann et al. aus dem Jahr 2012 zur Expression von let-7b-miRNA in einer unabhängigen Patientenkohorte bestätigt werden. Die absoluten Kopienzahlen sind zwischen den beiden Studien jedoch nicht vergleichbar. Erstens wurden bei Lehmann et al. pauschal 5 µl RNA in der RT-PCR eingesetzt und nicht wie in der vorliegenden Arbeit 40 ng RNA. Zweitens wurden die Daten als Kopienzahlen pro µl angegeben und nicht wie hier pro ng RNA (Lehmann et al., 2012).

Eine signifikante Hochregulation von let-7e-miRNA im Liquor wurde von Peng et al. beim akuten ischämischen Schlaganfall, bei dem es zu Zelltod im minderperfundierten Gebiet kommt, festgestellt (Peng et al., 2015). Auch bei der AD kommt es zum Untergang von Neuronen und dadurch möglicherweise zur Freisetzung der miRNA let-7e in den Liquor. Auch bei der miRNA let-7b imponierten signifikant erhöhte Kopienzahlen im Liquor von Patienten mit Depression und bei let-7e bei Depression und CIS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kopienzahlen dieser beiden miRNAs in den FTD-Proben waren verglichen mit der Kontrollgruppe leicht vermindert. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine gesteigerte Expression von let-7b- und/oder let-7e-miRNA im Liquor war also bei AD, MDE und CIS nachweisbar, nicht

jedoch bei FTD. Es liegt demnach eine selektive Expressionssteigerung von let-7b- und let-7e-miRNA vor, die auf einen gemeinsamen Pathomechanismus bei AD, MDE und CIS hindeuten und im Falle der FTD auch der Unterscheidung verschiedener neurodegenerativer Krankheitsentitäten dienen könnte.

Let-7a-, let-7c, let-7g- und let-7i-miRNA waren zwischen Kontroll- und AD-Gruppe nicht unterschiedlich reguliert. Van Harten et al. berichteten über eine verminderte Expression von let-7a-miRNA im Liquor von Patienten mit late-onset AD (van Harten et al., 2015). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Allerdings gilt das Ergebnis von van Harten et al. nur für let-7a-miRNA bei einer spezifischen AD-Form und gegenüber einer Kontrollgruppe, die sich aus Patienten mit subjektiven Gedächtnisstörungen und psychiatrischen Diagnosen und einem Patienten mit einer Temporallappenepilepsie zusammensetzte. Fraglich ist daher, ob es sich tatsächlich um eine verminderte Expression von let-7a in der AD-Gruppe oder nicht vielmehr um eine verstärkte let-7a-Expression in der aus nicht-gesunden Individuen bestehenden Kontrollgruppe handelt.

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit die miRNA let-7d nicht quantifiziert wurde, ist in der rohen CT-Wert-Darstellung der Median-CT im Liquor von Patienten mit Depression mit 34,81 so niedrig wie bei keiner der anderen untersuchten Erkrankungen (zum Vergleich: let-7d-miRNA liegt in der Kontrollgruppe bei CT 38,16). Wan et al. fanden in einer Studie zu miRNAs bei schwerer depressiver Störung let-7d sowohl im Liquor als auch im Serum depressiver Patienten erhöht (Wan et al., 2015). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen einen ähnlichen Trend an, nämlich eine erhöhte Expression von let-7d-miRNA im Liquor von Patienten mit Depression.

Let-7f wurde im Liquor nicht quantifiziert, da die CT-Werte im Allgemeinen über 36 lagen und damit kein zuverlässiger Nachweis gewährleistet war. Auffällig ist jedoch, dass let-7f-miRNA im Liquor von AD-Patienten in 91 % der Fälle detektierbar war, in der Kontrollgruppe hingegen nur in 60 % der Fälle. Dies könnte auf eine unterschiedliche Freisetzung dieser miRNA bei AD und Gesunden auf einem niedrigen Expressionsniveau hindeuten. Cogswell et al. gelang der Nachweis von let-7f im Liquor. Die Gruppe konnte sogar über eine signifikante Hochregulation von let-7f im Liquor von AD-Patienten berichten – was zumindest teilweise zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit passen würde (Cogswell et al., 2008). Im Gegensatz zu Cogswell et al. konnten Müller et al. let-7f in den meisten untersuchten Liquorproben – ähnlich der vorliegenden Arbeit – trotz Präamplifikation überhaupt nicht nachweisen. In der Analyse von Hippocampusgewebe fanden sie zudem keine Konzentrationsunterschiede von let-7f zwischen Kontrollen und Patienten im Braak-VI-Stadium (Müller et al., 2014).

Interessanterweise wurde miR-124 in den FTD-Liquores zuverlässiger detektiert als in den übrigen Patientengruppen. MiR-124 reguliert die Expression des AMPA-Rezeptors (AMPA-R).

Kompositionsänderungen dieses Rezeptors werden mit spezifischen Verhaltensauffälligkeiten bei FTD in Verbindung gebracht und von einer verminderten Konzentration an miR-124 im Kortex begleitet (Gascon et al., 2014). Man kann spekulieren, ob bei der frontalen Neurodegeneration, die diese Erkrankung kennzeichnet, vermehrt miR-124 in den Liquor freigesetzt wird.

Umgekehrt lag die Expression von miR-124 in den Liquores von CIS-Patienten am Rande der Nachweisbarkeit. MiR-124 ist dafür verantwortlich, das Ruhestadium der Mikroglia aufrechtzuerhalten. In aktivierten Makrophagen ist die miR-124-Konzentration vermindert. Ponomarev et al. zeigten außerdem, dass bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell für MS, die Verabreichung von miR-124 zu einer deutlichen Unterdrückung der Entzündung und der Symptome führte (Ponomarev et al., 2011). Ein niedriger miR-124-Gehalt in den CIS-Liquores könnte für eine zum Zeitpunkt der Liquorentnahme noch aktive ZNS-Entzündung sprechen und gleichzeitig für das erhöhte Risiko eines erneuten Entzündungsschubes und hätte damit das Potential zu einem interessanten Prognosemarker. In der Tat haben von den Patienten mit im Liquor nachweisbarer miRNA miR-124 bei Fertigstellung dieser Arbeit (ca. 5 Jahre nach der Liquorgewinnung) nur 25 % eine MS entwickelt.

### 5.1.3 Die extrazelluläre Stabilität von miRNAs

Es ist bemerkenswert, dass miRNAs in extrazellulären Flüssigkeiten nachweisbar sind, trotz der dort ubiquitär vorhandenen RNasen, die die Lebensdauer von RNA erheblich verkürzen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass let-7b und let-7e im Liquor von AD-Patienten an Exosomen gebunden vorliegen. Selbst nach jahrelanger Lagerung war in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von let-7b- und let-7e-miRNAs aus AD-Liquor noch möglich. Baraniskina et al. sind zu vergleichbaren Ergebnissen gelangt: Die Lagerung von Liquor-Proben bei Raumtemperatur für 96 Stunden verursachte eine maximale  $\Delta$ CT-Veränderung von 5,58 % (Baraniskina et al., 2011). Die Verpackung in Vesikeln ist ein möglicher Mechanismus zum Schutz vor Abbau durch Nukleasen. MiRNAs befinden sich nach Valadi et al. im Inneren dieser Vesikel und sind Nukleasen dort weniger zugänglich (Valadi et al., 2007).

In anderen Arbeiten wurden Exosomen insbesondere auch als interzelluläre Transporter für miRNAs diskutiert, die dem Informationsaustausch zwischen den Zellen dienen. In Exosomen, die von aus dem Knochenmark abgeleiteten Zellen (BMDCs, *bone marrow derived cells*) freigesetzt wurden, konnten alle Mitglieder der let-7-Familie nachgewiesen werden (Montecalvo et al., 2012). Man könnte darüber spekulieren, ob let-7-miRNAs möglicherweise überhaupt nur dann an TLR7 binden, wenn sie mit extrazellulären Exosomen assoziiert sind, die während neuronaler Zellschädigung freigesetzt werden. Um den endolysosomal gelegenen TLR7 zu aktivieren,

würden let-7-miRNAs mit dem Exosom von benachbarten Neuronen endozytotisch aufgenommen werden und dann zu neuronaler Zellschädigung führen. Zytoplasmatische let-7-miRNA hingegen gelangt physiologischerweise nicht in das endolysosomale Kompartiment und induziert daher keine Zellschädigung.

Chevillet et al. haben gezeigt, dass aus Körperflüssigkeiten und Zellkultur-Media isolierte Exosomen nur einen vergleichsweise geringen Gehalt an miRNAs besitzen. Das nach Ultrazentrifugation erhaltene Exosomen-Pellet und der dazugehörige Überstand wurden auf ihren miRNA-Gehalt hin untersucht. Dabei zeigte sich im Überstand ein Vielfaches des exosomalen miRNA-Gehalts. Stöchiometrischen Berechnungen zufolge sollte sich dabei in einem Exosom durchschnittlich weit weniger als eine miRNA befinden. Dies galt auch für let-7b, welche aus Exosomen aus Samenflüssigkeit sowie aus dem Überstand einer Ovarial-Carcinom-Zelllinie isoliert wurde (Chevillet et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit waren let-7b und let-7e im Gegensatz dazu fast ausschließlich in der Exosomenfraktion nachweisbar und nicht im Überstand. Im Unterschied zu der Arbeit von Chevillet et al. wurden die Exosomen hier erstens aus Liquor und zweitens statt mit Ultrazentrifugation durch Dynabead-Bindung isoliert. Deswegen ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse von Chevillet mit denen der vorliegenden Arbeit nicht ohne Weiteres möglich (Chevillet et al., 2014).

Neben Exosomen haben miRNAs noch weitere Bindungspartner. So könnte die in der vorliegenden Arbeit erhaltene Exosomenfraktion mit Mikrovesikeln oder Apoptoskörperchen kontaminiert gewesen sein. Desweiteren können miRNAs mit Proteinen wie Ago und HDL assoziiert sein. Ago/miRNA-Komplexe wurden bereits in Exosomen von Brustkrebszellen nachgewiesen (Melo et al., 2014). Interessant wäre eine Isolation aller miRNA-Bindungspartner aus dem Liquor und der Vergleich ihres jeweiligen miRNA-Gehalts.

#### **5.1.4 Die Neurotoxizität der let-7-miRNA-Familie**

In der vorliegenden Arbeit wurden let-7-miRNAs zum ersten Mal systematisch auf ihr neurotoxisches Potential hin untersucht. Zur let-7-Familie zählen die acht miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g und let-7i. Ob auch miR-98 zur let-7-Familie gehört, ist in der Literatur umstritten. Von Wulczyn et al. wird die miRNA lediglich als verwandt angesehen; von der miRNA-Plattform miRBase hingegen als Familienmitglied gewertet (Wulczyn et al., 2007, Kozomara et al., 2014). Die vorliegende Arbeit richtet sich in der Einordnung nach Wulczyn et al.. Dass miR-98 im Gegensatz zu den anderen untersuchten let-7-miRNAs überhaupt nicht im Liquor nachgewiesen werden konnte, mag diese Unterscheidung bekräftigen.

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten let-7-miRNAs haben im Vergleich zur Negativkontrolle, einem Oligoribonukleotid ohne Sequenzhomologie zu anderer miRNA, Zeichen der Zellschädigung im Sinne von Axonen- und Dendritenschädigung induziert.

Die in der vorliegenden Arbeit zunächst an primären Zellen aus der Maus erhobenen Daten ließen sich auch in Kulturen von Neuroblastoma-Zelllinien reproduzieren. Neuroblastoma-Zelllinien werden insbesondere zur Prüfung neurotoxischer Substanzen eingesetzt, weil sie reine Neuronenkulturen sind und man eine Kontamination mit nicht-neuronalen Zellen ausschließen kann (Shastry et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde dabei die Toxizität von let-7-miRNA zum ersten Mal auch an einer humanen Zelllinie untersucht. Der Zelluntergang war nach Stimulation mit den miRNAs let-7b, let-7f und let-7g stärker ausgeprägt als in Kulturen primärer Mauszellen. Neuroblastoma-Zelllinien sind zur Proliferation und Differenzierung in neuronale Zellen fähig. Während der embryonalen Differenzierung des ZNS ist die Expression von TLRs, insbesondere von TLR7, zeitweise erhöht (Kaul et al., 2012). Vorstellbar wäre ein ähnlicher Mechanismus, also eine Hochregulation von TLR7, in Neuroblastoma-Zellen. Eine stärkere TLR7-Expression würde bedeuten, dass mehr TLR7 durch den Liganden let-7 stimuliert würden und dadurch ein größeres Ausmaß an Zelltod induzieren könnten.

Die miRNAs let-7b, let-7f und let-7g induzierten *in vitro* eine signifikante Abnahme der Zellzahl und eine gesteigerte Apoptoserate in primären murinen sowie murinen und humanen Zelllinien-Kulturen. Auch let-7a und let-7e führten zeit- und/oder dosisabhängig zu einem signifikanten Zelluntergang. Die Induktion der Neurodegeneration erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch native let-7-Sequenzen. Ihre Stabilität ist geringer als die von synthetischen Sequenzen, die durch Phosphorothiobindung stabilisiert und modifiziert wurden. Endogene miRNAs liegen in stabilisierter Form vor und besitzen dadurch einen besseren Schutz gegenüber Nukleasen als synthetische miRNAs, die schneller abgebaut werden (Baraniskin et al., 2011). Der schnellere Abbau hat eine geringere Wirksamkeit zur Folge. Die Neurotoxizität von let-7b-miRNA wurde bereits bei Lehmann et al. beschrieben. Auch let-7a, let-7c und let-7g wurden dort untersucht. Es wurden dabei – im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten miRNAs – stabilere, durch Phosphorothiobindung modifizierte miRNAs eingesetzt. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Wirkung von let-7b bei geringeren Dosen einsetzte (2 µg/ml) und stärkeren Zelltod induzierte (40 % Zellsterben nach 6 Tagen mit 10 µg/ml let-7b) als in den Experimenten der vorliegenden Arbeit. Mit den modifizierten miRNAs let-7a, let-7c und let-7g konnten Lehmann et al. ebenfalls neuronalen Zelltod induzieren. Let-7b-miRNA wurde zusätzlich in seiner nativen Form getestet und hatte nach 4-tägiger Stimulation eine Abnahme der Zellen von 20 % bewirkt. Das ist vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit für let-7b-miRNA erhaltenen Daten. Bei Lehmann et al. konnte zudem gezeigt werden, dass es nach TLR7-



Aktivierung durch Vermittlung von Caspase-3 zur Apoptose kommt (Lehmann et al., 2012). Der genaue Signalweg von TLR7-Aktivierung bis zur Apoptose ist jedoch nach wie vor unklar.

Neben der Reproduktion der Ergebnisse zur Neurotoxizität von nativer let-7b-miRNA ließ sich in der vorliegenden Arbeit außerdem eine ausgeprägte Neurotoxizität von nativer let-7g und let-7f feststellen. Bei Lehmann et al. wurde mit der miRNA let-7b die stärkste neurotoxische Wirkung erzielt. In der vorliegenden Arbeit sind es die miRNAs let-7b, let-7f und let-7g, die sämtlich einen ausgeprägten neurotoxischen Effekt besaßen, sowohl in Kulturen primärer muriner Zellen als auch in Kulturen muriner sowie humaner Neuroblastoma-Zelllinien. Let-7b besitzt, wie auch die als TLR7-Ligand bekannte ssRNA40, die Sequenz GUUGUGU. Die miRNAs let-7f und let-7g weichen von dieser Sequenz ab (AUUGUAU und UUUGUAC). Auch die anderen let-7-Mitglieder sind alle mit mindestens einem Ribonukleotid verschieden von der originären GUUGUGU-Sequenz (siehe Abbildung 1) und induzieren dennoch Zellschädigung. Forsbach et al. konnten zeigen, dass für eine TLR7-Aktivierung mindestens vier Ribonukleotide nötig sind. Die Kombination der vier Ribonukleotide mit der stärksten Fähigkeit zur TLR7-Aktivierung, die mittels IFN- $\alpha$  Sekretion quantifiziert wurde, ist die Sequenz UUGU, über die alle let-7-Mitglieder verfügen (Forsbach et al., 2008). Damit ließe sich der bei allen let-7-miRNAs vorhandene neurotoxische Effekt erklären. Die Frage, warum aber let-7b-, let-7f- und let-7g-miRNA *in vitro* eine stärkere Wirkung zeigen als die übrigen let-7-miRNAs, lässt sich damit jedoch nicht beantworten.

### 5.1.5 Let-7-miRNAs im Liquor und ihre Neurotoxizität *in vitro*

Das neurotoxische Potential einer let-7-miRNA *in vitro* war in der vorliegenden Arbeit nicht prinzipiell mit einer erhöhten Kopienzahl im Liquor assoziiert. Allein let-7b führte zu einer signifikanten Steigerung des neuronalen Zelltodes *in vitro* einerseits und wies andererseits signifikant erhöhte Kopienzahlen im Liquor von Patienten mit AD auf.

In der Analyse der let-7-miRNA-Expression im Hirngewebe konnten alle untersuchten miRNAs detektiert werden. Let-7e besaß den niedrigsten CT-Wert, gefolgt von den miRNAs let-7b und let-7a. Der höchste CT-Wert ergab sich für miR-98. MiRNAs sind intrazellulär deutlich höher konzentriert als im zellfreien Liquor, was auch der Vergleich der Ergebnisse aus der Untersuchung des Hirngewebes mit denen aus dem Liquor bestätigt. In der Gewebeprobe wurden deutlich höhere Kopienzahlen der jeweiligen miRNAs ermittelt. Die Konzentration einer miRNA ist dabei nicht in allen Hirnregionen gleich (Olsen et al., 2009, Chen et al., 2015). Bislang ist unklar, wie viele let-7-miRNA-Kopien bei neurodegenerativen Erkrankungen am Ort der Hirnschädigung tatsächlich freigesetzt werden und welche lokalen Konzentrationsmaxima dabei entstehen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher supraphysiologische Dosen der jeweiligen

let-7-miRNA zur in-vitro-Stimulation verwendet. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um die pathophysiologischen Konzentrationen der verschiedenen let-7-miRNAs und ihr neurotoxisches Potential *in vivo* zu bestimmen.

In der Einleitung wurden bereits Lehmann et al. zitiert, die gezeigt haben, dass let-7b-miRNA über TLR7 zu Neurodegeneration führt. Das heißt, dass extrazelluläre let-7b an den endolysosomal lokalisierten TLR7 bindet und darüber Zelltod induziert. Die zugrundeliegende Zelle wiederum setzt dabei let-7b-miRNAs frei, die an weitere TLR7 benachbarter Neurone binden und dadurch eine Zelltodkaskade induzieren. Aufgrund dieses Mechanismus wäre es denkbar gewesen, dass diejenigen let-7-miRNAs, die *in vitro* signifikant mehr Zelltod induzierten, im Liquor von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen erhöht vorliegen. Das war nicht immer der Fall. Für let-7b-miRNA korrelierte die Fähigkeit, *in vitro* neuronalen Zelltod zu induzieren, mit erhöhten Kopienzahlen im Liquor, für die anderen let-7-miRNAs wurde keine Korrelation beobachtet. Waren die miRNAs in der in-vitro-Untersuchung für Zellschädigung verantwortlich, aber im Liquor nicht reguliert – wie let-7f- und let-7g-miRNA –, könnte das darauf zurückzuführen sein, dass sie nicht in ausreichendem Maße freigesetzt wurden (Calin et al., 2002). Vor allem im Anfangsstadium neurodegenerativer Erkrankungen sind nur ausgewählte Hirnregionen befallen. Diese Regionen sind unter Umständen zu klein, um ausreichend im Liquor detektierbare miRNAs freizusetzen, die möglicherweise auch intrazellulär nur schwach exprimiert sind. Für diese Annahme spräche der erkennbare Trend zur vermehrten Expression im Liquor von AD-Patienten der miRNA let-7f – deren Konzentration im Liquor allerdings am Rande der Nachweisgrenze lag.

Bei der miRNA let-7e verhielt es sich genau umgekehrt. Sie induzierte, verglichen mit let-7b, eine geringere Zellschädigung, war aber im Liquor von Patienten mit AD, Depression und CIS signifikant erhöht. Let-7e war in der vorliegenden Arbeit im zerebralem Gewebe am stärksten exprimiert, intrazellulär also am höchsten konzentriert. Vorstellbar wäre hier eine verstärkte Freisetzung der miRNA in den Liquor aufgrund hoher intrazellulärer Verfügbarkeit. Möglich ist auch eine gemeinsame Freisetzung mit let-7b-miRNA, zum Beispiel, indem let-7b über TLR7 die Zelltodkaskade anstößt und die sterbende Zelle dann vor allem die let-7-miRNAs mit der höchsten intrazellulären Konzentration freisetzt: let-7b und let-7e.

## 5.2 Let-7-miRNAs und ihre mögliche Verwendung in der Klinik

### 5.2.1 MiRNAs als Biomarker bei ZNS-Erkrankungen

Gängige Biomarker-Definitionen gehen auf die Richtlinien von Austin Bradford Hill zurück, die die Kausalität, wie Stärke der Assoziation, Folgerichtigkeit oder biologische Plausibilität betonen (Hill, 1965). Nach der ‚Biomarker Definition Working Group‘ ist ein Biomarker ein objektiv messbarer Indikator für physiologische biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder für eine Antwort auf eine therapeutische Intervention (Biomarkers Definitions Working, 2001). Ziel ist die Nutzung als Marker für Diagnose, Staging, Klassifikation und Prognose sowie als Monitor bei Intervention.

Die ‚Alzheimer’s Biomarker Standardization Initiative‘ (ABSI) hat ihrerseits Anforderungen an Biomarker im Liquor bei AD festgelegt. AD ist begleitet von biochemischen Veränderungen im Gehirn, die sich im Liquor widerspiegeln können. Ein Biomarker sollte hierbei entscheidende Aspekte der Pathologie detektieren, er sollte in neuropathologisch bestätigten AD-Fällen validiert werden und er sollte präzise, zuverlässig, nicht-invasiv sowie einfach und günstig in der Anwendung sein. Des Weiteren sollte er in mindestens zwei unabhängigen Studien jeweils gegen eine Kontrollgruppe untersucht worden sein. Sensitivität und Spezifität sollten dabei über 80 % liegen (The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer’s Association, 1998). Wichtig ist einerseits die Abgrenzung von AD zu Nicht-AD-Demenzen und andererseits die zuverlässige Anwendung schon in frühen Krankheitsstadien. Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen hängt nicht nur der Therapieerfolg, sondern auch die weitere Lebensplanung von einer frühen Diagnose ab. Die Diagnosen werden aus dem Zusammenspiel von klinischem Erscheinungsbild, neuropsychologischer Testung, Bildgebung und krankheitsspezifischen Liquor-Biomarkern gestellt. Gerade frühe oder prodromale Stadien bleiben dennoch häufig unentdeckt.

In Ermangelung einer invasiven Hirngewebe-Untersuchung können durch Kombination verschiedener Biomarker sowohl Sensitivität als auch Spezifität der Diagnostik erhöht werden. MiRNAs erweitern das bestehende Biomarker-Spektrum. Sie sind im Liquor äußerst stabil und können dort als Ausdruck eines krankhaften intrazellulären Geschehens verändert vorliegen. Die Lumbalpunktion zur Liquorgewinnung ist eine günstige und nur wenig invasive Methode, die im klinischen Alltag häufig zum Einsatz kommt. Kontraindikationen sind erhöhter Hirndruck, Deformitäten der Wirbelsäule, eine Blutungsdiathese sowie Infektionen an der Punktionsstelle.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden miRNAs auf ihr Vorkommen bei verschiedenen Erkrankungen des ZNS hin untersucht. Dabei wurde das Vorkommen der let-7-miRNA-Familie

im Liquor insbesondere bei AD in Abgrenzung zu FTD, Depression und CIS analysiert – auch als mögliche Ergänzung zu den etablierten AD-Markern tau und A $\beta$ .

Andere miRNAs sind bereits auf ihre Eignung als Biomarker hin untersucht worden: Cogswell et al. (GlaxoSmithKline) waren die ersten, die in einer Übersichtsuntersuchung von über 200 miRNAs eine unterschiedlich Expression in Gehirn und Liquor bei 10 Patienten mit AD verglichen mit 10 Kontrollpatienten gefunden und hierin ein vielversprechendes Potential für miRNAs als neue Biomarker gesehen haben (Cogswell et al., 2008).

Die Arbeitsgruppe um Lukiw konnte zeigen, dass unter den Nukleinsäuren, die im Liquor nachweisbar sind, miRNAs den größten Teil ausmachen. Nachdem sie die im fetalen, adulten und im AD-Hippocampus unterschiedlich angereicherten miRNAs identifiziert hatten, konzentrierten sie sich in Folgestudien auf diejenigen miRNAs, die eine proinflammatorischer Wirkung aufwiesen (Lukiw, 2007, Alexandrov et al., 2012). Die Analyse von 6 AD-Liquorproben sowie zerebraler Extrazellulärflüssigkeit zeigte eine stärkere Expression der miRNAs miR-9, miR-125b, miR-146a im Vergleich zu 6 Kontrollen. Interessanterweise wurden genau diese miRNAs nach Stimulation von humanen primären neuronal-glialen Co-Kulturen mit AD-Extrazellulärflüssigkeit in den Extrazellulärraum freigesetzt (Alexandrov et al., 2012). Dies ähnelt der in der vorliegenden Arbeit vermuteten Wirkweise von let-7-miRNAs: extrazelluläre miRNAs stoßen eine Signalkaskade an, die wiederum zur Freisetzung weiterer miRNAs führt (Alexandrov et al., 2012, Lehmann et al., 2012).

In einer Arbeit von Müller et al. konnten von 8 miRNAs, die im Hippocampus vorkommen, nur 2 im Liquor von 20 AD-Patienten und 10 Kontrollen detektiert werden: miR-16 und miR-146, wobei miR-146a bei AD verringert vorlag und nicht wie bei Alexandrov beschrieben erhöht. Die miRNA miR-16 war nicht unterschiedlich reguliert. MiR-16 wurde daher als Referenz-miRNA für die qRT-PCR eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit waren die miRNA-Konzentrationen zu gering, als dass man miR-16 zu einer verlässlichen Referenz hätte etablieren können. In einer neueren Veröffentlichung untersuchte die Gruppe um Müller 4 miRNAs, über deren Veränderung im Liquor bei AD bereits in anderen Studien berichtet worden war: miR-27a, miR-29a, miR-29b und miR125b wurden als mögliche Biomarker für AD beschrieben. Dabei konnte nur die Zunahme der Expression von miR-29a bestätigt werden. Der Unterschied in den Ergebnissen wurde mit einer trotz Zentrifugation möglichen Kontamination des Liquors mit Blut erklärt. Sala Frigerio et al. wiesen eine Expressionsabnahme von miR-27a-3p in AD-Liquor nach, wobei niedrige miR-27a-3p-Level mit erhöhtem tau sowie erniedrigtem A $\beta$ -42 korrelierten (Sala Frigerio et al., 2013, Kiko et al., 2014, Muller et al., 2014, Tan et al., 2014, Muller et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Korrelation zwischen tau- oder A $\beta$ 1-42-Konzentrationen und let-7b- oder let-7e-Expression beobachtet. Dies kann möglicherweise auf die zu geringe

Gruppengröße zurückgeführt werden. Um die Zuverlässigkeit der Studie zu erhöhen und um zu ermitteln, ob die let-7-Expression mit dem Stadium oder der Progressionsgeschwindigkeit der AD korreliert, sind weitere Studien mit größeren Patientengruppen erforderlich.

Galimberti et al. haben neben 22 AD-Proben und 26 Kontrollen mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen auch 10 FTD-Proben auf unterschiedlich regulierte miRNAs hin untersucht. Im Gegensatz zu Müller et al. konnten sie dabei eine Herunterregulation von miR-125b bei Patienten mit AD gegenüber einer Kontrollgruppe und Patienten mit FTD bestätigen – sowohl im Serum als auch im Liquor (Galimberti et al., 2014). In der Studie von Galimberti waren die im AD-Liquor regulierten miRNAs in der FTD-Gruppe nicht verändert – wie auch in der vorliegenden Arbeit.

Haghikia et al. untersuchten den Liquor von MS-Patienten. Mit 53 MS- und 39 Kontrollliquores haben sie die bisher größte Liquor-Kohorte untersucht. Dennoch verweisen sie auf die zu geringe Stichprobengröße, die noch keinen Schluss auf einen diagnostischen Marker erlaubt. Sie identifizierten 3 bei MS regulierte miRNAs: miR-181c, miR-633 und miR-922, deren Expression sich zudem zwischen den verschiedenen MS-Formen unterschied (Haghikia et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig miRNAs im Liquor von CIS-Patienten untersucht, wobei hier die miRNA let-7e im Vergleich zur Kontrollgruppe selektiv erhöht war.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist bei Untersuchungen an humanen Proben oft ein Problem. Die Proben selbst weisen eine große Variabilität auf, die durch unterschiedliche Handhabung, Aufbereitung und Konservierung mitverursacht wird. Daher kommt es häufig zu widersprüchlichen oder zumindest abweichenden Ergebnissen. Vor dem Hintergrund einer bisher generell relativ geringen Retest-Reliabilität von miRNA-Biomarkern im AD-Liquor ist es umso bemerkenswerter, dass in der hier vorliegenden Arbeit die Ergebnisse von Lehmann et al., nämlich die Erhöhung von let-7b-Kopienzahlen bei AD, in zwei unterschiedlichen Patientenkohorten reproduziert werden konnten (Lehmann et al., 2012).

Ausgewählte let-7-miRNAs werden bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen unterschiedlich reguliert. Außerdem sind sie im Liquor stabil, was eine standardisierte Detektion erleichtert. Das macht sie attraktiv für neue diagnostische und therapeutische Anwendungen.

Die Entnahme von Liquor ist im klinischen Alltag zwar Routine, noch einfacher in der Anwendung wäre jedoch die Entnahme von peripher venösem Blut. Galimberti et al. beschrieben die Korrelation von AD-spezifischen Liquor-Markern mit Serumproben. Auch Geekiyanage et al. konnten im Serum von AD-Patienten regulierte miRNAs nachweisen (Geekiyanage et al., 2012, Galimberti et al., 2014). In einer Untersuchung der 84 am häufigsten veränderten miRNAs im Serum fanden Galimberti et al. drei miRNAs, die bei AD-Patienten herunterreguliert waren. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob die peripheren

Veränderungen die Verhältnisse im Liquor widerspiegeln: miR-125b- und miR-26b-Konzentration waren bei AD im Vergleich zur Kontrolle sowohl im Serum als auch im Liquor vermindert. Van Harten et al. wiesen sogar eine verminderte Expression von let-7a sowohl im Liquor als auch im Serum von AD-Patienten nach (van Harten et al., 2015). Eine Frage, der man in weiteren Studien nachgehen könnte, wäre demnach, ob auch andere let-7-miRNAs im Serum detektierbar und bei AD verändert sind.

Mit dem Begriff ‚Biomarker‘ sollte jedoch vorsichtig umgegangen werden. Eine Metaanalyse konnte zeigen, dass selbst unter den 3 % der meistzitierten Veröffentlichungen zu potentiellen Biomarkern die meisten Kandidaten letztendlich nicht für den klinischen Einsatz geeignet waren. Hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz überbewertete Ergebnisse waren dabei häufig auf eine zu kleine Stichprobengröße zurückzuführen (Ioannidis et al., 2011).

### 5.2.2 Let-7-MiRNAs als Zielmoleküle in der Therapie

Extrazellulär verabreichte let-7-miRNAs erwiesen sich in dieser Arbeit als neurotoxisch *in vitro* und wurden im Liquor von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen. Eine Inhibition von let-7-miRNA zu therapeutischen Zwecken wäre grundsätzlich zu diskutieren. Zur Ziel-miRNA komplementäre Gegenstrang-Oligonukleotide könnten diese *in vivo* binden und zu einer langfristigen Depletion führen (Krutzfeldt et al., 2005). Auch ganze miRNA-Familien können über eine Basenpaarung mit einem Gegenstrang-Oligonukleotid, das an die spezifische Kern-Region der miRNA-Familie bindet, inhibiert werden (Hullinger et al., 2012).

Bei der Inhibierung von let-7-miRNA wären allerdings schwerwiegende Nebenwirkungen zu erwarten: Let-7-Knock-out-Mäuse sind nicht überlebensfähig. Da let-7-miRNA jedoch eine entscheidende Rolle in der Embryogenese und insbesondere der Neurogenese spielt, könnte die Inhibition im Adulten weniger ausgeprägte Nebenwirkungen zur Folge haben. Let-7-miRNA ist aber auch an der Differenzierung von Zellen beteiligt ist und wirkt zudem tumorsuppressiv, sodass das Fehlen von let-7-miRNA zu übermäßiger und entdifferenzierter Zellproliferation führen und somit letztlich die Entstehung eines Malignoms fördern könnte. Demzufolge sollte einer therapeutischen Inhibition von let-7-miRNA sehr zurückhaltend begegnet werden.

## 5.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Expression der let-7-miRNA-Familie im Liquor von Patienten mit AD, FTD, Depression und CIS systematisch untersucht und quantifiziert. Zugleich wurde die gesamte let-7-miRNA-Familie auf ihre potentiell neurotoxische Wirkung hin untersucht. Die unterschiedliche Fähigkeit der einzelnen let-7-miRNAs, Zelltod zu induzieren, und ihre selektive

Regulation im Liquor von Patienten mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen sind neue Erkenntnisse dieser Arbeit. Die hierbei gewonnenen Einblicke werfen aber auch Fragen auf, die noch nicht beantwortet wurden, in Folgearbeiten aber Berücksichtigung finden sollten:

Wenn let-7b-miRNAs als Liquor-Biomarker etabliert werden sollen, sind weitaus größere Patientenkohorten nötig, in denen die bisherigen Ergebnisse reproduziert und validiert werden müssten. Eine größere Stichprobe wäre notwendig, um Expressionsdaten mit den jeweiligen Krankheitsstadien zu korrelieren und auf stadienspezifische Veränderungen hin zu untersuchen. Neben einer Querschnittsuntersuchung wäre auch eine Studie zum Vorkommen von let-7-miRNA im Verlauf der Erkrankung beim einzelnen Patienten aufschlussreich.

Let-7-miRNAs sind im menschlichen Liquor bei unterschiedlichen ZNS-Erkrankungen spezifisch reguliert, und die Stabilität der let-7-miRNAs im Liquor würde eine Standardisierung der Probengewinnung und -verarbeitung erlauben. Diese Eigenschaften machen let-7-miRNAs zu attraktiven Kandidaten für die Erforschung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien bei neurodegenerativen Erkrankungen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer Demenz (Alzheimer's Disease)
Ago2	Argonaute-2-Protein
ApoE $\epsilon$ 4	Apolipoprotein Allel $\epsilon$ 4
APP	Amyloid-Precursor-Protein
A $\beta$	Amyloid beta
bvFTD	behaviorale FTD
cDNA	complementary (kplementäre) DNA
CIS	Clinically Isolated Syndrome (Klinisch Isoliertes Syndrom)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DemTect	Demenz-Detektion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
E17	Embryonaler Entwicklungstag 17
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EOAD	Early Onset Alzheimer's Disease
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
Flot-1	Flotillin-1
FTD	Fronto-temporale Demenz
FTLD	Fronto-temporale Lobärdegeneration
G	Guanosin
GFAP	glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HDL	high-density-lipoprotein
Hsa	Homo sapiens
LP	Lumbalpunktion
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-2	Microtubule-associated protein 2
MDE	Major Depressive Episode
miRNA	microRNA
MMSE	Mini Mental State Examination
mRNA	messengerRNA



---

MS	Multiple Sklerose
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
NeuN	Neuronal Nuclei
NF	Neurofilament
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
NGS	Normal Goat Serum (Normales Ziegen-Serum)
OD	Optische Dichte
p-tau	phosphoryliertes tau-Protein
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Para-Formaldehyd
PRR	Pattern-recognition receptors
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonuclein acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssRNA	single stranded RNA (einzelsträngige RNA)
t-tau	total tau (gesamtes tau-Protein)
TDP-43	43-kd-TAR-DNA-binding-Protein
TdT	Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	Uridin
ZNS	Zentralnervensystem

## 7 Literaturverzeichnis

Akira, Uematsu and Takeuchi. "Pathogen recognition and innate immunity." Cell 2006;**124**(4): 783-801.

Alexandrov, Dua, Hill, Bhattacharjee, Zhao and Lukiw. "microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF)." Int J Biochem Mol Biol 2012;**3**(4): 365-373.

Alexopoulos, Meyers, Young, Mattis and Kakuma. "The course of geriatric depression with "reversible dementia": a controlled study." Am J Psychiatry 1993;**150**(11): 1693-1699.

Alzheimer's Disease International (2009). World Alzheimer Report, ADI.

Ambros, Bartel, Bartel, Burge, Carrington, Chen, Dreyfuss, Eddy, Griffiths-Jones, Marshall, Matzke, Ruvkun and Tuschl. "A uniform system for microRNA annotation." RNA 2003;**9**(3): 277-279.

Ballard, Gauthier, Corbett, Brayne, Aarsland and Jones. "Alzheimer's disease." Lancet 2011;**377**(9770): 1019-1031.

Baraniskin, Kuhnhen, Schlegel, Chan, Deckert, Gold, Maghnouj, Zollner, Reinacher-Schick, Schmiegel, Hahn and Schroers. "Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system." Blood 2011;**117**(11): 3140-3146.

Baraniskin, Kuhnhen, Schlegel, Schmiegel, Hahn and Schroers. "MicroRNAs in cerebrospinal fluid as biomarker for disease course monitoring in primary central nervous system lymphoma." Journal of Neuro-Oncology 2012;**109**(2): 239-244.

Biomarkers Definitions Working. "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." Clin Pharmacol Ther 2001;**69**(3): 89-95.

Brennecke, Stark, Russell and Cohen. "Principles of microRNA-target recognition." PLoS Biol 2005;**3**(3): e85.

Brettschneider, Petzold, Junker and Tumani. "Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis." Mult Scler 2006;**12**(2): 143-148.

Burgos, Javaherian, Bompreszi, Ghaffari, Rhodes, Courtright, Tembe, Kim, Metpally and Van Keuren-Jensen. "Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing." RNA 2013;**19**(5): 712-722.

Calabrese, Rinaldi, Mattisi, Bernardi, Favaretto, Perini and Gallo. "The predictive value of gray matter atrophy in clinically isolated syndromes." Neurology 2011;**77**(3): 257-263.

Calin, Dumitru, Shimizu, Bichi, Zupo, Noch, Aldler, Rattan, Keating, Rai, Rassenti, Kipps, Negrini, Bullrich and Croce. "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 2002;**99**(24): 15524-15529.

- Chang, Yu, Lee, Wentzel, Arking, West, Dang, Thomas-Tikhonenko and Mendell. "Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis." Nat Genet 2008;**40**(1): 43-50.
- Chen, Liang, Zhang, Zen and Zhang. "Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications." Protein Cell 2012;**3**(1): 28-37.
- Chen and Qin. "General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development." RNA Biol 2015;**12**(7): 701-708.
- Chen, Ridzon, Broomer, Zhou, Lee, Nguyen, Barbisin, Xu, Mahuvakar, Andersen, Lao, Livak and Guegler. "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR." Nucleic Acids Res 2005;**33**(20): e179.
- Chevillet, Kang, Ruf, Briggs, Vojtech, Hughes, Cheng, Arroyo, Meredith, Gallichotte, Pogosova-Agadjanian, Morrissey, Stirewalt, Hladik, Yu, Higano and Tewari. "Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A 2014;**111**(41): 14888-14893.
- Cogswell, Ward, Taylor, Waters, Shi, Cannon, Kelnar, Kempainen, Brown, Chen, Prinjha, Richardson, Saunders, Roses and Richards. "Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways." Journal of Alzheimers Disease 2008;**14**(1): 27-41.
- de Souza, Lamari, Belliard, Jardel, Houillier, De Paz, Dubois and Sarazin. "Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias." J Neurol Neurosurg Psychiatry 2011;**82**(3): 240-246.
- Denzer, Kleijmeer, Heijnen, Stoorvogel and Geuze. "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." J Cell Sci 2000;**113 Pt 19**: 3365-3374.
- Devanand, Sano, Tang, Taylor, Gurland, Wilder, Stern and Mayeux. "Depressed mood and the incidence of Alzheimer's disease in the elderly living in the community." Arch Gen Psychiatry 1996;**53**(2): 175-182.
- Dubois, Feldman, Jacova, Dekosky, Barberger-Gateau, Cummings, Delacourte, Galasko, Gauthier, Jicha, Meguro, O'Brien, Pasquier, Robert, Rossor, Salloway, Stern, Visser and Scheltens. "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." Lancet Neurol 2007;**6**(8): 734-746.
- Dubois, Feldman, Jacova, Hampel, Molinuevo, Blennow, DeKosky, Gauthier, Selkoe, Bateman, Cappa, Crutch, Engelborghs, Frisoni, Fox, Galasko, Habert, Jicha, Nordberg, Pasquier, Rabinovici, Robert, Rowe, Salloway, Sarazin, Epelbaum, de Souza, Vellas, Visser, Schneider, Stern, Scheltens and Cummings. "Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria." Lancet Neurol 2014;**13**(6): 614-629.
- Fava, Graves, Benazzi, Scalia, Iosifescu, Alpert and Papakostas. "A cross-sectional study of the prevalence of cognitive and physical symptoms during long-term antidepressant treatment." J Clin Psychiatry 2006;**67**(11): 1754-1759.
- Ferri, Prince, Brayne, Brodaty, Fratiglioni, Ganguli, Hall, Hasegawa, Hendrie, Huang, Jorm, Mathers, Menezes, Rimmer, Scazufca and Alzheimer's Disease. "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet 2005;**366**(9503): 2112-2117.

- Fisniku, Brex, Altmann, Miszkiel, Benton, Lanyon, Thompson and Miller. "Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis." Brain 2008;**131**(Pt 3): 808-817.
- Forsbach, Nemorin, Montino, Muller, Samulowitz, Vicari, Jurk, Mutwiri, Krieg, Lipford and Vollmer. "Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses." J Immunol 2008;**180**(6): 3729-3738.
- Galimberti, Villa, Fenoglio, Serpente, Ghezzi, Cioffi, Arighi, Fumagalli and Scarpini. "Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease." Journal of Alzheimers Disease 2014;**42**(4): 1261-1267.
- Galton, Patterson, Xuereb and Hodges. "Atypical and typical presentations of Alzheimer's disease: a clinical, neuropsychological, neuroimaging and pathological study of 13 cases." Brain 2000;**123 Pt 3**: 484-498.
- Gascon, Lynch, Ruan, Almeida, Verheyden, Seeley, Dickson, Petrucelli, Sun, Jiao, Zhou, Jakovcevski, Akbarian, Yao and Gao. "Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia." Nat Med 2014;**20**(12): 1444-1451.
- Geekiyange, Jicha, Nelson and Chan. "Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease." Exp Neurol 2012;**235**(2): 491-496.
- Grapp, Wrede, Schweizer, Huwel, Galla, Snaidero, Simons, Buckers, Low, Urlaub, Gartner and Steinfeld. "Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma." Nat Commun 2013;**4**: 2123.
- Griffiths-Jones, Saini, van Dongen and Enright. "miRBase: tools for microRNA genomics." Nucleic Acids Res 2008;**36**: D154-D158.
- Gyorgy, Szabo, Pasztoi, Pal, Misjak, Aradi, Laszlo, Pallinger, Pap, Kittel, Nagy, Falus and Buzas. "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles." Cell Mol Life Sci 2011;**68**(16): 2667-2688.
- Haghikia, Haghikia, Hellwig, Baraniskin, Holzmann, Decard, Thum and Gold. "Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study." Neurology 2012;**79**(22): 2166-2170.
- Hardy. "Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved?" Curr Alzheimer Res 2006;**3**(1): 71-73.
- Hardy and Higgins. "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science 1992;**256**(5054): 184-185.
- Harvey, Skelton-Robinson and Rossor. "The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years." J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003;**74**(9): 1206-1209.
- Heil, Hemmi, Hochrein, Ampenberger, Kirschning, Akira, Lipford, Wagner and Bauer. "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science 2004;**303**(5663): 1526-1529.

- Hemmi, Kaisho, Takeuchi, Sato, Sanjo, Hoshino, Horiuchi, Tomizawa, Takeda and Akira. "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol 2002;**3**(2): 196-200.
- Hill. "The Environment and Disease: Association or Causation?" Proc R Soc Med 1965;**58**: 295-300.
- Holtzman, Bales, Tenkova, Fagan, Parsadanian, Sartorius, Mackey, Olney, McKeel, Wozniak and Paul. "Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 2000;**97**(6): 2892-2897.
- Hornberger, Piguet, Graham, Nestor and Hodges. "How preserved is episodic memory in behavioral variant frontotemporal dementia?" Neurology 2010;**74**(6): 472-479.
- Hullinger, Montgomery, Seto, Dickinson, Semus, Lynch, Dalby, Robinson, Stack, Latimer, Hare, Olson and van Rooij. "Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury." Circ Res 2012;**110**(1): 71-81.
- Hutvagner, McLachlan, Pasquinelli, Balint, Tuschl and Zamore. "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science 2001;**293**(5531): 834-838.
- ICD-10-GM (2016). ICD-10-GM  
Version 2016 Systematisches Verzeichnis  
Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision - German Modification -, Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG).
- Ioannidis and Panagiotou. "Comparison of effect sizes associated with biomarkers reported in highly cited individual articles and in subsequent meta-analyses." JAMA 2011;**305**(21): 2200-2210.
- Johnson, Grosshans, Shingara, Byrom, Jarvis, Cheng, Labourier, Reinert, Brown and Slack. "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." Cell 2005;**120**(5): 635-647.
- Kaul, Habel, Derkow, Kruger, Franzoni, Wulczyn, Bereswill, Nitsch, Schott, Veh, Naumann and Lehnardt. "Expression of Toll-like receptors in the developing brain." Plos One 2012;**7**(5): e37767.
- Kawai and Akira. "Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors." Trends Mol Med 2007;**13**(11): 460-469.
- Kawai and Akira. "TLR signaling." Semin Immunol 2007;**19**(1): 24-32.
- Kiko, Nakagawa, Tsuduki, Furukawa, Arai and Miyazawa. "MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease." Journal of Alzheimers Disease 2014;**39**(2): 253-259.
- Kiloh. "Pseudo-dementia." Acta Psychiatr Scand 1961;**37**: 336-351.
- Kosik, Joachim and Selkoe. "Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A 1986;**83**(11): 4044-4048.

- Kozomara and Griffiths-Jones. "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." Nucleic Acids Res 2014;**42**(D1): D68-D73.
- Kozomara and Griffiths-Jones. "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." Nucleic Acids Res 2014;**42**(Database issue): D68-73.
- Kramer-Albers, Bretz, Tenzer, Winterstein, Mobius, Berger, Nave, Schild and Trotter. "Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?" Proteomics Clin Appl 2007;**1**(11): 1446-1461.
- Kroh, Parkin, Mitchell and Tewari. "Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)." Methods 2010;**50**(4): 298-301.
- Krutzfeldt, Rajewsky, Braich, Rajeev, Tuschl, Manoharan and Stoffel. "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." Nature 2005;**438**(7068): 685-689.
- Lachenal, Pernet-Gallay, Chivet, Hemming, Belly, Bodon, Blot, Haase, Goldberg and Sadoul. "Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity." Mol Cell Neurosci 2011;**46**(2): 409-418.
- Laemmli. "Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4." Nature 1970;**227**(5259): 680-688.
- Lagos-Quintana, Rauhut, Yalcin, Meyer, Lendeckel and Tuschl. "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Current Biology 2002;**12**(9): 735-739.
- Lee, Ahn, Han, Choi, Kim, Yim, Lee, Provost, Radmark, Kim and Kim. "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature 2003;**425**(6956): 415-419.
- Lee, Feinbaum and Ambros. "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." Cell 1993;**75**(5): 843-854.
- Lehmann, Kruger, Park, Derkow, Rosenberger, Baumgart, Trimbuch, Eom, Hinz, Kaul, Habbel, Kalin, Franzoni, Rybak, Nguyen, Veh, Ninnemann, Peters, Nitsch, Heppner, Golenbock, Schott, Ploegh, Wulczyn and Lehnardt. "An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration." Nat Neurosci 2012;**15**(6): 827-835.
- Lehnardt, Lachance, Patrizi, Lefebvre, Follett, Jensen, Rosenberg, Volpe and Vartanian. "The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS." J Neurosci 2002;**22**(7): 2478-2486.
- Lehnardt, Massillon, Follett, Jensen, Ratan, Rosenberg, Volpe and Vartanian. "Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 2003;**100**(14): 8514-8519.
- Lim, Lau, Weinstein, Abdelhakim, Yekta, Rhoades, Burge and Bartel. "The microRNAs of Caenorhabditis elegans." Genes Dev 2003;**17**(8): 991-1008.
- Lu, Getz, Miska, Alvarez-Saavedra, Lamb, Peck, Sweet-Cordero, Ebert, Mak, Ferrando, Downing, Jacks, Horvitz and Golub. "MicroRNA expression profiles classify human cancers." Nature 2005;**435**(7043): 834-838.

- Lukiw. "Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus." Neuroreport 2007;**18**(3): 297-300.
- Ma, Li, Chiu, Wang, Sloane, Lu, Kosaras, Sidman, Volpe and Vartanian. "Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis." J Cell Biol 2006;**175**(2): 209-215.
- Machida, Ohkubo and Yokota. "Circulating microRNAs in the cerebrospinal fluid of patients with brain diseases." Methods Mol Biol 2013;**1024**: 203-209.
- McKhann, Drachman, Folstein, Katzman, Price and Stadlan. "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." Neurology 1984;**34**(7): 939-944.
- McKhann, Knopman, Chertkow, Hyman, Jack, Kawas, Klunk, Koroshetz, Manly, Mayeux, Mohs, Morris, Rossor, Scheltens, Carrillo, Thies, Weintraub and Phelps. "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement 2011;**7**(3): 263-269.
- Melo, Sugimoto, O'Connell, Kato, Villanueva, Vidal, Qiu, Vitkin, Perelman, Melo, Lucci, Ivan, Calin and Kalluri. "Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis." Cancer Cell 2014;**26**(5): 707-721.
- Miller, Chard and Ciccarelli. "Clinically isolated syndromes." Lancet Neurol 2012;**11**(2): 157-169.
- Miska, Alvarez-Saavedra, Townsend, Yoshii, Sestan, Rakic, Constantine-Paton and Horvitz. "Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain." Genome Biol 2004;**5**(9): R68.
- Mitchell, Parkin, Kroh, Fritz, Wyman, Pogosova-Agadjanyan, Peterson, Noteboom, O'Briant, Allen, Lin, Urban, Drescher, Knudsen, Stirewalt, Gentleman, Vessella, Nelson, Martin and Tewari. "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A 2008;**105**(30): 10513-10518.
- Montecalvo, Larregina, Shufesky, Stolz, Sullivan, Karlsson, Baty, Gibson, Erdos, Wang, Milosevic, Tkacheva, Divito, Jordan, Lyons-Weiler, Watkins and Morelli. "Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes." Blood 2012;**119**(3): 756-766.
- Mülhardt (2009). Der Experimentator, Molekularbiologie/Geomics. Heidelberg, Spektrum.
- Muller, Jakel, Bruinsma, Claassen, Kuiperij and Verbeek. "MicroRNA-29a Is a Candidate Biomarker for Alzheimer's Disease in Cell-Free Cerebrospinal Fluid." Mol Neurobiol 2015.
- Muller, Kuiperij, Claassen, Kusters and Verbeek. "MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid." Neurobiol Aging 2014;**35**(1): 152-158.
- Negoescu, Guillermet, Lorimier, Brambilla and Labat-Moleur. "Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity." Biomed Pharmacother 1998;**52**(6): 252-258.
- Newman, Thomson and Hammond. "Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing." RNA 2008;**14**(8): 1539-1549.

- Nilsen. "Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells." Trends Genet 2007;**23**(5): 243-249.
- Noseworthy, Lucchinetti, Rodriguez and Weinshenker. "Multiple sclerosis." N Engl J Med 2000;**343**(13): 938-952.
- Olsen, Klausen, Helboe, Nielsen and Werge. "MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats." Plos One 2009;**4**(10): e7225.
- Palma, Yaddanapudi, Pigati, Havens, Jeong, Weiner, Weimer, Stern, Hastings and Duelli. "MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles." Nucleic Acids Res 2012;**40**(18): 9125-9138.
- Pasquinelli, Reinhart, Slack, Martindale, Kuroda, Maller, Hayward, Ball, Degan, Muller, Spring, Srinivasan, Fishman, Finnerty, Corbo, Levine, Leahy, Davidson and Ruvkun. "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature 2000;**408**(6808): 86-89.
- Patz, Trattnig, Grunbacher, Ebner, Gully, Novak, Rinner, Leitinger, Absenger, Tomescu, Thallinger, Fasching, Wissa, Archelos-Garcia and Schafer. "More than Cell Dust: Microparticles Isolated from Cerebrospinal Fluid of Brain Injured Patients Are Messengers Carrying mRNAs, miRNAs, and Proteins." Journal of Neurotrauma 2013;**30**(14): 1232-1242.
- Peltier and Latham. "Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues." RNA 2008;**14**(5): 844-852.
- Peng, Yuan, Wu, He, Hu and Luo. "MicroRNA let-7e Is a Potential Circulating Biomarker of Acute Stage Ischemic Stroke." Transl Stroke Res 2015;**6**(6): 437-445.
- Perry and Miller. "Frontotemporal dementia." Semin Neurol 2013;**33**(4): 336-341.
- Pick. "Ueber die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie." Prager Medicinische Wochenzeitschrift 1892.
- Pigati, Yaddanapudi, Iyengar, Kim, Hearn, Danforth, Hastings and Duelli. "Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells." Plos One 2010;**5**(10).
- Polman, Reingold, Banwell, Clanet, Cohen, Filippi, Fujihara, Havrdova, Hutchinson, Kappos, Lublin, Montalban, O'Connor, Sandberg-Wollheim, Thompson, Waubant, Weinshenker and Wolinsky. "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." Ann Neurol 2011;**69**(2): 292-302.
- Ponomarev, Veremeyko, Barteneva, Krichevsky and Weiner. "MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway." Nat Med 2011;**17**(1): 64-70.
- Raber, Huang and Ashford. "ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology." Neurobiol Aging 2004;**25**(5): 641-650.
- Rajendran, Honsho, Zahn, Keller, Geiger, Verkade and Simons. "Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A 2006;**103**(30): 11172-11177.



- Rascovsky, Hodges, Knopman, Mendez, Kramer, Neuhaus, van Swieten, Seelaar, Dopper, Onyike, Hillis, Josephs, Boeve, Kertesz, Seeley, Rankin, Johnson, Gorno-Tempini, Rosen, Prioleau-Latham, Lee, Kipps, Lillo, Piguet, Rohrer, Rossor, Warren, Fox, Galasko, Salmon, Black, Mesulam, Weintraub, Dickerson, Diehl-Schmid, Pasquier, Deramecourt, Lebert, Pijnenburg, Chow, Manes, Grafman, Cappa, Freedman, Grossman and Miller. "Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia." Brain 2011;**134**(Pt 9): 2456-2477.
- Ratnavalli, Brayne, Dawson and Hodges. "The prevalence of frontotemporal dementia." Neurology 2002;**58**(11): 1615-1621.
- Ravnikilde, Videbech, Clemmensen, Egander, Rasmussen and Rosenberg. "Cognitive deficits in major depression." Scand J Psychol 2002;**43**(3): 239-251.
- Rehfeld, Rohde, Nguyen and Wulczyn. "Lin28 and let-7: ancient milestones on the road from pluripotency to neurogenesis." Cell Tissue Res 2015;**359**(1): 145-160.
- Reinhart, Slack, Basson, Pasquinelli, Bettinger, Rougvie, Horvitz and Ruvkun. "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature 2000;**403**(6772): 901-906.
- Ruby, Jan, Player, Axtell, Lee, Nusbaum, Ge and Bartel. "Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*." Cell 2006;**127**(6): 1193-1207.
- Sala Frigerio, Lau, Salta, Tournoy, Bossers, Vandenberghe, Wallin, Bjerke, Zetterberg, Blennow and De Strooper. "Reduced expression of hsa-miR-27a-3p in CSF of patients with Alzheimer disease." Neurology 2013;**81**(24): 2103-2106.
- Sampson, Rong, Han, Yang, Aris, Soteropoulos, Petrelli, Dunn and Krueger. "MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells." Cancer Res 2007;**67**(20): 9762-9770.
- Sanders, Holdenrieder, Walgenbach-Brunagel, von Ruecker, Kristiansen, Muller and Ellinger. "Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma." Int J Urol 2012;**19**(11): 1017-1025.
- Sarkar, Parkin, Wyman, Bendoraite, Sather, Delrow, Godwin, Drescher, Huber, Gentleman and Tewari. "Quality assessment and data analysis for microRNA expression arrays." Nucleic Acids Res 2009;**37**(2): e17.
- Scarmeas, Brandt, Blacker, Albert, Hadjigeorgiou, Dubois, Devanand, Honig and Stern. "Disruptive behavior as a predictor in Alzheimer disease." Arch Neurol 2007;**64**(12): 1755-1761.
- Schwarz, Hutvagner, Du, Xu, Aronin and Zamore. "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell 2003;**115**(2): 199-208.
- Seelaar, Kamphorst, Rosso, Azmani, Masdjedi, de Koning, Maat-Kievit, Anar, Donker Kaat, Breedveld, Dooijes, Rozemuller, Bronner, Rizzu and van Swieten. "Distinct genetic forms of frontotemporal dementia." Neurology 2008;**71**(16): 1220-1226.
- Shastri, Basu and Rajadhyaksha. "Neuroblastoma cell lines--a versatile in vitro model in neurobiology." Int J Neurosci 2001;**108**(1-2): 109-126.

- Sheinerman and Umansky. "Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies." Front Cell Neurosci 2013;**7**: 150.
- Sheline, Gado and Kraemer. "Untreated depression and hippocampal volume loss." Am J Psychiatry 2003;**160**(8): 1516-1518.
- Shepherd, McCann and Halliday. "Variations in the neuropathology of familial Alzheimer's disease." Acta Neuropathol 2009;**118**: pp 37–52.
- Snowden, Neary and Mann. "Frontotemporal lobar degeneration: clinical and pathological relationships." Acta Neuropathol 2007;**114**(1): 31-38.
- Stern. "Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease." Lancet Neurol 2012;**11**(11): 1006-1012.
- Street, Barran, Mackay, Weidt, Balmforth, Walsh, Chalmers, Webb and Dear. "Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid." J Transl Med 2012;**10**: 5.
- Takamizawa, Konishi, Yanagisawa, Tomida, Osada, Endoh, Harano, Yatabe, Nagino, Nimura, Mitsudomi and Takahashi. "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." Cancer Res 2004;**64**(11): 3753-3756.
- Tan, Yu, Liu, Tan, Zhang, Hu, Wang, Sun, Jiang and Tan. "Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease." J Neurol Sci 2014;**336**(1-2): 52-56.
- The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and. "Consensus Report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". 1998.
- Trapp, Peterson, Ransohoff, Rudick, Mork and Bo. "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis." N Engl J Med 1998;**338**(5): 278-285.
- Uhlmann, Ryte and Peyman. "Studies on the mechanism of stabilization of partially phosphorothioated oligonucleotides against nucleolytic degradation." Antisense & Nucleic Acid Drug Development 1997;**7**(4): 345-350.
- Valadi, Ekstrom, Bossios, Sjostrand, Lee and Lotvall. "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol 2007;**9**(6): 654-659.
- van Harten, Mulders, Scheltens, van der Flier and Oudejans. "Differential Expression of microRNA in Cerebrospinal Fluid as a Potential Novel Biomarker for Alzheimer's Disease." Journal of Alzheimers Disease 2015;**47**(1): 243-252.
- Vickers, Palmisano, Shoucri, Shamburek and Remaley. "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." Nat Cell Biol 2011;**13**(4): 423-433.
- Wan, Liu, Wang, Wu, Liu, Zhou, Liu and Zhang. "Identification of differential microRNAs in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder." Plos One 2015;**10**(3): e0121975.
- Wang, Zhang, Weber, Baxter and Galas. "Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells." Nucleic Acids Res 2010;**38**(20): 7248-7259.

Weber, Baxter, Zhang, Huang, Huang, Lee, Galas and Wang. "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem 2010;**56**(11): 1733-1741.

WHO (2012). Dementia: a public health priority.

Wulczyn, Smirnova, Rybak, Brandt, Kwidzinski, Ninnemann, Strehle, Sefler, Schumacher and Nitsch. "Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification." Faseb Journal 2007;**21**(2): 415-426.

Yew, Alladi, Shailaja, Hodges and Hornberger. "Lost and forgotten? Orientation versus memory in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." Journal of Alzheimers Disease 2013;**33**(2): 473-481.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Rosa Rößling, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Die let-7-miRNA-Familie: Untersuchung ihres Vorkommens in humanem Liquor bei neurodegenerativen Erkrankungen und ihrer neurotoxischen Wirkung *in vitro*‘ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe ‚Uniform Requirements for Manuscripts (URM)‘ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Rosa Rößling hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Katja Derkow\*, **Rosa Rössling\***, Carola Schipke, Christina Krüger, Jakob Bauer, Michael Fähling, Andrea Stroux, Eckart Schott, Oliver Peters, Seija Lehnardt  
Distinct expression of the neurotoxic microRNA family let-7 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Plos One 2018;16;13(7):e0200602

### **\*geteilte Erstautorenschaft**

Beitrag im Einzelnen: Ich habe die Studie gemeinsam mit Dr. rer. nat. Katja Derkow und Prof. Dr. med. Seija Lehnardt geplant und ausgearbeitet. Die methodischen Grundlagen habe ich selbstständig unter Supervision von Dr. rer. nat. Katja Derkow etabliert. Sämtliche Versuche habe ich eigenständig durchgeführt (Isolation sämtlicher RNA und Durchführung aller PCR-Versuche, zudem selbstständige Durchführung aller Zellkultur-Experimente und aller immunhistochemischen Färbungen sowie deren mikroskopische Auswertung). Die erhobenen Daten habe ich sämtlich selbstständig aufgearbeitet und mit graphischer Darstellung der Ergebnisse asugewertet. Die Ergebnisse habe ich kritisch analysiert und die entscheidenden Aussagen der Studie einschließlich ihrer Limitationen gemeinsam in der Diskussion mit Prof. Dr. med. Seija Lehnardt und den anderen Co-Autoren herausgearbeitet. Das zur Publikation führende Manuskript habe ich gemeinsam mit Prof. Dr. med. Seija Lehnardt und Dr. rer. nat. Katja Derkow ausgearbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

## Weitere Veröffentlichungen, Poster und Kongressbeiträge

**Rosa Rössling**, Deborah Pehl, Michael Lingnau, Harald Prüss.

A case of CLIPPERS challenging the new diagnostic criteria. *Brain* 2018;1;141(2):e12.

**Rosa Rössling**, Katja Derkow, Carola Schipke, Christina, Krüger, Jakob Bauer, Klemens Ruprecht, Oliver Peters, Seija Lehnardt.

Specific expression of the neurotoxic microRNA family *let-7* in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. XII. European Meeting on Glial Health and Disease, Bilbao. 2015.

**Rosa Rössling**, René Dittrich, Emily A. Decelle, Chin-lee Wu, W Scott McDougal, Leo L Cheng.

Assessing Prostate Cancer Growth with Citrate Measured by Intact Tissue Proton Magnetic Resonance Spectroscopy, International Society for Magnetic Resonance in Medicine. Annual Meeting, Melbourne, 2012.

**Rosa Rössling**, Johannes Kurth, Emily A. Decelle, Chin-lee Wu, W Scott McDougal, Leo L Cheng.

Metabolomic characterization of human prostate cancer with intact tissue MRS, International Society for Magnetic Resonance in Medicine. Annual Meeting, Melbourne, 2012.

## Lebenslauf

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

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



## Danksagung

Zuallererst richtet sich mein Dank an Prof. Dr. med. Seija Lehnardt, die mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mit der Bearbeitung des Themas dieser Arbeit betraut hat. Ihre Begeisterungsfähigkeit für die Wissenschaft und für Diskussionen über Versuchsergebnisse hat mich nicht nur motiviert, sondern auch mein Wissenschaftsverständnis grundlegend geprägt.

Genauso möchte ich Dr. rer. nat. Katja Derkow danken, die mich im Laboralltag betreut, sich für meine zahlreichen Fragen immer Zeit genommen und mir geholfen hat, so manche unerwartete Schwierigkeit zu meistern.

Schließlich gilt mein herzlichster Dank allen Mitarbeitern der AG Lehnardt für die wissenschaftlich anregenden gemeinsamen Diskussionen und für die Hilfe bei kleinen und großen Fragen.

Ich danke dem Graduiertenkolleg des SFB TRR 43 ‚The brain as a target of inflammatory processes‘ für finanzielle und ideelle Förderung.

Danke an Eva-Margarete Spur für den Austausch und die Korrektur. Danke an Lucas Eigel für wiederholte Korrektur in Sprache und Form. Und danke an meine Eltern für die geduldige Unterstützung über die gesamte Zeit.