

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

DISSERTATION

EXPRESSION UND FUNKTION VON UNC93B1  
IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM

EXPRESSION AND FUNCTION OF UNC93B1  
IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Markus Klammer

Datum der Promotion: 25.06.2023



## Vorwort

Teile dieser Arbeit wurden bereits hier veröffentlicht:

Klammer, M., Dzaye, O., Wallach, T., Krüger, C., Gaessler, D., Buonfiglioli, A., Derkow, K., Kettenmann, H., Brinkmann, M. M., & Lehnardt, S. (2021). UNC93B1 Is Widely Expressed in the Murine CNS and Is Required for Neuroinflammation and Neuronal Injury Induced by MicroRNA *let-7b*. *Frontiers in Immunology*, 12, 71577.



## Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	3
Inhaltsverzeichnis .....	5
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Zusammenfassung.....	12
Abstract.....	13
<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>14</b>
1.1 Grundlagen des Immunsystems von Säugern .....	14
1.2 Angeborene und adaptive Immunantwort.....	14
1.3 Toll-Like-Rezeptoren .....	16
1.4 TLR-Aktivierung und Signalweg.....	19
1.5 Nukleotid-erkennende TLRs: die Grenze zwischen Selbst und Fremd .....	20
1.6 Das Chaperon UNC93B1 .....	21
1.7 TLRs vermitteln Neurodegeneration .....	23
1.8 Ein endogener TLR7-Ligand: die MikroRNA <i>let-7b</i> .....	25
1.9 Fragestellung.....	26
<b>2. Material und Methodik .....</b>	<b>27</b>
2.1 Medien und Puffer .....	27
2.2 Versuchstiere .....	29
2.3 Zellstimulation und Toxizitätsversuche .....	29
2.4 Komplexierung der RNA-Oligonukleotide.....	30
2.5 RNA-Isolation und DNase-Verdau .....	30
2.6 cDNA-Synthese .....	31
2.7 RT-PCR (SYBR-Green).....	32
2.8 Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS).....	33

2.9 Präparation primärer Neuronenkulturen .....	33
2.10 Präparation primärer Mikroglia- und Astrozytenkulturen .....	35
2.11 Herstellung von Kokulturen aus Neuronen und Mikroglia.....	35
2.12 Zelllinien.....	35
2.13 Immunzytochemie und Immunhistochemie.....	36
2.13.1. Verwendete Antikörper.....	36
2.14 Perfusion von Mäusen.....	37
2.15 Herstellung von Gewebeschnitten .....	37
2.16 TUNEL-Färbung.....	38
2.17 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) .....	38
2.18 Intrathekale Injektion von RNA in Mäuse .....	39
2.19 Quantifizierung von Neuronen und apoptotischen Zellen nach intrathekaler Injektion ..	40
2.20 Statistische Analyse .....	40
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.1 UNC93B1 wird von verschiedenen Zellpopulationen im ZNS exprimiert .....	41
3.2 UNC93B1 wird von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen <i>in vivo</i> exprimiert.....	45
3.3 Die Expression von UNC93B1 steigt mit fortschreitender Gehirnentwicklung an.....	46
3.4 Die Expression von UNC93B1 in Mikroglia und Neuronen nach Stimulation der TLRs 3, 4 und 7 wird <i>in vitro</i> hochreguliert .....	48
3.5 Die Freisetzung von inflammatorischen Molekülen aus Mikroglia nach Stimulation mit <i>let-7b</i> erfordert die Expression von UNC93B1 <i>in vitro</i> .....	51
3.6 <i>Let-7b</i> -induzierter, Mikroglia-vermittelter neuronaler Zelltod erfordert UNC93B1 <i>in vitro</i> .....	52
3.7 Zellautonomer, Caspase-3-positiver Zelltod von Neuronen nach Stimulation mit <i>let-7b</i> erfordert UNC93B1-Expression <i>in vitro</i> .....	55
3.8 Die <i>let-7b</i> -induzierte Neurodegeneration erfordert UNC93B1 <i>in vivo</i> .....	60
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>63</b>
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>

<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>80</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>82</b>
<b>Publikationsliste</b> .....	<b>83</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>84</b>
<b>Bescheinigung über statistische Beratung</b> .....	<b>85</b>

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i> Toll-Like-Rezeptoren .....	18
<i>Abbildung I:</i> Intrazellulärer TLR-Signalweg.....	20
<i>Tabelle 2:</i> Antikörper.....	34
<i>Abbildung II:</i> Gehirnschnitte.....	38
<i>Abbildung 1:</i> Expression von UNC93B1-RNA.....	41
<i>Abbildung 2:</i> UNC93B1-Antikörper-Verifikation.....	42
<i>Abbildung 3:</i> Expression von UNC93B1-Protein.....	43
<i>Abbildung 4:</i> Expression von UNC93B1 in kultivierten ZNS-Zellen.....	44
<i>Abbildung 5:</i> Expression von UNC93B1 in Gehirnschnitten.....	45
<i>Abbildung 6:</i> Expression von UNC93B1 in der Gehirnentwicklung.....	47
<i>Abbildung 7:</i> Expression von UNC93B1 in der Gehirnentwicklung.....	48
<i>Abbildung 8:</i> Expression von UNC93B1-RNA nach TLR-Stimulation.....	49
<i>Abbildung 9:</i> Expression von UNC93B1-Protein nach TLR-Stimulation.....	50
<i>Abbildung 10:</i> Dosisabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach TLR-Stimulation.....	51
<i>Abbildung 11:</i> Zeitabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach TLR-Stimulation.....	52
<i>Abbildung 12:</i> Konformationsänderung der Mikroglia nach TLR-Stimulation.....	53
<i>Abbildung 13:</i> Neuronenviabilität nach TLR-Stimulation in Kokulturen.....	54
<i>Abbildung 14:</i> Quantifizierung der Neuronenviabilität nach TLR-Stimulation.....	54
<i>Abbildung 15:</i> Axonaler Schaden nach TLR-Stimulation.....	56
<i>Abbildung 16a:</i> Neuronenviabilität nach TLR-Stimulation in Neuronenkulturen .....	56
<i>Abbildung 16b:</i> Quantifizierung der Neuronenviabilität nach TLR-Stimulation.....	57
<i>Abbildung 17:</i> Quantifizierung der neuronalen Apoptose nach TLR-Stimulation.....	58
<i>Abbildung 18:</i> Quantifizierung der Caspase-3-positiven Neurone nach TLR-Stimulation.....	59

*Abbildung 19a*: Neuronale Viabilität nach TLR-Stimulation in Gehirnschnitten.....60  
*Abbildung 19b*: Quantifizierung der neuronalen Viabilität in Gehirnschnitten.....61  
*Abbildung 20*: Axonale Dichte in Gehirnschnitten nach TLR-Stimulation.....61  
*Abbildung 21*: Quantifizierung der Apoptose in Gehirnschnitten nach TLR-Stimulation .....62



## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AD	Alzheimer-Demenz
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANOVA	Analysis Of Variance (Varianzanalyse)
APC	Antigen Presenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)
CNS	Central Nervous System (zentrales Nervensystem)
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole dihydrochloride
DC	Dendritic Cells (dentritische Zellen)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dsRNA	double-stranded RNA (doppelsträngige RNA)
ECLE	Exfoliative-Cutaneous Lupus Erythematodes
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HPH	Hypoxie-assoziierte Pulmonalarterielle Hypertension
HSP	Heat-Shock-Protein
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IFN	Interferon

IL	Interleukin
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cells (induzierte pluripotente Stammzellen)
IRAK-1	Interleukin-1-Rezeptorassoziierte Kinase 1
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LaGetSi	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX	Loxoribine
MAP3	Mitogen-aktivierende-Proteinkinase-Kinase-Kinase
MCMV	Murines Zytomegalievirus
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	MikroRNA
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MS	Multiple Sklerose
MVB	Multivesicular Bodies (multivesikuläre Körperchen)
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88
NA	Nucleic Acids (Nukleinsäuren)
NGS	Normal Goat Serum (normales Ziegen Serum)
NK	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-Like Rezeptor
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NOS	Reaktive Stickstoff-Spezies
NPC	Neurogenic Progenitor Cells (neurogene Progenitorzellen)
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PB	Phosphate Buffer (Phosphatpuffer)

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PBMC	Peripheral Blood Monocytic Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Parkinson's Disease (Parkinson-Erkrankung)
PFA	Paraformaldehyd
PolyI:C	Poly-Inosinsäure-Poly-Cytidinsäure
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoff-Spezies)
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SARM	Sterile-alpha and Armadillo Motif Containing Protein
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
ssRNA	single-stranded RNA (einzelsträngige RNA)
TAB	TAK-bindende Kinase
TAK	TGF $\beta$ -aktivierende Kinase
TIR	Toll/ Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRAF	TNF-Rezeptor-Assoziierter Faktor
TRAM	TRIF-related Adaptor Molecule
TRIF	TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon- $\beta$
TUNEL	Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
ZNS	zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) erkennen grundsätzlich pathogene und wirtseigene Mustermoleküle von Viren und Bakterien. Endosomale TLRs binden virale doppelsträngige (ds)RNA (TLR3), einzelsträngige (ss)RNA (TLR7/8) und CpG-DNA (TLR9) sowie wirtseigene MikroRNAs wie *let-7b* (TLR7). Zur Aktivierung der endosomalen TLRs wird UNC93B1 benötigt, ein intrazelluläres Chaperon, welches den Transport dieser Rezeptoren vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Endosom übernimmt. Mikroglia, die primären Immunzellen des ZNS, aber auch Neurone exprimieren TLRs. Über die Expression von UNC93B1 im ZNS war bisher nichts bekannt.

Mittels PCR, FACS und Immunhistochemie sollte die Expression und Regulation von UNC93B1 in verschiedenen Zelltypen des ZNS untersucht werden. Mittels Toxizitätsversuche *in vitro* und intrathekaler Injektion von *let-7b in vivo* sollte die Rolle von UNC93B1 bei der *let-7b*-vermittelten Neurodegeneration analysiert werden.

UNC93B1 ist in allen Zellen des ZNS exprimiert und wird durch Stimulation von TLR3, 4 und 7 auf RNA- und Proteinebene hochreguliert. Die durch TLR7 induzierte Neuroinflammation in Mikroglia ist abhängig von UNC93B1. Neuronales UNC93B1 ist notwendig für die TLR7-vermittelte Neurodegeneration durch *let-7b* und UNC93B1 in Mikroglia exazerbiert diesen Effekt *in vitro*. Intrathekale Injektion von WT-Mäusen mit *let-7b* führt zu UNC93B1-abhängiger Neurodegeneration *in vivo*.

Zusammengefasst wird UNC93B1 in verschiedenen ZNS-Zellpopulationen differenziert exprimiert und stellt einen unverzichtbaren Bestandteil von TLR7-gesteuerter Neurodegeneration *in vitro* und *in vivo* dar.

## Abstract

Toll-like receptors (TLRs) recognize pathogen-associated and endogenous patterns. Endosomal TLRs are activated by viral double-stranded (ds)RNA (TLR3), single-stranded (ss)RNA (TLR7/8) and CpG-DNA (TLR9), but also host-derived microRNAs, such as *let-7b*. Their activation depends on the chaperone protein UNC93B1, which mediates TLR transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the endosomal compartment. Microglia, the resident immune cells of the central nervous system (CNS), but also neurons, express TLRs. Activation of neuronal TLR7 by *let-7b* mediates neurodegeneration. Currently, nothing is known about the expression of UNC93B1 in the CNS.

I aimed at analyzing the expression and regulatory pattern of UNC93B1 in different CNS cell populations by employing PCR, FACS and immunohisto-/cytochemistry. Furthermore, I investigated the role of UNC93B1 in *let-7b*-dependent neurodegeneration performing toxicity assays *in vitro* and intrathecal injection of microRNAs and TLR agonists in mice.

UNC93B1 RNA and protein was readily detectable in all CNS cells and undergoes upregulation upon stimulation of TLR3, 4 and 7. TLR7-induced neuroinflammation through microglia is dependent on UNC93B1. Neuronal UNC93B1 is necessary for *let-7b*-induced neurodegeneration through TLR7, and microglial UNC93B1 exacerbates neuronal injury in this context *in vitro*. Intrathecal injection of *let-7b* causes neurodegeneration *in vivo* in WT, but not UNC93B1-deficient mice.

In summary, UNC93B1 is differentially expressed in CNS cells and a key player of TLR7-mediated neuroinflammation and neurodegeneration *in vitro* and *in vivo*.

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Grundlagen des Immunsystems von Säugern

Das Immunsystem ist ein System aus zellulären und humoralen, angeborenen und erworbenen Komponenten, welches mit schnellen, spezifischen und protektiven Reaktionen den Organismus von Vertebraten gegen eine Vielzahl von potenziell pathogenen Mikroorganismen abschirmt. Abgesehen von der Abwehr eindringender Pathogene kommt dem Immunsystem auch eine Kontrollfunktion hinsichtlich dysplastischer und dysfunktionaler Zellen zu. Ein dysreguliertes Immunsystem kann zu einer Reihe von autoimmunen Phänomenen und Krankheitsbildern führen, unter anderem Diabetes mellitus Typ 1, multipler Sklerose (MS), rheumatoider Arthritis (RA) und inflammatorischen Darmerkrankungen (Paul, 2013).

## 1.2 Angeborene und adaptive Immunantwort

Die meisten Pathogene werden von einer Reihe von Mechanismen abgewehrt, welche effektiv, aber unspezifisch sind. Diese Mechanismen begannen sich bereits vor über 700 Mio. Jahren herauszubilden (Litman and Cooper, 2007) und sind über zahlreiche Tierspezies in hoher Homologie erhalten, was nicht nur für ihre Effektivität, sondern auch für ihre Vielseitigkeit spricht (Yatim and Lakkis, 2015). Da alle dazugehörigen Komponenten Keimbahn-kodiert sind und somit von Geburt an mehr oder weniger voll funktionstüchtig sind, werden diese Abläufe unter dem *angeborenen Immunsystem* zusammengefasst. Zum angeborenen Immunsystem zählen unter anderem Phagozyten, welche eindringende Pathogene anhand ihrer spezifischen Moleküle erkennen. Die Detektion erfolgt mittels Muster-erkennender Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors), zum Beispiel Toll-like Receptors (TLRs) und Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptors (NOD-like Receptors) (Janeway and Medzhitov, 2002). Phagozytierende Zellen des Menschen sind hauptsächlich neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Eindringende Mikroben werden nach Erkennung in intrazelluläre Vesikel eingeschlossen (Phagozytose) und mittels bakterizider Substanzen kontrolliert abgetötet. Muster-erkennende Rezeptoren, vor allem TLRs, sind außerdem die Schlüsselmoleküle, mit welchen der Organismus zwischen Selbst- und Fremdanitigen unterscheidet. Eine Fehlregulation verbunden mit vermehrtem Erkennen von Selbstantigenen kann daher zum Auftreten von autoimmunen Reaktionen führen (Lemaitre et al., 1996).

Neben diesen zellulären Komponenten gibt es auch angeborene humorale Mechanismen wie das Komplementsystem (Rink, 2012). Dieses stellt ein hochwirksames System aus einer Reihe nicht-aktiver Proteine dar, welche extrazellulär angesiedelt sind. In der Gegenwart eines Pathogens oder eines Antikörpers, welcher an ein Pathogen gebunden hat, werden diese Proteine kaskadenartig aktiviert. Dies führt letzten Endes zu Formierung des Membranangriffkomplexes, welcher eine Pore in der Membran der befallenen Zelle bildet und so eine Zellyse herbeiführt.

Trotz all dieser effektiven Strategien bietet das angeborene Immunsystem nur einen unvollständigen Schutz vor Pathogenen, vor allem aber bildet sich kein nennenswertes Immungedächtnis (Netea et al., 2011). Auch nach mehrfachem Kontakt mit demselben Pathogen startet das angeborene Immunsystem immer wieder von Neuem. Außerdem können Muster-erkennende Rezeptoren zwar zwischen Selbst- und Fremdanitigenen unterscheiden, aber nicht zwischen schädlichen und nützlichen Fremdanitigenen, z. B. den Kommensalen der Darmflora.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für ein spezifischeres und feineres Immunsystem, welches sich vor ca. 450 Mio. Jahren herauszubilden begann (Laird et al., 2000). Hauptakteure sind hierbei B- und T-Lymphozyten, welche Pathogene ebenfalls mittels Oberflächenrezeptoren erkennen, im Unterschied zu den Zellen des angeborenen Immunsystems dies aber mit höchster Spezifität machen. B-Zell-Rezeptoren bestehen aus einer Antigen-bindenden Untereinheit in Form eines membrangebundenen Immunglobulinmoleküls und einer Signaltransduktionsuntereinheit. Die Gene, welche Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren kodieren, sind allerdings nicht in der Keimbahn festgelegt, sondern das Produkt eines molekularen Mechanismus, welcher als somatische Rekombination bekannt ist: Während der Lymphozyten-Reifung werden durch genetisches Splicing, Kombinieren und Verlinken aus einer limitierten Anzahl von Genen eine gleichsam unendliche Vielfalt an Rezeptoren geschaffen (Gearhart, 2004). Da diese Rezeptoren nicht Keimbahn-kodiert sind, sondern erst während der Lymphozyten-Differenzierung entstehen, nennt man diesen Anteil des Immunsystems auch das adaptive oder erworbene Immunsystem.

Sobald ein Lymphozyt das für ihn spezifische Antigen erkennt, kommt es zu einer expansiven Zellteilung, welche die spezifische Erkennung und Zerstörung des Pathogens zum Ziel hat. Dieser Vorgang wird als klonale Expansion bezeichnet. B-Zellen entwickeln sich zu Plasmazellen, welche massenhaft lösliche, Antigen-spezifische Antikörper bilden. T-Zellen hingegen differenzieren zu spezifischen Helfer- oder Effektor-Zellen (Josefowicz et al., 2012) (Mauri and Bosma, 2012). Sobald die Infektion eingedämmt wurde, stirbt ein Großteil dieser

Zellen ab, die wenigen überlebenden werden zu langlebigen Gedächtniszellen. Bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Pathogen werden diese dann rekrutiert, um schnell und spezifisch darauf zu reagieren.

Das angeborene und das erworbene Immunsystem kommunizieren über spezialisierte Phagozyten, welche eindringende Pathogene auflesen, in kleine Fragmente spalten und diese dann als Antigene den Lymphozyten präsentieren. Die am besten untersuchten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) sind die dendritischen Zellen (DCs), welche mit langen Zellausläufern die unmittelbare Umgebung nach Mikroben und Pathogenen absuchen. Sie präsentieren nicht nur Antigene über Major-Histocompatibility-Complex Typ 2 (Parham, 2005), sondern sorgen mit kostimulatorischen Signalen auch für die nötige Aktivierung der Lymphozyten. Diese Signale sind notwendig, um die klonale Expansion der B-Zellen und die Differenzierung der T-Zellen anzustoßen (Zhu and Chen, 2009).

Das Immunsystem in Vertebraten ist nur deshalb so effektiv, weil angeborene und erworbene Mechanismen eng verknüpft miteinander arbeiten. Von Geburt an exprimierte Muster-erkennende Rezeptoren wie TLRs und NLRs sind höchst sensitiv, die ausgelöste Reaktion, nämlich Phagozytose und Inflammation, aber wenig spezifisch. T- und B-Zellen sind durch ihre große Rezeptorvariabilität kaum sensitiv und als erste Barriere völlig ungeeignet; wenn aber aktiviert, sind sie mit höchster Spezifität zur effektiven Eliminierung eindringender Mikroben fähig.

### 1.3 Toll-Like-Rezeptoren

Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) sind Keimbahn-kodierte Transmembranproteine, welche über die Erkennung von molekularen Mustern eindringende Pathogene erkennen können und das angeborene Immunsystem aktivieren (Ignacio et al., 2005). Sie werden auf vielen Zellen des Immunsystems exprimiert, darunter DCs, Makrophagen, natürlichen Killerzellen, T- und B-Lymphozyten und Mikroglia. Sie sind aber auch auf nicht-immunologischen Zellen wie epithelialen Zellen, endothelialen Zellen, Fibroblasten und Neuronen zu finden (Akira et al., 2006, Kaul et al., 2012). Dabei haben verschiedene Immunzellen einen unterschiedlichen Rezeptorbesatz. In Mäusen sind nach aktuellem Kenntnisstand 12 verschiedene TLRs exprimiert, im Menschen zählt man bislang 10 (Vidya et al., 2018).

TLRs sind Typ-I-Transmembranproteine, was bedeutet, dass sie die Plasmamembran einmal durchspannen, wobei der N-Terminus im Extrazellulärraum liegt. Ihre molekulare Struktur ist dreigeteilt: erstens der extrazellulär liegende N-Terminus mit Leucin-reichen Repeats mit einer charakteristischen Hufeisenform, welcher die Liganden erkennt, zweitens eine



membranspannende Region und drittens eine C-terminale, globuläre, zytoplasmatische Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Signaldomäne (TIR-Domäne), welche das intrazelluläre Signaling initiiert (Gay and Gangloff, 2007).

TLRs können unter anderem nach ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle eingeteilt werden. Einige werden nur auf der Zellmembran exprimiert, andere nur in intrazellulären Kompartimenten wie dem Endosom. Die einzelnen TLRs erkennen verschiedene molekulare Muster. Einige Mitglieder der TLR-Familie erkennen große Moleküle wie Proteine oder Lipidbestandteile aus Bakterien und Pilzen an der Zelloberfläche, dazu gehören beispielsweise TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 (Nishiya and DeFranco, 2004, Ahmad-Nejad et al., 2002, Latz et al., 2002). Andere TLRs wiederum erkennen virale und bakterielle Nukleotide, welche von Immunzellen über Endozytose in das Endosom aufgenommen werden. Dort werden sie beispielsweise von TLR3, TLR7, TLR8 sowie TLR9 erkannt. Bisher maß man ihnen eine hohe Bedeutung in der Erkennung von viraler RNA und DNA bei (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Trotzdem erkennen TLRs nicht nur Fremdantigene. Es wurden auch zahlreiche wirtseigene Moleküle identifiziert, welche verschiedene TLRs aktivieren. Im Gegensatz zu Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) werden diese als Danger-Associated Molecular Pattern (DAMPs) bezeichnet. Zu diesen DAMPs gehören beispielsweise Heat-Shock-Proteine (HSP), Proteine der extrazellulären Matrix und mRNAs (Kariko et al., 2004). Heat-Shock-Protein 60, welches von geschädigten Neuronen freigesetzt wird, wird beispielsweise von TLR4 in Mikroglia erkannt und aktiviert so Mechanismen, welche zu Neurodegeneration führen (Lehnhardt et al., 2008). Ebenso wird die MikroRNA *let-7b* von sterbenden Neuronen freigesetzt und stimuliert TLR7 der benachbarten Neurone und Mikroglia, was wiederum zu Neurodegeneration führt (Lehmann et al., 2012).

Ursprünglich wurde das Toll-Protein in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) entdeckt. Dort ist es für die korrekte Ausbildung der dorsoventralen Achse verantwortlich (Anderson et al., 1985). Da man aber mit der Zeit auch eine auffällige Ähnlichkeit mit dem Interleukin-1 (IL-1)-Signalweg in Säugern feststellte, lag die Vermutung nahe, dass das Toll-Genprodukt in der Fruchtfliege auch immunologische Funktionen übernimmt. Studien ergaben, dass es in Fruchtfliegen bei der Abwehr von Pilzerkrankungen eine Rolle spielt (Stein et al., 1991). In Säugern übernimmt das Toll-Genprodukt nach heutigem Kenntnisstand nur die immunologische Funktion.

Wie bereits erwähnt, erkennen TLRs spezifische Muster, welche in der untenstehenden Tabelle aufgelistet sind (die Tabelle wurde in abgeänderter Form aus dem Review-Artikel von Dominic de Nardo übernommen (De Nardo, 2015))

**Tabelle 1** TLRs erkennen spezifische Muster.

Rezeptor	Lokalisation	Mikrobieller Ligand	Endogener Ligand	Synthetischer Ligand
TLR1	Plasmamembran	Triacyl-Lipoproteine	Unbekannt	Pam3CSK4
TLR2	Plasmamembran	Lipoproteine, Peptidoglykane, Lipoteichonsäure	Versican	Pam2CSK4, Pam3CSK4
TLR3	Endolysosomale Membran	Virale, doppelsträngige RNA	mRNA	PolyI:C, PolyA:U
TLR4	Plasma- und endolysosomale Membran	Lipopolysaccharide	Oxidiertes Low-Density-Lipoprotein (LDL), Amyloid- $\beta$	Lipid-A-Derivate
TLR5	Plasmamembran	Flagellin	Unbekannt	Rekombinantes Flagellin
TLR6	Plasmamembran	Diacyl-Lipoproteine, Lipoteichonsäure	Oxidiertes Low-Density-Lipoprotein (LDL), Amyloid- $\beta$ , Versican	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid <sup>2</sup> , synthetische Diacyl-Lipoproteine, PAM2CSK4
TLR7	Endolysosomale Membran	Virale und bakterielle einzelsträngige RNA	Immunkomplexe, wirtseigene RNA (z. B. <i>let-7b</i> )	Loxoribine, Thiazosquinoline und Imidazoquinoline (Imiquimod, R848)
TLR8	Endolysosomale Membran	Virale und bakterielle einzelsträngige RNA		
TLR9	Endolysosomale Membran	Virale und bakterielle CpG-	Chromatin-IGG-Immunkomplexe, wirtseigene DNA	CpG-Oligodesoxynukleotide Klasse A, B und C

DNA, DNA-RNA-  
Hybride

TLR10	Plasmamembran	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt
TLR11	Endolysosomale Membran	Profilin und Flagellin	Unbekannt	Unbekannt
TLR12	Endolysosomale Membran	Flagellin	Unbekannt	Unbekannt
TLR13	Endolysosomale Membran	Bakterielle 23S-Ribosomen-RNA (rRNA)	Unbekannt	Von 23S-rRNA-stammendes Oligoribonukleotid

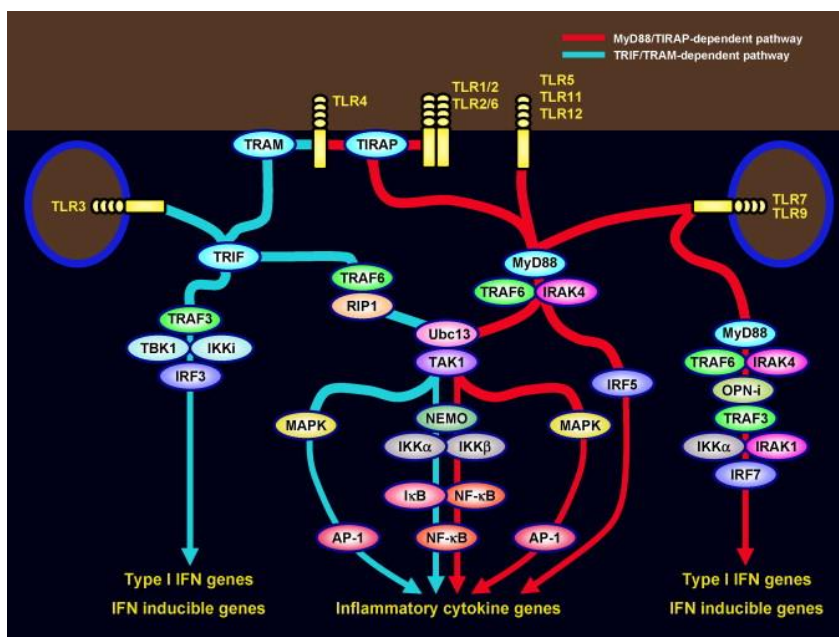
#### 1.4 TLR-Aktivierung und Signalweg

Wie oben beschrieben, ist die intrazelluläre TIR-Domäne von TLRs für die Signalinitiierung nach Ligandenbindung verantwortlich. Bei den meisten TLRs führt die Ligandenbindung als erstes zu einer Rezeptordimerisierung (Gay et al., 2006), die endosomalen TLRs hingegen sind meist schon als präformierte Dimere vorhanden (Tanji et al., 2013). Diese Dimerisierung hat Konformationsänderungen innerhalb der TIR-Domäne zur Folge, welche den Ligand-Rezeptor-Komplex stabilisiert und zum Recruitment von TIR-Adaptorproteinen führen. Dieses Recruitment initiiert die intrazelluläre Signalkaskade. Es sind bisher 5 Adaptorproteine bekannt: MyD88, MAL (auch bekannt als TIRAP), TRIF, TRAM und SARM (O'Neill and Bowie, 2007). Diese initiieren im Allgemeinen zwei große Kaskaden, die entweder MyD88- oder TRIF-abhängig sind, und die am Ende oft, aber nicht ausschließlich, zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen oder Typ-I-Interferonen führen.

Das Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (MyD88) ist das am besten beschriebene TLR-Adaptorprotein. Es besitzt selbst eine TIR-Domäne am C-Terminus, während der N-Terminus mit einer Death Domain ausgestattet ist. Es wird von allen bekannten TLRs als Adaptor rekrutiert, außer von TLR3 (Deguine and Barton, 2014). Nach Ligandenbindung treten die TIR-Domänen des TLRs und von MyD88 in Kontakt. Dieser Kontakt führt dazu, dass das N-terminale Ende von MyD88 sich mit seiner Death Domain neben die Death Domain von IRAK-4 (Interleukin-Rezeptor-1-assoziierte-Kinase 4) anordnet. Man nennt diesen Komplex von TLR, MyD88 und IRAK-4 das Myddosom (vgl. Abb. A) (Lin et al., 2010). Während dieser Komplexierung aktiviert IRAK-4 durch Phosphorylierung IRAK-1, welches sich dann selbst mehrmals autophosphoryliert. Dieses assoziiert im Anschluss mit

TRAF-6 (TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6). Im nächsten Schritt interagiert TRAF-6 mit drei verschiedenen Mitogen-aktivierenden-Proteinkinase-Kinase-Kinasen (MAP3-Kinasen): TGF $\beta$ -aktivierende Kinase 1 (TAK1), TAK-bindende Kinase 1 (TAB1) und TAB2.

Sobald TAK1 aktiviert wird, bewirkt dies eine Aktivierung von I- $\kappa$ B-Kinasen (I- $\kappa$ BK) und damit die Phosphorylierung des Inhibitors von  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Wang et al., 2001). Dieser war bisher an den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B gebunden und dissoziiert nun von ihm ab, wodurch letzter in den Zellkern translozieren kann, um die Transkription von proinflammatorischen Genen, beispielsweise TNF- $\alpha$ , zu fördern (Gay and Gangloff, 2007).



**Abbildung I** TLRs werden aktiviert und führen über MyD88 oder TRIF zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Illustration aus Kawai and Akira, 2007).

## 1.5 Nukleotid-erkennende TLRs: die Grenze zwischen Selbst und Fremd

TLRs können an der äußeren Zelloberfläche oder intrazellulär am Endosom lokalisiert sein. Die endosomalen TLRs 3, 7/8, 9 und 13 erkennen hochspezifisch virale und bakterielle Nukleinsäuren (*nucleic acids*, NA) und werden deshalb auch als NA-erkennende TLRs bezeichnet. TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), TLR7 und 8 erkennen einzelsträngige RNA (ssRNA) und TLR9 erkennt CpG-reiche DNA. CpG-DNA bezeichnet Nukleinsäuren mit hohem Anteil an Cytosin und Guanin, welche typischerweise in Bakterien vorkommen. TLR13, welcher bisher nur in Mäusen, nicht aber in Menschen nachweisbar ist, erkennt ribosomale RNA (rRNA) (Oldenburg et al., 2012).

Das Erkennen von mikrobiellen Nukleinsäuren ist essenziell für eine effektive Immunität, birgt aber auch die Gefahr, wirtseigene Nukleinsäuren zu erkennen und dadurch autoimmune Reaktionen zu generieren. Es ist daher von höchster Wichtigkeit, eine fälschliche Aktivierung dieser TLRs zu verhindern. Dies geschieht auf drei verschiedene Arten:

Erstens sind NA-erkennende TLRs endosomal lokalisiert. Auf diese Weise wird ein Kontakt zu wirtseigenen Nukleinsäuren weitgehend minimiert (Barton et al., 2006).

Zweitens sind die NA-erkennenden TLRs ohne eine Aktivierung durch Proteolyse nicht funktionell. Dies ist ein weiterer Kontrollmechanismus, der sicherstellt, dass diese TLRs nur im richtigen Kompartiment aktiviert werden und die für sie vorgesehene Funktion erfüllen können. Die notwendigen Enzyme, zum Beispiel Kathepsin, sind nur im sauren pH der späten Endosomen und Lysosomen aktiv (Ewald et al., 2011, Ishii et al., 2014).

Drittens wird auch die Expression der *Tlr*-Gene streng reguliert, da allein die Überexpression zu einer exzessiven Stimulation führen kann, was am Beispiel von TLR7 gezeigt wurde: die Erhöhung der *Tlr7*-Genkopiennummer führt zu einer autoimmunen Reaktion (Deane et al., 2007, Pisitkun et al., 2006).

Da die NA-erkennenden TLRs also erst im vorgesehenen Kompartiment beim richtigen pH durch Proteolyse aktiv werden können, ist der Transport der unreifen TLRs hin zu diesen Kompartimenten ebenfalls ein wichtiger Regulationsschritt. Der Weg aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Syntheseort der TLRs, verläuft im Allgemeinen über den Golgi-Apparat, wo sie für ihr Endziel markiert werden. Dabei spielt das Trafficking-Protein UNC93B1 eine wichtige Rolle. Ohne UNC93B1 verbleiben die NA-erkennenden TLRs im ER und können so nicht im Endosom durch Proteolyse reifen (Brinkmann et al., 2007). Ein weiteres Protein namens LRRC59 sorgt dafür, dass die NA-erkennenden TLRs auf COP-II-Vesikel geladen und damit transportfähig werden. Auf welche Weise die genannten Proteine diese Transporterfunktion konkret ausführen, ist allerdings nicht bekannt.

## 1.6 Das Chaperon UNC93B1

UNC93B1 in Säugetieren ist ein 512 Aminosäuren langes, mit 12 Transmembrandomänen versehenes, glykosyliertes Protein des ER (Brinkmann et al., 2007). Es kontrolliert das Trafficking der NA-erkennenden TLRs 3, 7 und 9 und des bisher wenig beschriebenen TLR13. Es wird vermutet, dass UNC93B1 für die Lokalisierung von intrazellulären TLRs an die Zielorganelle, etwa das späte Endosom, zuständig ist. Mutationen in diesem Protein führen dazu, dass die genannten TLRs es nicht schaffen, das ER zu verlassen, und die Signalkaskade wird nicht erfolgreich ausgelöst (Kim et al., 2008). TLRs der äußeren Zellmembran hingegen

waren von dieser Mutation als unberührt beschrieben. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Spezifität von UNC93B1 für die TLRs 3, 7 und 9 von den Transmembrandomänen der genannten TLRs abhängt, da chimäre TLRs 3 und 9, welche mit den TLR4-Transmembrandomänen ausgestattet wurden, nicht mit UNC93B1 interagieren (Brinkmann et al., 2007). In neueren Artikeln wurde beschrieben, dass UNC93B1 auch an der Lokalisierung des Flagellin-erkennenden TLR5 auf der äußeren Plasmamembran beteiligt ist (Huh et al., 2014). UNC93B1 ist auch für das Gleichgewicht zwischen TLR7- und TLR9-Aktivierung durch kompetitive Hemmung verantwortlich, was für die Beschränkung von TLR7-vermittelten Autoimmunreaktionen sorgt (Fukui et al., 2011)

Humanes UNC93B1 besitzt eine Region mit einer schwachen Homologie zum bakteriellen ABC-Typ-2-Transporter und eine weitere Region, welche eine gewisse Ähnlichkeit mit dem bakteriellen Transporter MelB aufweist. Es wird daher auch vermutet, dass humanem UNC93B1 auch eine Transporterfunktion zukommt, beispielsweise um TLRs zur effizienten Erkennung von Aktivatoren richtig auszurichten.

Erste Daten über die Funktion von UNC93B1 kommen aus einer Studie von Tabeta et al (2006). Darin wird beschrieben, dass ein genetisches Vorwärts-Screening mit N-Ethyl-N-Nitrosurea-induzierten Keimbahnmutationen einen neuen Mausgenotyp erzeugt hat, welcher als *3d* (triple D) bezeichnet wurde. *3d* deutet darauf hin, dass diese Tiere Defekte in der TLR-Signalkaskade der TLRs 3, 7 und 9 besaßen, allesamt intrazelluläre, NA-erkennende TLRs. Des Weiteren war in diesen Mäusen die Antigenpräsentation durch MHC I und II vermindert. Als Ursache dafür wurde eine Punktmutation im polytopen Membranprotein UNC93B1 (Histidin-zu-Arginin-Substitution, H412R) in der Transmembrandomäne 9 ausfindig gemacht. Mäuse mit dieser Mutation waren anfälliger für Infektion mit dem Maus-Cytomegalie-Virus (MCMV), *L. monocytogenes* und *S. aureus* (Tabeta et al., 2006).

Über das von dieser Mutation betroffene Protein UNC93B1 war bis dahin nicht viel bekannt. Das UNC93B1-kodierende Gen, *Unc-93*, kommt phylogenetisch bereits im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* vor und kodiert dort die regulatorische Untereinheit eines zweiporigen Kaliumkanals, welcher wahrscheinlich an der koordinierten Muskelkontraktion beteiligt ist. Eine Mutation in diesem Gen führt zu Motilitätsdefekten: das namensgebende Element *unc* weist auf diese fehlende muskuläre Koordination hin – *uncoordinated* (Levin and Horvitz, 1992). Die anderen Komponenten des Kaliumkanals sind durch die Gene *sup-9* und *sup-10* kodiert, wobei das *sup-10*-Genprodukt wahrscheinlich auch eine regulatorische Aufgabe übernimmt. Im Kontext von Säugern hat das Genprodukt von *Unc-93* jedoch ganz andere Aufgaben übernommen, da Mäuse mit einem Defekt in diesem Gen keinerlei

Motilitätseinschränkungen, wohl aber Immundefekte zeigen. Die genetische Übereinstimmung von UNC93 in *C. elegans* und UNC93B1 in Säugetieren beträgt nur 18 % (Huang et al., 2008). Außerdem ist kein Äquivalent für *sup-10* in Säugetieren bekannt. Auch scheint es keine Kalium-transportierende Aufgabe zu übernehmen, da die Kaliumkonzentration im ER von Mäusen ähnlich der zytosolischen Konzentration ist (Tabeta et al., 2006).

In Säugetieren gibt es mehrere Homologe von UNC93. Die am besten charakterisierten sind zum einen UNC93A, bei dem 32 % der Aminosäuresequenz identisch mit dem *C. elegans* UNC93 sind, und zum anderen UNC93B, bei dem 20 % der Aminosäuresequenz identisch mit dem *C. elegans* UNC93 sind. Zwischen Mensch und Maus sind beide Proteine mit einer Aminosäureübereinstimmung von 71 % für UNC93A und 90 % für UNC93B hochkonserviert. Im Menschen sind beide als Transmembranproteine beschrieben, wobei UNC93A in der Plasmamembran lokalisiert zu sein scheint (Kashuba et al., 2002, Liu et al., 2002).

Über UNC93B1 im Menschen war bis vor wenigen Jahren nur bekannt, dass Defekte in diesem Protein mit der Ätiologie von Herpes-Simplex-Typ-1-Enzephalitis, einer potentiell tödlich verlaufenden Infektion des ZNS, in Verbindung stehen (Casrouge et al., 2006). In Analogie mit den Daten aus dem Mausmodell wurde auch bei Patient\*innen mit HSV-1-Enzephalitis eine verminderte Zytokinproduktion nach Stimulation der TLRs 3, 7, 8 und 9 nachgewiesen, was die Anfälligkeit für virale Infektionen erhöht.

In der Folge wurde UNC93B1 in weitere klinische Kontexte eingeordnet. Monozyten aus peripherem Blut (peripheral blood monocytic cells, PBMCs) von Patient\*innen mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) exprimieren signifikant mehr UNC93B1 als Monozyten gesunder Kontrollproband\*innen (Nakano et al., 2010). Außerdem korreliert diese Hochregulierung bei SLE-Patient\*innen mit der Krankheitsaktivität—je aktiver der SLE, desto höher die Expression von UNC93B1.

## 1.7 TLRs vermitteln Neurodegeneration

Mikroglia repräsentieren die primären Immunzellen des ZNS. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von eindringenden Mikroben und sind daher mit zahlreichen TLRs ausgestattet, mindestens TLR1–9 (Iribarren et al., 2002), womit sie nicht nur PAMPs erkennen, sondern auch Signale abgeben, welche weitere Immunzellen rekrutieren und das adaptive Immunsystem alarmieren. Astrozyten hingegen exprimieren im *steady state* normalerweise sehr geringe, fast nicht nachweisbare Mengen an TLRs. Nach Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  oder IFN- $\beta$  aber wird beispielsweise die

Expression von humanem TLR3 rapide hochreguliert (Farina et al., 2005). Dasselbe wurde für die mRNAs von TLRs 2, 4, 5 und 9 in murinen Astrozytenkulturen nach Stimulation mit den geeigneten TLR-Liganden gezeigt (Bowman et al., 2003).

Im Hinblick auf die TLR-Expression im ZNS zeigte sich, dass auch Neurone die TLRs 1–9 (Tang et al., 2007) und 11–13 (Mishra et al., 2008) exprimieren, wobei auch hier ähnlich wie bei Gliazellen nicht immer alle TLRs gleichzeitig exprimiert werden (Kim et al., 2007, Ma et al., 2007) .

Eine TLR-Aktivierung im ZNS hat gewebserhaltende oder gewebserstörende Auswirkungen zur Folge. TLRs initiieren proinflammatorische Signalwege im Falle von eindringenden Pathogenen, können aber auch in Abwesenheit von Mikroben aktiviert werden (Lehnardt, 2010).

Im Falle von bakterieller Meningitis wird TLR4 in Mikroglia durch Bestandteile oder Toxine von gramnegativen Bakterien aktiviert. Die Aktivierung von TLR4 kann zu einer Schädigung von Oligodendrozyten und Neuronen führen (Lehnardt et al., 2002, Lehnardt et al., 2003). Dies scheint unter anderem über die Produktion von reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) und reaktiver Stickstoff-Spezies (NOS) zu funktionieren. Die intrathekale Injektion des synthetischen TLR2-Liganden Pam3CysSK4 in Mäusen löst eine TLR2-abhängige Neurodegeneration aus (Hoffmann et al., 2007).

TLRs können auch in Abwesenheit von mikrobiellen Liganden aktiviert werden: Beispielsweise wurden erhöhte Expressionslevel von TLRs in Gehirnen von Patient\*innen mit Alzheimer-Demenz (AD) (Liu et al., 2005), amyotropher Lateralsklerose (ALS) und Parkinson-Erkrankung (Parkinson's Disease, PD) (van Noort and Bsibsi, 2009, Lee et al., 2015) nachgewiesen.

Untersuchungen der Plaque-assoziierten Mikroglia von AD-Patient\*innen zeigen, dass diese Immunzellen eine erhöhte Expression von TLR2, 4, 5, 7 und 9 aufweisen (Liu et al., 2005, Walter et al., 2007, Jana et al., 2008, Letiembre et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass die TLRs der Mikroglia bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass das Heat-Shock-Protein 60 (HSP60) aus sterbenden Neuronen austritt und mittels TLR4 Mikroglia aktivieren kann (Lehnardt et al., 2008). Über einen MyD88-abhängigen Signalweg wird neurotoxisches NO gebildet, was wiederum den neuronalen Schaden vergrößert. Dies könnte einen sich selbst verstärkenden Kreislauf bilden, in welchem ein initialer neuronaler Schaden gesetzt wird, wodurch endogene TLR-Liganden in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Diese aktivieren die umliegenden Mikroglia weiter, was zu weiterem neuronalen Schaden führt. *In vitro* wird MyD88 in Mikroglia von nekrotischen



Neuronen aktiviert, was zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt (Pais et al., 2008).

Gewebe- oder lokalisationspezifische TLR7-Expression konnte in AD- (Expression im Kortex) und ALS-Mausmodellen (Expression im Rückenmark) nachgewiesen werden (Letiembre et al., 2009). TLR7-Aktivierung in Neuronen ist außerdem ein Mechanismus für zellautonome Neurodegeneration. Der TLR7-Agonist Loxoribine, ein Guanosin-Analogon, induziert TLR7-abhängig neuronalen und axonalen Schaden im zerebralen Kortex (Rosenberger et al., 2014).

Im Schlaganfallmodell der Maus wurde festgestellt, dass Wildtyp (WT)-Mäuse nach zerebraler Ischämie 30 % mehr neuronalen Schaden erleiden als TLR2-defiziente-Mäuse (Lehnardt et al., 2007). Demnach sind TLRs nicht nur in infektiösen und autoimmunen, sondern auch in ischämischen Kontexten in neuronaler Schädigung involviert.

Es wurde allerdings auch beschrieben, dass die proinflammatorische Reaktion von Mikroglia zum Priming weiterer Mikroglia führt, welche wiederum den inflammatorischen Schaden begrenzen und zur Geweberegeneration beitragen sollen (Glezer et al., 2007). Dies wird zum Beispiel durch Entfernen von Zelltrümmern und Debris bewerkstelligt, welche nach der akuten Inflammation eine weitere Immunreaktion triggern könnten. Wie dieses feine Gleichgewicht zwischen Neurodegeneration und Neuroregeneration konkret zustande kommt, ist jedoch unbekannt.

### 1.8 Ein endogener TLR7-Ligand: die MikroRNA *let-7b*

Es ist hinreichend bekannt, dass TLRs nicht nur von exogenen, also körperfremden, sondern auch von endogenen, also körpereigenen Liganden aktiviert werden. Dazu gehören Fibrinogen,  $\beta$ -Defensin 2 und Bestandteile der extrazellulären Matrix, die als endogene Liganden für TLR4 in DCs und Makrophagen identifiziert wurden (Biragyn et al., 2002, Smiley et al., 2001). Außerdem werden verschiedene HSP von TLR2 und TLR4 erkannt (Lehnardt et al., 2008). Seit wenigen Jahren gewinnen MikroRNAs (miRNAs) als endogene TLR-Liganden mehr Aufmerksamkeit.

MiRNAs sind kurze, nicht kodierende RNAs von ca. 20–22 Nukleotiden Länge, welche durch Bindung an mRNAs deren Translation posttranskriptionell beeinflussen können (Nielsen et al., 2007). MiRNAs sind zwischen den verschiedenen Spezies hochkonserviert, zwischen Mensch und Maus sind ca. 60 % der miRNA-Loci konserviert (Griffiths-Jones, 2007, Lim et al., 2003). Die miRNA *let-7b* ist Teil der umfangreicheren *let-7*-Familie. Das *let-7*-Gen wurde ursprünglich im Fadenwurm (*C. elegans*) entdeckt. Der Name steht für *lethal 7*, weil

Mutationen in diesem Gen zu Entwicklungsstörungen des Wurmes führen. Der adulte Wurm ist dabei entweder deformiert oder gar nicht lebensfähig (Reinhart et al., 2000).

*Let-7b* wurde 2012 als endogener Ligand für neuronalen TLR7 beschrieben. Eine TLR-Aktivierung durch diese miRNA führt zu autonomem, neuronalem Zelltod (Lehmann et al., 2012). Die Bindung von *let-7b* an TLR7 in Mikroglia löst eine neuroinflammatorische Reaktion aus, welche wiederum zur Mikroglia-vermittelten Neurodegeneration beiträgt. Die Spezifität von *let-7b* für TLR7 resultiert aus einem bestimmten Abschnitt in der Nukleotidsequenz (GUUGUGU). *Let-7b* kommt physiologisch im Zytosol vor und konzentriert sich perinukleär. Im Falle von Apoptose oder Nekrose gelangen Bestandteile des intrazellulären Kompartiments in den Extrazellulärraum, so auch *let-7b*. Dieser Umstand führt dazu, dass extrazelluläres *let-7b* über Endozytose von weiteren umliegenden Neuronen und Mikroglia über TLR7 detektiert wird, wo es weitere Neuroinflammation und Neurodegeneration induziert.

## 1.9 Fragestellung

TLRs werden im ZNS exprimiert und sind in Neuroinflammation und Neurodegeneration involviert. Neuronaler TLR7 kann durch endogene Liganden aktiviert werden und zellautonom ohne Mikroglia zur Neurodegeneration *in vitro* und *in vivo* führen. In Zellen des peripheren Immunsystems wurde UNC93B1 als wichtiges TLR-Chaperon-Protein für die TLRs 3, 7 und 9 identifiziert, welches sowohl für deren Transport als auch für deren Regulation zentral ist. In dieser Arbeit wird untersucht, ob UNC93B1 in den verschiedenen Zelltypen des ZNS exprimiert wird und ob es an der miRNA- und TLR-vermittelten Neurodegeneration beteiligt ist.

Durch PCR und FACS-Analysen werden UNC93B1-RNA und -Protein in den verschiedenen Zellen des murinen ZNS untersucht. Außerdem wird getestet, ob seine Expression durch Stimulation verschiedener TLRs beeinflusst wird. Mittels Immunzytochemie und Immunhistochemie wird UNC93B1 in verschiedenen Zelltypen visualisiert und seine intrazelluläre Verteilung beurteilt. Um die differenzierte Expression von UNC93B1 in frühen Entwicklungsstadien des ZNS zu untersuchen, wird diese in verschiedenen Stadien der murinen Entwicklung des Gehirns bestimmt. Anhand von primären Kokulturen von Mikroglia und Neuronen sowie angereicherten Neuronenkulturen wird die Rolle von UNC93B1 in *let-7b*-vermittelter Neurodegeneration *in vitro* untersucht. Durch intrathekale Injektion von *let-7b* in WT- und UNC93B1-defizienten Mäusen wird analysiert, ob UNC93B1 in die *let-7b*-vermittelte Neurodegeneration *in vivo* involviert ist.



### 2.1.3 Puffer und Lösungen

---

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in Millipore Typ-II-Wasser; pH 7,4
Phosphatpuffer (PB)	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in Millipore-Typ-II Wasser; pH 7,4
Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA)	4 % Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M PB
Antikörperpuffer	2 % NGS; 0,1 % Triton-X-100 (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in PBS
Blocklösung	5 % NGS; 0,1 % Triton-X-100 in PBS
Saccharoselösung	0,1 M PB + 10/20/30 % Saccharose
Narkoselösung	10 ml Ketamin (CuraMED Pharma)  + 4 ml Rompun (Bayer Health Care),  + 36 ml NaCl (0,9 %)
<b>ELISA-Puffer</b>	
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween-20
Coating Buffer pH 6,5 (TNF $\alpha$ )	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Assay Diluent	PBS + 10 % FCS
Substratlösung	10 ml Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,0; 1 Tablette Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid; 2 $\mu$ l frisches H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Phosphat-Citrat-Puffer	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; 0,1 M C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; 25,7 ml 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O + 24,3 ml 0,1 M C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
Stoplösung	1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

## 2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden C57Bl/6J (WT)-Mäuse und UNC93B1-defiziente-Mäuse verwendet. C57Bl/6J-Mäuse wurden von Charles River, Sulzbach, Deutschland, erworben. UNC93B1-defiziente-Mäuse wurden von Prof. Dr. Melanie Brinkmann (Helmholtzzentrum für Infektionsforschung, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Deutschland) bereitgestellt. Alle Versuchstiere wurden unter artgerechten Bedingungen und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der örtlichen Tierversuchskommission gehalten. Die Mäuse wurden in Streu und mit sogenannter Umweltbereicherung in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten, wobei Zugang zu Wasser und Nahrung immer gewährleistet war. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin überprüft und genehmigt. Alle Tiertötungen waren unter der Nummer 0298/12 TZWZ (Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken) vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt und wurden unter Anleitung der dort vorgeschriebenen Regeln durchgeführt. Für die Versuchstiere, welche für die intrathekale Injektion verwendet wurden, wurde die Registriernummer G0040/13 verwendet.

## 2.3 Zellstimulation und Toxizitätsversuche

Neurone und Mikroglia wurden mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert. Die verwendeten RNAs waren *let-7b* (5'-UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU-3') und die mutierte *let-7b*-Negativkontrolle (mutiertes Oligoribonukleotid, *mut. oligo*; 5'-UGAGGUAGAAGGAUAUAAGGAU-3'), wobei diese dieselben Nukleotide wie *let-7b* enthielt, aber in unterschiedlicher Reihenfolge; insbesondere wurde das GUUGUGU-Motiv aufgebrochen, welches unter anderem für die spezifische Bindung an TLR7 verantwortlich ist (Forsbach et al., 2008). Für die Stimulation von Mikroglia wurden diese RNAs mit dem Transfektionsagens LyoVec™ (Invivogen, Kayla, Frankreich) im Verhältnis 2:1 komplexiert.

*Let-7b* ist ein endogener Ligand für TLR7 (Lehmann et al., 2012). Das mutierte Oligoribonukleotid (*mut. oligo.*) diente durch das aufgebrochene GUUGUGU-Motiv als Negativkontrolle für TLR7-Stimulation durch miRNAs. Beide wurden von Purimex, Grebenstein, Deutschland, synthetisiert.

Poly(I:C) (Polyinosinic-polycytidylic Acid) ist ein TLR3-Agonist. Lipopolysaccharid (LPS) diente als Positivkontrolle für Mikroglia-vermittelte Neurodegeneration in Neuron-Mikroglia-Kokulturen und dem ELISA-Assay mit Mikroglia und aktiviert TLR4, während Loxoribine, ein Guanosin-Analogon, als Positivkontrolle für TLR7-vermittelte Neurodegeneration diente

(Lehnardt, 2010). CpG-1668, ein synthetisches Oligonukleotid mit unmethylierten CpG-Dinukleotiden, stimuliert TLR9 (De Nardo, 2015). Die vier letztgenannten Substanzen wurden von Invivogen bezogen.

Die Versuche, welche den zytotoxischen Effekt verschiedener TLR-Liganden untersuchten, wurden mit folgenden Konzentrationen durchgeführt:

<i>let-7b</i>	0,1–20 µg/ml
mut. oligo.	0,1–20 µg/ml
poly(I:C)	15–150 µg/ml
LPS	0,1–1 mg/ml
Loxoribine	1–10 mM
CpG-1668	5–50 µM

All diese Liganden wurden in den angegebenen Konzentrationen für die in den Bildunterschriften angegebenen Zeiträume in das Nährmedium der betreffenden Zellen gegeben. Die unstimulierte Kontrolle wurde nur mit PBS behandelt. Sämtliche Konditionen wurden in mehrfachen Versuchsreihen (mind. n = 3) und immer in Duplikaten getestet.

## 2.4 Komplexierung der RNA-Oligonukleotide

LyoVec™ ist ein Transfektionsagens und wurde eingesetzt, um RNA-Oligonukleotide durch die Zellmembran von Mikroglia ins Zellinnere zu transportieren. Dazu wurde es in 1 ml sterilem, endotoxinfreiem Wasser gelöst, die Konzentration wurde auf 100 µg/ml eingestellt und danach für 30 Min. bei 4° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere, fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurde die zu komplexierende RNA im Verhältnis 2:1 (RNA:LyoVec™) vorsichtig damit vermischt. Vor der weiteren Verwendung wurde die Lösung für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

## 2.5 RNA-Isolation und DNase-Verdau

RNA wurde aus Hirngewebe, aus primären Zellen sowie aus Zelllinien gewonnen. Für die Isolation von RNA aus Hirngewebe wurde das frisch entnommene Gehirn in ein Reaktionsgefäß gegeben und 1 ml Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA) dazugegeben. Danach wurde es mit einem Homogenizer (UltraTurrax T25, IKA-Werke) zerkleinert. Bei der RNA-Extraktion aus Zellen wurde zuerst das Medium abgenommen und anschließend 1 ml Trizol (für Zellen auf einer 6-Well-Platte) dazugegeben. Mit einem Zellschaber (Nalge Nunc International) wurde der Zellrasen dann abgelöst und die Suspension

in ein 2-ml-Reagenzgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgenommen. Dieses wurde 15 Min. lang bei 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0, Kendro/Thermo Electron, Langenselbold, Deutschland), der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Dort wurden 200 µl Chloroform (Merck Millipore, Burlington, MS, USA) dazugegeben und gut geschüttelt. Danach wurde die Probe wieder für 5 Min. bei 1200 rpm und 4° C zentrifugiert, der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol (Merck Millipore) dazugegeben, die Probe wurde gut gemischt. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 1000 rpm und 4 °C wurde das Isopropanol abgekippt und das entstandene RNA-Pellet über 10 Min. luftgetrocknet. Danach wurde es in 20 µl nukleasefreiem Wasser (Qiagen, Venlo, Niederlande) gelöst. Der DNase-Verdau wurde im Anschluss durchgeführt.

Für den Mastermix wurde eingesetzt:

- 4 µl nukleasefreies Wasser
- 3 µl RQ1 DNase 10x Reaktionspuffer (Promega, Madison, WI, USA)
- 3 µl RQ1 DNase (1 U/µl, Promega)

Die angegebenen Mengen wurden mit der Probenanzahl multipliziert, um einen Mastermix herzustellen. Mit gestopften Pipettenspitzen (Eppendorf) wurden dann 10 µl Mastermix zu 20 µl RNA dazugegeben, das Ganze wurde vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und dann 30 Min. bei 37 °C auf dem Heizblock (Eppendorf) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 µl Stoplösung (Promega) zu jeder Probe dazugegeben und der Verdau durch Anheben der Temperatur auf 65 °C für 10 Min. abgebrochen. Die Lagerung der verdauten RNA erfolgte bei -80 °C.

### 2.6 cDNA-Synthese

Vor Durchführung einer cDNA-Synthese aus RNA wurde die Ausgangskonzentration der isolierten RNA bestimmt. Dies erfolgte photometrisch mit einem Ultraspec Photometer (Pharmacia Biotech). Die dabei gemessenen Absorptionswerte E260 und E280 wurden zusammen ins Verhältnis gesetzt (Quotient E260/E280). Ein Wert > 2,0 zeigte eine ausreichende Reinheit der RNA-Probe an.

Für 1 µg RNA gelöst in 7 µl RNase-freiem Wasser wurden folgende weitere Komponenten benötigt:

- 4 µl 5xMMLV-Puffer (Promega)
- 1 µl OligodT (18) (0,5 µg/µl) (Thermo Fisher Scientific)

- 2 µl dNTPs (1 mM) (Thermo Fisher Scientific)
- 0,5 µl RNAsin (20 U) (Thermo Fisher Scientific)
- 1 µl MMLV-Reverse Transkriptase (200 U) (Promega)
- 4,5 µl nukleasefreies Wasser

Aus den genannten Komponenten wurde ein Mastermix gemischt, welcher dann vorsichtig mit der RNA vermennt wurde. Es folgte eine Inkubation von 60 Min. bei 37 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Temperatur auf 70 °C angehoben, was die reverse Transkription terminierte. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

## 2.7 RT-PCR (SYBR-Green)

Die Analyse sämtlicher Proben erfolgte in Triplikaten. Dazu wurden 1 µg template cDNA gelöst in 1 µl nukleasefreiem Wasser in eine 96-Well-PCR-Platte (Applied Biosystem by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) gegeben, dazu kamen je 12,5 µl SYBR Green Mastermix, 10,5 µl nukleasefreies Wasser, 1 µl Primer für UNC93B1 (Protein of Interest) oder GAPDH (Housekeeping), wobei beide Primer von QIAGEN stammen. Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 25 µl je Well. Die PCR-Platte wurde mit einem Plate-Sealer (Klebefolie) versiegelt und für wenige Sekunden bei 2000 rpm zentrifugiert (PlateFuge von Benchmark Scientific, Edison, NJ, USA), sodass sich die Proben im unteren Bereich der Wells sammelten. Am PCR-Cycler (Applied BioSystems von Thermo Fisher Scientific) wurde als Farbstoff SYBR und als passiver Referenzfilter ROX gewählt. Außerdem wurde das Programm um eine Probenschmelzkurvenanalyse erweitert. Das Programm lief nach dem folgenden Schema: 10 Min. bei 95 °C zur initialen Denaturierung, dann 40 Zyklen von je 15 Sek. bei 95 °C und 60 Sek. bei 60 °C (Denaturierung und Annealing/Extension).

Die Sequenzen der verwendeten Primer waren spezifisch für die jeweils untersuchten Moleküle (UNC93B1, GAPDH oder  $\beta$ -Actin). Änderungen in der Expression von murinem UNC93B1 wurden mittels der komparativen  $2(-\Delta\Delta CT)$ -Methode mit dem Housekeeping-Gen GAPDH oder  $\beta$ -Actin verglichen.

Primersequenzen:

*unc93b1*:

sense 5'GTGCCCTATGCCTACATCCG-3',

anti-sense 5'-CAGCCACCAAGAAGATGTCA-3'

*IRAK1*:

sense 5'-GCAAGCCAGAGCAGTACTGTG-3',



anti-sense 5'-GCCTCTGTAAGAGATCAGGTAG-3'

*β-Actin:*

sense 5'-CCCTGAAGTACCCCATTGAA-3',

anti-sense 5'-GTGGACAGTGAGGCCAAGAT'-3'

*Gapdh:*

5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3',

anti-sense 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'

## 2.8 Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Murine Mikroglia, Astrozyten und Neurone wurden nach dem in 2.10 und 2.11 beschriebenen Protokoll präpariert. Nach Fixierung und Permeabilisierung (Cytotfix/Cytoperm Kit BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) wurden die Zellen für 30 Min. bei 4 °C mit folgenden Antikörpern inkubiert: anti-CD11bPACBlue (M1/70, eFluor 450, 233cat. #480112-82, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti-GLAST-(ACSA-1)-APC 234 (Miltenyi Biotec, cat. #130-095-814, Bergisch Gladbach, Deutschland), anti-βIII-Tubulin-APC (Klon: TUJ1, 235BD Biosciences, cat. #560394, Franklin Lakes, NJ, USA), N/C-terminales UNC93B1 (generiert durch Prof. Dr. Melanie Brinkmann, Helmholtz-Zentrum, Braunschweig, Deutschland) oder kommerziell gehandeltem Antikörper gegen UNC93B1 (Abcam, clone ab115591) mit dem sekundären PerCP-Konjugat und den empfohlenen Isotypkontrollen (eBioscience, San Diego, USA). Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Fcγ-Rezeptoren (eBioscience, San Diego, USA) wurden vor der Färbung der Zelloberfläche oder des Intrazellularraums geblockt. Die flusszytometrische Analyse wurde mittels FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt und mittels FlowJo Software (TreeStar, Inc.) verrechnet. UNC93B1 wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in Histogrammen dargestellt.

## 2.9 Präparation primärer Neuronenkulturen

Zur Herstellung primärer Neuronenkulturen wurden kortikale Neurone aus Gehirnen von Mäusen im Embryonalstadium (E17) entnommen. Dazu wurde eine trächtige Wildtyp-Maus im Stadium E17 durch Genickbruch getötet, der Bauch wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und eröffnet. Dann wurden die Embryos entnommen und in einer gekühlten Petrischale (Falcon/BD, Heidelberg, Deutschland) mit Hank's-Balanced-Salt-Solution-Puffer ohne Calcium oder Magnesium (HBSS-Puffer -/-, siehe 2.1.1) für die weitere Verarbeitung gelagert.

Alle folgenden Schritte wurden auf einer sterilen Werkbank (Sterilwerkbank Antares 48 von Anthos Mikrosysteme, Köln, Deutschland sowie Sterilwerkbank Lamina Flow von Steak, Pliezhausen, Deutschland) und unter Zuhilfenahme eines Binokular-Durchlichtmikroskops (GZ6, Leica, Beusheim, Deutschland) ausgeführt. Die Gehirne der Embryonen wurden in HBSS-Puffer (-/-) isoliert, die Hirnhäute entfernt und die Kortexhälften in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 15 ml HBSS-Puffer (-/-) überführt. Durch dreimaliges Absaugen und Neubefüllen der Reaktionsgefäße mit HBSS-Puffer (-/-) wurden die Kortexhälften gewaschen. Beim letzten Mal wurden 3,5 ml Puffer im Reaktionsgefäß belassen und 500 µl Trypsin (2,5 %, Invitrogen) dazugegeben. Anschließend wurden die Kortexhälften für 20 Min. bei 37 °C im Wasserbad (E100, Lauda-Königshofen, Deutschland) inkubiert. Zur Beendigung der Verdauungsreaktion wurden nach Ablauf der Inkubationszeit 4 ml FCS dazugegeben und dann dreimal mit HBSS-Puffer mit Calcium und Magnesium (+/+) gewaschen, 2 ml HBSS-Puffer (+/+) sollten dabei am Ende im Röhrchen verbleiben. Danach wurde ein DNase-Verdau mit 100 µl DNase (2 mg/ml) für ca. 10 Sek. durchgeführt. Der Verdau wurde dann durch Zugabe von Neuronenmedium abgestoppt, in welchem das Präparat ebenfalls dreimal gewaschen wurde. Durch vorsichtiges Auf- und Abziehen des Präparates in einer Pasteur-Pipette (VWR International, max. zehnmal) wurden die Neurone aus den Zellverbänden gelöst. Zelltrümmer wurden durch vierminütiges Zentrifugieren bei 300 G entfernt werden. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 G für 5 Min. wurde der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 10 ml Neuronenmedium gelöst. Dann wurden die Zellen in einer Neubauerkammer (VWR, Darmstadt, Deutschland) gezählt und in einer Dichte von 250 000 per Well auf einer 24-Well-Platte (Falcon/BD) ausgesät.

Um die Neurone anschließend mikroskopisch beurteilen zu können, wurden die Platten am Tag vor der Zellpräparation mit einem Glasplättchen pro Well belegt (Menzel-Gläser, 12 mm Durchmesser, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und dann über Nacht mit Poly-D-Lysin (200 µg/ml in A. dest.; Sigma Aldrich) beschichtet. Dieses wurde am Folgetag entfernt und die Wells mit Glasplättchen wurden dreimal gründlich mit PBS gespült. Die darauf ausgesäten primären Neurone wurden dann für maximal zehn Tage insgesamt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Binder, Tuttingen, Deutschland) inkubiert und am Differenzierungstag 3 (DIV 3) stimuliert. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Reinheit der Neurone 96 %, was durch Antikörperfärbungen nachgewiesen wurde (Lehmann et al., 2012).

## 2.10 Präparation primärer Mikroglia- und Astrozytenkulturen

Die Isolation von primären Mikroglia und Astrozyten erfolgte aus den Gehirnen von Jungtieren im Alter von ein bis vier Tagen (P0–P4). Für die Kultur wurde DMEM-Medium mit 10 % FCS verwendet. Da den mitpräparierten Neuronen in dieser Mischkultur das B27-Supplement fehlt, starben diese nach wenigen Tagen ab und es verblieb ein dichter Zellrasen aus Astrozyten und Mikroglia. Die ausdifferenzierten Mikroglia lösten sich nach ca. 10 Tagen aus dem Zellverband und schwammen frei im Medium. Um das Ablösen zu unterstützen, wurden die Kulturflaschen für 25 Min. auf dem Schüttler (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland) mit 200 Impulsen pro Minute geschüttelt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, für 5 Min. bei 1200 G zentrifugiert und das Pellet wieder in 5 ml frischen, 37 °C warmen Mikrogliaedium gelöst. Anschließend wurden die Mikroglia wieder in der Neubauerkammer gezählt und 500 000/Well auf 12-Well-Platten (für Immunzytochemie) oder 30 000/Well in 96-Well-Platten (für ELISA) ausgesät. Zur Herstellung einer Neuronen-Mikroglia-Kokultur wurden Mikroglia im Verhältnis 1:3,3 auf angereicherte Neuronenkulturen gegeben.

## 2.11 Herstellung von Kokulturen aus Neuronen und Mikroglia

Für die Herstellung von Kokulturen wurden 150 000 Mikroglia zu 500 000 Neuronen pro Well einer 24-Well-Platte gegeben. Die gewünschte Menge Mikroglia wurde dabei in 500 µl Mikrogliaedium gelöst. Das vorgelegte Neuronenmedium der Neuronenkulturen wurde vorher abgenommen. Dieser Schritt erfolgte 24 h vor der jeweils geplanten Inkubation.

## 2.12 Zelllinien

Die Mausneuroblastom-Zelllinie N1E-115 wurden in DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Oligodendrozytenzelllinie OliNeu wurde von Dr. J. Trotter (Institut für Molekularbiologie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland) bereitgestellt und in dem gleichen Medium kultiviert. Die HMC3-Zelllinie und die SH-SY5Y-Zelllinie wurden von American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) angekauft und ebenfalls in DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellzucht erfolgte wie bei primär gewonnenen Zellen bei 37 °C in angefeuchteter Luft mit 5 % CO<sub>2</sub>.

## 2.13 Immunzytochemie und Immunhistochemie

Die immunologische Färbung von Zellen und Geweben wurde nach dem hier folgenden Protokoll vorgenommen. Das Präparat, welches sich im Falle der Immunzytochemie auf einem Glasplättchen und im Falle der Immunhistochemie auf einem Objektträger befand, wurde 20 Min. in 4 % PFA nachfixiert, dann dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde der Blockpuffer für 3 h bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem entsprechendem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI für ca. eine Minute angefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen auf einen Objektträger mit Mounting-Medium (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) fixiert, wobei der Zellrasen nach unten orientiert war. Gewebeschnitte für die immunhistochemische Färbung wurden ebenfalls unter Verwendung des oben genannten Mounting-Mediums mit einem Deckgläschen (Stärke 1, Medite, Burgdorf, Deutschland) fixiert.

### 2.13.1. Verwendete Antikörper

**Tabelle 2** Primärantikörper

Antikörper	Färbung	Spezies	Verdünnung <i>in vitro</i>	Verdünnung <i>in vivo</i>	Herstellung durch
Caspase-3	Gespaltene Caspase-3	Kaninchen	1:450	-	Invitrogen
CD11b	Mikroglia	Kaninchen	1:500	-	Pharmingen
GFAP	Astrozyten	Kaninchen	1:500	1:500	Chemikon
Iba1	Mikroglia	Kaninchen	1:1000	1:500	Invitrogen
Map2	Dendriten	Kaninchen	1:500	1:500	Chemikon
NeuN	Neuronale Nuklei	Maus	1:1000	1:500	Chemikon
Neurofilament	Axone	Maus	1:1000	1:500	Chemikon

**Tabelle 3** Sekundärantikörper

Sek. Antikörper	Spezies	Verdünnung <i>in vitro</i>	Verdünnung <i>in vivo</i>	Herstellung durch
Alexa ms 568	Ziege	1:500	1:500	Jackson Immunoresearch
Alexa ms 488	Anti-Maus			
Alexa rb 568	Ziege			
Alexa rb 488	Anti-Kaninchen			

Zur Kernfärbung wurde 4',6-Diamidino-2-Phenylindole dihydrochloride (DAPI, Invitrogen) verwendet.

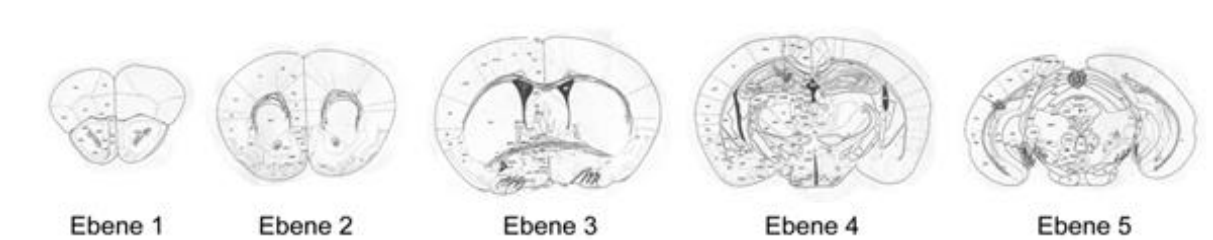
## 2.14 Perfusion von Mäusen

Zur Herstellung von Gewebeschnitten von Mausgehirnen war das Verfahren der Perfusion notwendig. Dabei wurde das Gefäßsystem der Versuchstiere erst mit isotonischer Kochsalzlösung und dann mit 4 % PFA durchgespült. Im ersten Schritt wurde das Versuchstier mittels intraperitonealer Narkose sediert. Es wurden 0,5–1 ml Narkoselösung pro 20–25 g Körpergewicht eingesetzt. Um zu testen, ob die gewünschte Narkosetiefe erreicht war, wurde ein interdigitaler Schmerzreiz gesetzt; nur bei vollständigem Ausbleiben einer Schmerzreaktion wurde fortgefahren. Mit einer Schere wurde das Abdomen bis zum Sternum eröffnet und der Thorax seitlich eingeschnitten. Mit einem Klemmchen wurde der Brustkorb dann hochgeklappt und fixiert. Das so freigelegte Herz wurde dann linksventrikulär punktiert, und der rechte Vorhof wurde mittels Skalpell eröffnet. Mit langsamen Flusstempo (1 ml/30 s) wurde 37 °C warme NaCl-Lösung infundiert bis zur Entfärbung der Leber. Danach wurde mit 4 % PFA weiter perfundiert (ca. 50 ml). Nach erfolgter Perfusion wurde das Gehirn freipräpariert und für 24 h in 4 % PFA bei 4 °C nachfixiert.

## 2.15 Herstellung von Gewebeschnitten

Das Hirnpräparat wurde mit 4 % PFA nachfixiert und anschließend mit einer aufsteigenden Saccharoselösung (10 %, dann 20 %, dann 30 % für je 24 h) behandelt. Die Zucker in dieser Lösung entwässern das Gewebe und decken einen Großteil der freien, immunologischen Bindungsstellen ab. Sie sorgen so für eine spezifischere Antikörperfärbung später. Im Anschluss wurde das Gehirn mit -20° C kaltem 2-Methylbutan (Rotipuran > 99,5 % p. a., Carl

Roth GmbH) schockgefroren und dann bei -80 °C aufbewahrt. Daraus wurden dann am Kryostaten (Leica CM1900) 14 µm dicke Gefrierschnitte erzeugt, welche auf Objektträger (Superfrost Plus von Carl Roth) überführt und bei -80 °C gelagert wurden. Um verschiedene Gehirnregionen beurteilen zu können, wurden pro Hirn immer Schnitte von fünf spezifischen Arealen angefertigt (Abb. B). Diese Ebenen sind: interaural bei 6,6 mm (Ebene 1), bei 5,34 mm (Ebene 2), bei 3,94 mm (Ebene 3), bei 1,86 mm (Ebene 4) und 0,08 mm (Ebene 5).



**Abbildung II** Repräsentative Ebenen der Kryostatschnitte von Mausgehirnen

## 2.16 TUNEL-Färbung

Zum Nachweis von Apoptose *in vitro* und *in vivo* wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt (Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling). Dabei werden Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen, die durch die Aktivität von Nukleasen entstehen. An diese freien Enden werden durch das Enzym TdT mit Fluorescein markierte dNTP-Nukleotide angehängt und damit sichtbar gemacht.

Die TUNEL-Färbung von ZNS-Zellkulturen wurde mithilfe des *In-Situ-Cell-Detection-Kit, TMR Red* (Roche, Basel, Schweiz), durchgeführt. Für die TUNEL-Färbung in Hirnschnitten wurde das *Apoptaq Puls Fluorescein In-Situ Apoptosis Detection Kit* (Merck Millipore) verwendet.

Die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie für 2 Min. mit PBS + 0,1 % Triton-X-100 + 0,01 % Natriumcitrat permeabilisiert. Im Anschluss wurde die TUNEL-Kit-Lösung (Roche) auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden entweder weitere Kofärbungen vorgenommen oder die Zellkerne sogleich mit DAPI angefärbt; dann wurden sie mit Mounting-Medium eingedeckelt und analysiert.

## 2.17 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Bei einem ELISA-Versuchsaufbau (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) werden lösliche Bestandteile des Kulturüberstands von Zellen, in diesem Fall Zytokine, mittels der sogenannten Sandwichtechnik analysiert. Dabei wurde das Zytokin als Antigen von einem an einer Platte

haftenden Antikörper (capture antibody) erkannt und gebunden. Mithilfe eines weiteren, biotinylierten Antikörper, welcher das Zytokin erkennt (detection antibody), erfolgte die Detektion. Dies geschah durch Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das an Biotin band. Das gebundene Enzym setzte dann das hinzugefügte Substrat zu einem Farbstoff um, dessen Intensität (optische Dichte, OD) in einem ELISA-Reader (Biotek Instruments) gemessen wurde. Mit einer mitgeführten Standardkurve, die mit bekannten Konzentrationen eines bekannten Zytokins erstellt wurde, konnte die Zytokinkonzentration der Proben bestimmt werden.

Als Untersuchungsmaterial dienten Mikroglia-Kulturüberstände. Es wurden je 100 µl des Überstands in je einen Well einer 96-Well-Platte gegeben und für 15 Min. inkubiert. Jede Kondition wurde zweifach analysiert (Duplikate). Es folgte ein Waschschrift, bei welchem die restlichen, noch ungebundenen Probenmoleküle entfernt wurden. Im folgenden Schritt wurde der zweite, biotinylierte Antikörper (detection antibody) zugegeben. Es folgte ein weiterer Waschschrift, um überschüssige Antikörpermoleküle zu entfernen. Danach wurde Streptavidin dazugegeben. Dieses besitzt eine hohe Affinität zu Biotin, das am Detektionsantikörper konjugiert vorliegt. Im letzten Schritt wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe einer Stoplösung beendet. Bei dieser Stopreaktion erfolgte ein Farbumschlag nach Gelb. Die quantitative Analyse erfolgte photometrisch (Kit, TNF $\alpha$ -ELISA; BD Pharmigen).

## 2.18 Intrathekale Injektion von RNA in Mäuse

Um zu untersuchen, welchen Effekt TLR-Stimulation durch *let-7b* und andere TLR-Liganden *in vivo* hat, wurde das Verfahren der intrathekalen Injektion gewählt. Dazu wurden die 6–8 Wochen alten Versuchstiere zuerst mit einem Anästhetikum (Ketamin) betäubt, anschließend wurde mit einer Schere die lumbale Wirbelsäule freipräpariert. Mit einer Mikroliterspritze und einer 30-Gauge-Nadel wurden dann entweder 10 µl *let-7b*, 10 µl mutiertes Oligonukleotid, 136 µg Loxoribine oder 40 µl H<sub>2</sub>O auf Höhe der Wirbelkörper L2–L3 in den Intrathekalraum appliziert. Die Haut wurde mit zwei Hautklammern verschlossen. Nach 72 h wurden die Tiere erneut tief anästhesiert. Zur Konservierung des Gehirns vor der Entnahme wurde eine Perfusion mit 4 % PFA vorgenommen (siehe 2.15).

## 2.19 Quantifizierung von Neuronen und apoptotischen Zellen nach intrathekaler Injektion

Nach intrathekaler Injektion der Versuchstiere nach dem oben beschriebenen Protokoll wurde die Viabilität der kortikalen Neurone beurteilt. Dazu wurden verblindet 6 kortikale Felder je Hemisphäre in Ebene 4 (vgl. Abb. B) in 60-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (Olympus Magnafire BX51) fotografiert, welche dann am Computer manuell ausgezählt wurden. Um die Anzahl der Neurone pro  $\text{mm}^2$  zu bestimmen, wurde die Neuronenanzahl durch 0,063 geteilt (0,063 entspricht der Fläche in  $\text{mm}^2$ , welche in 60-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop sichtbar ist). Zur Quantifizierung von apoptotischen Zellen wurden die Hirnschnitte mittels TUNEL-Assay und DAPI (zur Kernfärbung) angefärbt. Kortikal angesiedelte, TUNEL-positive Zellen wurden in allen Ebenen (1–5) ausgezählt, nachdem visuell sichergestellt wurde, dass die Zelle die Eigenschaften einer Zelle in Apoptose zeigt, das heißt einen geschrumpften und fragmentierten Kern besitzt. Anschließend wurde die Summe der apoptotischen Zellen per Gehirn berechnet.

## 2.20 Statistische Analyse

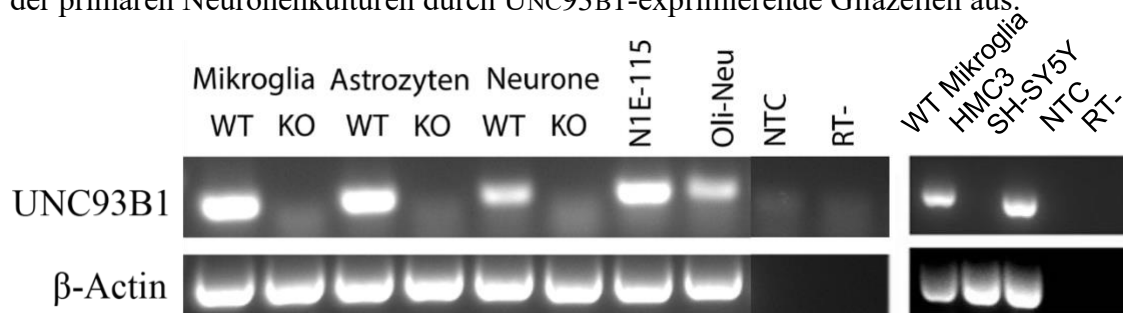
Die dargestellten Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung oder Median mit Interquartilbereich abgebildet (siehe Bildunterschriften im Ergebnisteil). Um statistische Unterschiede zwischen mehreren Konditionen zu ermitteln, wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-Test durchgeführt (ebd.). Unterschiede zwischen einzelnen Konditionen im Vergleich zur Kontrolle wurden bei nicht normal verteilten Daten mittels Mann-Whitney-Test ermittelt. Beim Vergleich von Konditionen mit einer Kontrolle, welche auf 100 % gesetzt worden war, wurde ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,005$  (\*\*) bzw.  $p < 0,0005$  (\*\*\*) betrug.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 UNC93B1 wird von verschiedenen Zellpopulationen im ZNS exprimiert

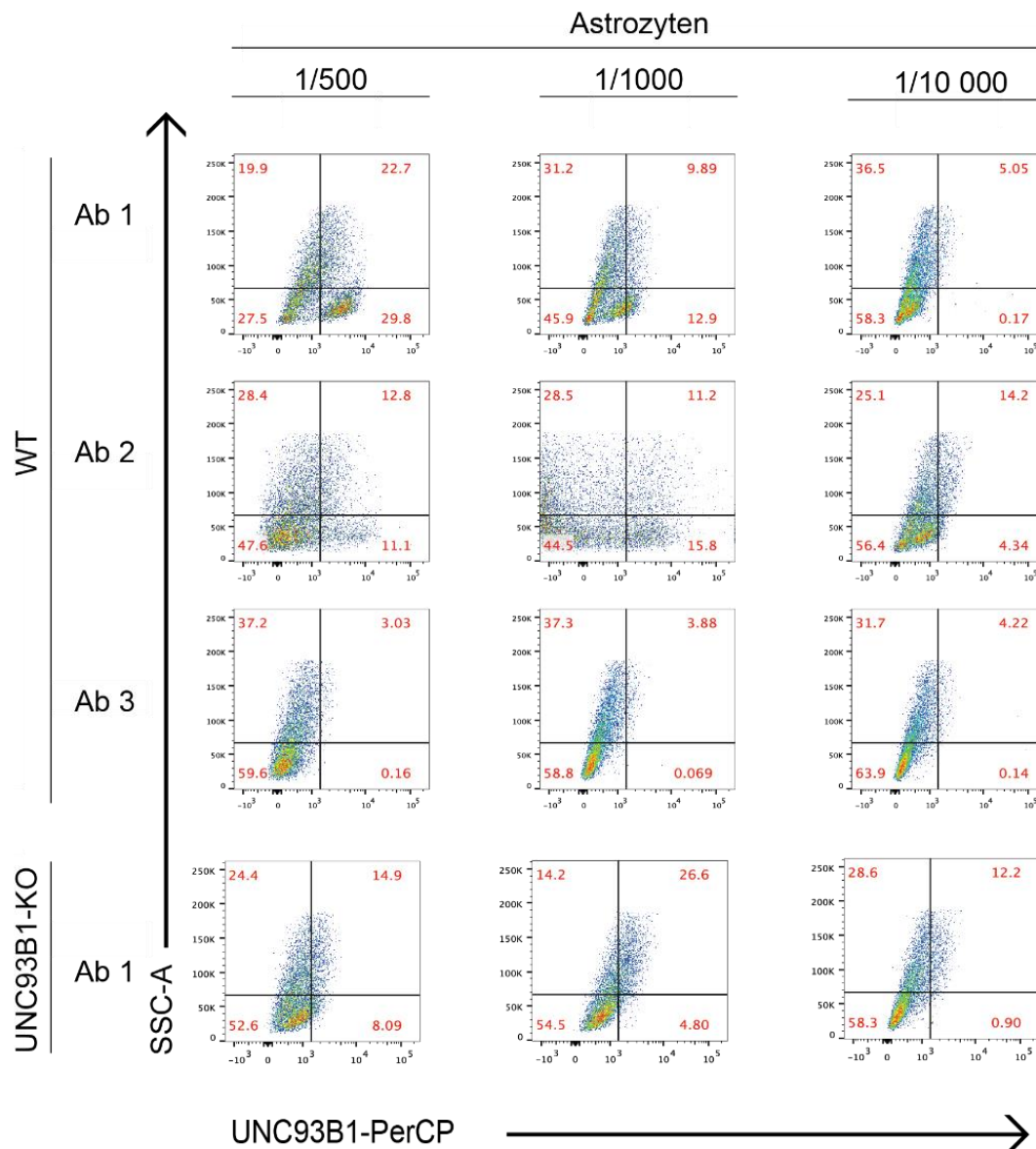
Um die Expression von UNC93B1 in verschiedenen Zelltypen des ZNS zu untersuchen, wurde zunächst eine RT-PCR-Analyse von aufgereinigten, primären Mikroglia, Astrozyten und Neuronen von C57BL/6J- (WT-) und UNC93B1-KO-Mäusen durchgeführt. Des Weiteren wurde das murine Gehirn im Ganzen analysiert, zum Vergleich wurden Präparate aus WT- und UNC93B1-defizienter Leber, Milz und Lunge verwendet. In diesem experimentellen Aufbau wurden auch Zelllinien verwendet: die murine Neuroblastom-Zelllinie N1E-115, die Oligodendrozyten-Vorläuferzelllinie OliNeu, die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y und die humane Mikrogliazelllinie HMC3. UNC93B1-RNA konnte in den getesteten WT-Organen inkl. Gehirn und allen getesteten WT-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 1). Besonders Mikroglia und Astrozyten wiesen eine starke Expression auf. Auch in Neuronen fand sich UNC93B1-Transkript, vergleichbar mit dem Signal der Oligodendrozyten-Vorläuferlinie OliNeu. Die verschiedenen Zell- und Organtypen der UNC93B1-defizienten-Mäuse wiesen durchgehend keine Expression auf, was die Spezifität der verwendeten Primer belegt. Sowohl N1E- als auch SH-SY5Y-Zellen zeigten UNC93B1-Transkript, nicht aber die humane Mikroglialinie HMC3. Die Daten der N1E-Zelllinie schließen auch Verunreinigungen der primären Neuronenkulturen durch UNC93B1-exprimierende Gliazellen aus.



**Abbildung 1 UNC93B1 wird in verschiedenen Zelltypen des ZNS sowie verschiedenen Organen der Maus exprimiert.** RT-PCR aus cDNA von primären Mikroglia, Astrozyten, Neuronen, verschiedenen Organen sowie von den Zelllinien N1E-115, OliNeu, SH-SY5Y und HMC3 mit Primern gegen UNC93B1. β-Actin wurde als Housekeeping-Gen eingesetzt. WT = Wildtyp. NTC = No Template Control. RT- = Kontrolle ohne reverse Transkriptase. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021)

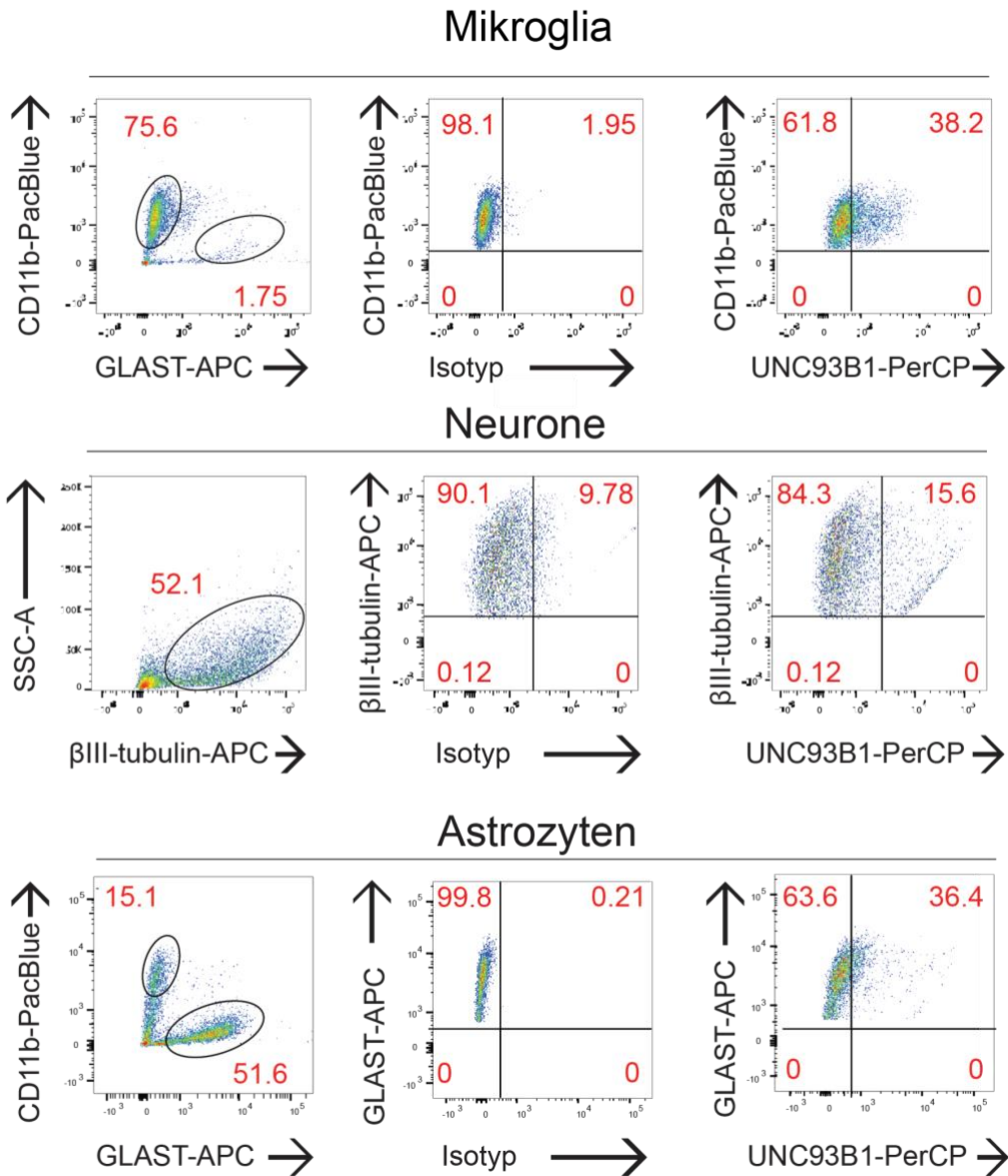
Um die Menge von UNC93B1-Protein in den verschiedenen Zelltypen des ZNS zu ermitteln, wurde eine Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Dafür standen neben kommerziell erhältlichen Antikörpern auch eigens hergestellte zur Verfügung (Herstellung im Labor von Prof. Dr. Melanie Brinkmann, Helmholtz-Zentrum, Braunschweig). Die verfügbaren

Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet. Die Spezifität des verwendeten C-terminalen UNC93B1-Antikörpers wurde in Abb. 2 nachgewiesen (Ab 1). Zum Nachweis von UNC93B1-Protein in primären Mikroglia, Astrozyten und Neuronen wurden diese fixiert, permeabilisiert und mit den folgenden Antikörpern markiert: Cd11b-PacBlue (Mikroglia), GLAST-APC (Astrozyten),  $\beta$ III-Tubulin-APC (Neurone) und C-terminalem UNC93B1-Antikörper. Eine Isotyp-Kontrolle wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.



**Abbildung 2 UNC93B1-Antikörper-Verifikation.** Zur Ermittlung des am besten geeigneten Antikörpers für die FACS-Analyse wurden verschiedene Antikörper (Ab 1-3) mittels FACS-Analyse in Astrozyten getestet. Die höchste Spezifität konnte für Ab 1 (C-terminaler Anti-UNC93B1-Antikörper aus Kaninchen) gezeigt werden. In Rot wurden die jeweiligen Prozentanteile der Subpopulationen angegeben. Von links nach rechts wurden sinkende Konzentrationen eingesetzt (1:500; 1:1000; 1:10000). Ab = Antikörper; SSC = Side-Scattered Light; PerCP = Peridinin Chlorophyll Protein. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

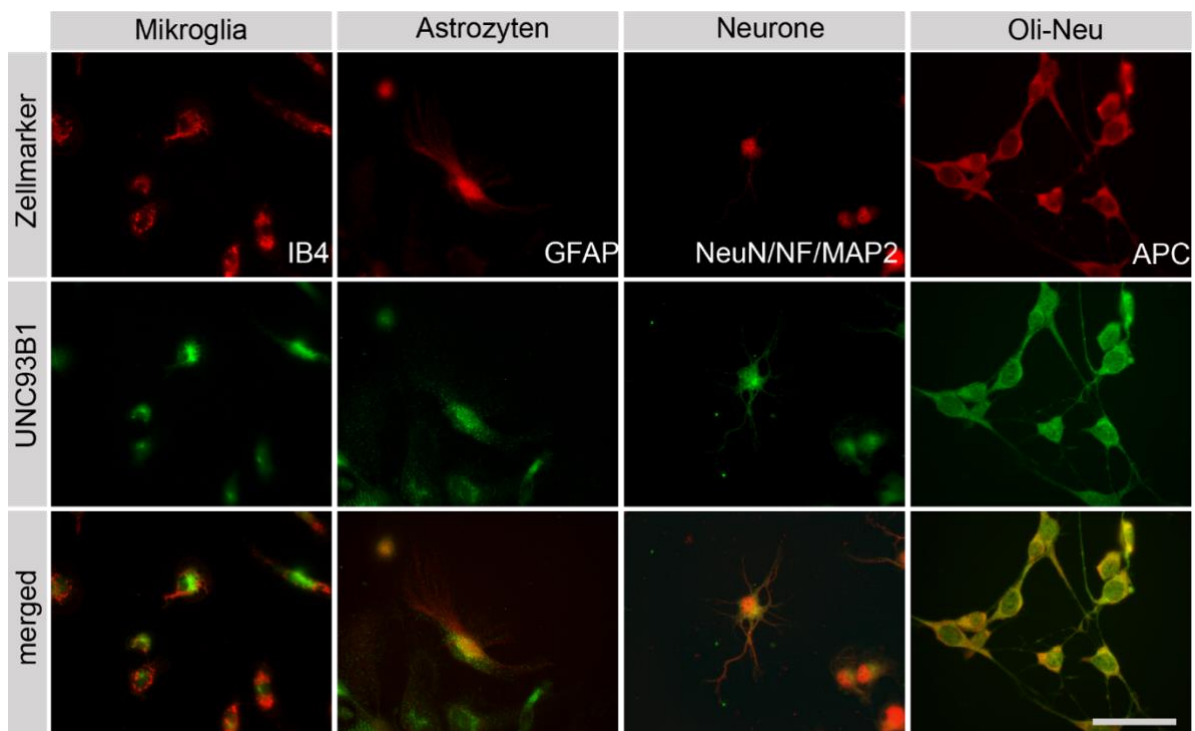
## ERGEBNISSE



**Abbildung 3** UNC93B1-Protein wird in unterschiedlicher Menge in primären Mikroglia, Neuronen und Astrozyten exprimiert. In murinen Mikroglia, Neuronen und Astrozyten wurde UNC93B1-Protein mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Antikörper: C-terminaler Antikörper gegen UNC93B1 (aus Kaninchen, nicht kommerziell erhältlich). Isotyp-Kontrollen wurden nach Herstellendenangaben durchgeführt (mittlere Spalte). Doppelt-positive Populationen (positiv für Cd11b-PacBlue (Mikroglia), GLAST-APC (Astrozyten),  $\beta$ III-Tubulin-APC (Neurone) und UNC93B1) sind im rechten, oberen Quadranten dargestellt (rechte Spalte, Prozentanteil in rot). Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

Bei allen getesteten Zelltypen wurde eine doppelt-positive Population (Zellmarker *und* UNC93B1, Abb. 3) nachgewiesen. Der prozentuelle Anteil an der Gesamtpopulation ist den Histogrammen zu entnehmen.

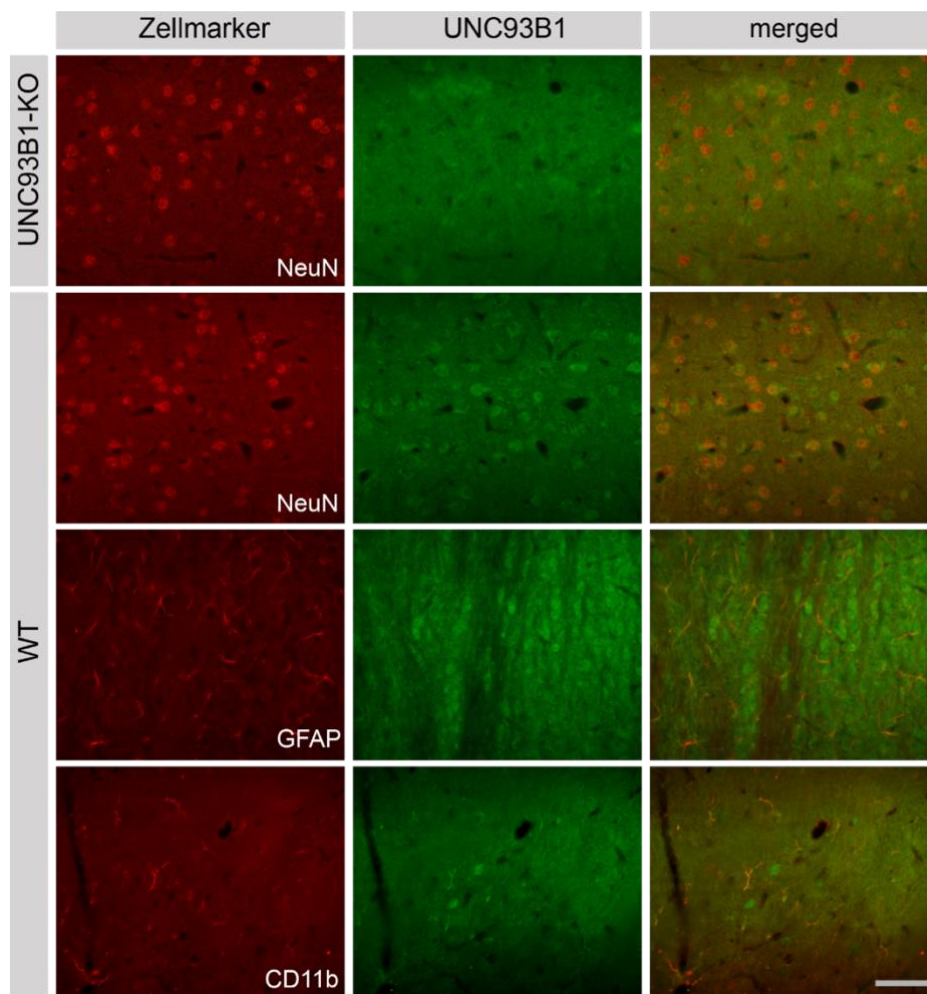
Der Expressionsnachweis für UNC93B1 erfolgte neben FACS auch mittels immunzytochemischer Färbung von primären ZNS-Zellen sowie der Oligodendrozyten-Vorläuferlinie OliNeu (Abb. 4). Zur Färbung von primären Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und der Zelllinie OliNeu wurde ein gegen UNC93B1 gerichteter Antikörper (Abcam 115591 aus Kaninchen) verwendet. Außerdem wurden die Präparate mit zellspezifischen Markern kofärbt (IB4: Mikroglia; GFAP: Astrozyten; NeuN: Neurone; APC: OliNeu). Eine zytosolisch lokalisierte UNC93B1-Färbung ließ sich in sämtlichen getesteten Zelltypen nachweisen.



**Abbildung 4 UNC93B1 wird in murinen Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und der Zelllinie Oli-Neu *in vitro* exprimiert.** Immunzytochemische Färbung von primären Mikroglia, Astrozyten und kortikalen Neuronen aus WT-Mäusen sowie der Zelllinie OliNeu mit Antikörper gegen UNC93B1 (Abcam 115591) und zellspezifischen Markern: IB4 für Mikroglia, GFAP für Astrozyten, NeuN/Neurofilament/MAP2 für Neurone und APC für Oligodendrozyten. Größenmaßstab 50 µm. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

### 3.2 UNC93B1 wird von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen *in vivo* exprimiert

In den vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass UNC93B1 von Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und der Oligodendrozyten-Zelllinie OliNeu *in vitro* exprimiert wird. Die folgenden Experimente untersuchen die Expression *in vivo*. Es wurden Hirnschnitte von WT- und UNC93B1-KO-Mäusen mit UNC93B1-Antikörper und zelltypspezifischen Antikörpern gefärbt (Cd11b: Mikroglia; GFAP: Astrozyten; NeuN: Neurone; APC: OliNeu) und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Abb. 5).



**Abbildung 5** UNC93B1 wird in murinen Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und der Zelllinie Oli-Neu *in vivo* exprimiert. Immunhistochemische Färbung von murinem UNC93B1-KO- (oben) und WT-Kortex mit Antikörper gegen UNC93B1 (Abcam 115591) und den respektiven Zellmarkern: NeuN für Neurone, GFAP für Astrozyten und CD11b für Mikroglia. Größenmaßstab 50  $\mu\text{m}$ . Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

Kortikale Neuronen zeigten die stärkste Expression von UNC93B1, aber auch in Astrozyten und Mikroglia ließ sich UNC93B1 nachweisen, wenngleich die Färbung etwas schwächer resultierte. Vor allem Neurone zeigten ein deutliches Signal im Zellsoma, aber weniger in den Dendriten und Axonen. Als zu untersuchende Region wurde der Kortex gewählt, da dieser die

höchste Dichte an Neuronen aufweist. Erwartungsgemäß zeigte die Färbung der UNC93B1-KO-Hirnschnitte kein spezifisches Signal für UNC93B1.

### 3.3 Die Expression von UNC93B1 steigt mit fortschreitender Gehirnentwicklung an

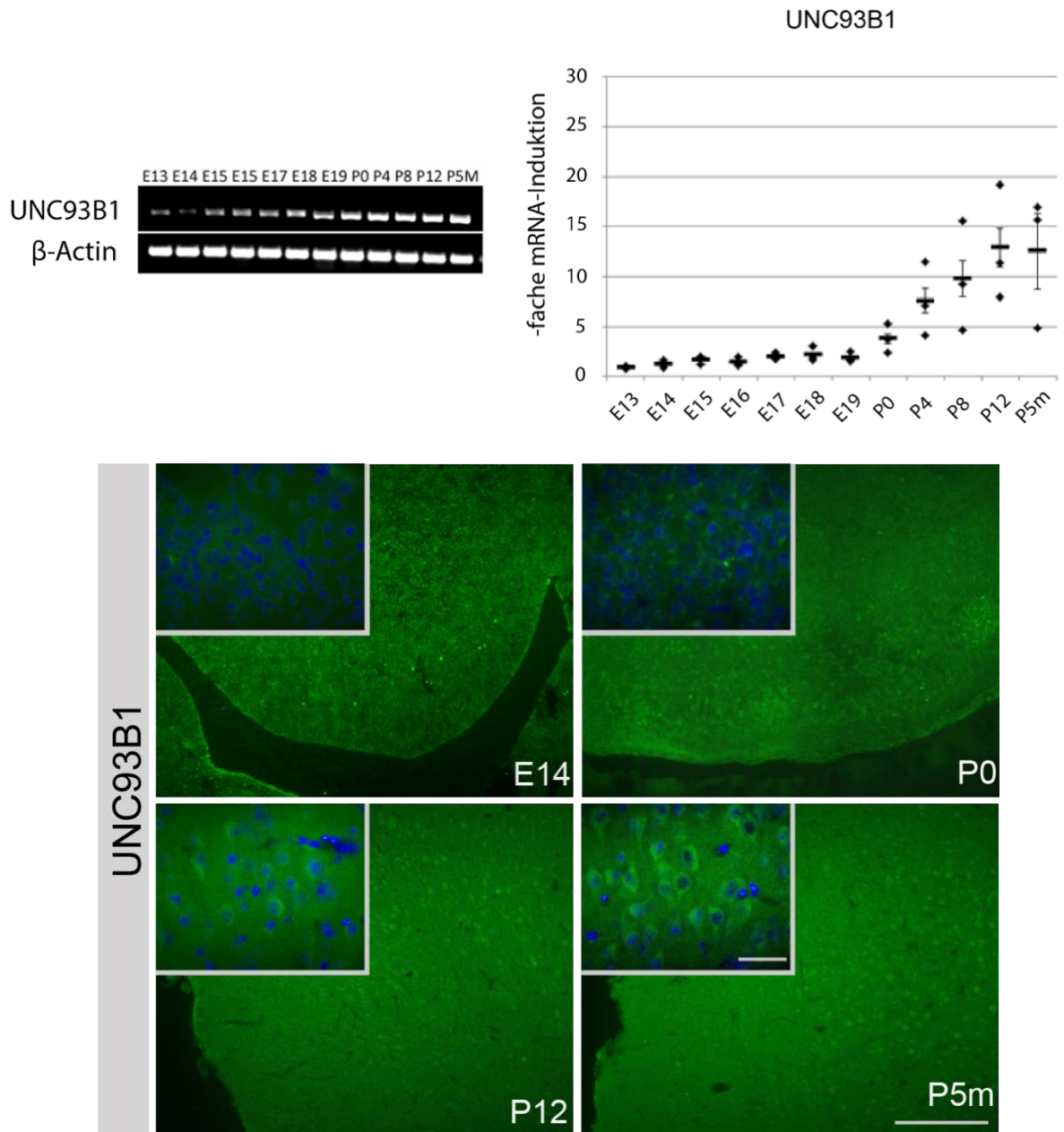
UNC93B1 konnte in verschiedenen Zelltypen des ZNS *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Als Nächstes wird untersucht, ob die Expression von UNC93B1 im Zuge der frühen Gehirnentwicklung Veränderungen unterworfen ist oder ob sie über verschiedene Entwicklungsstadien hinweg gleichbleibt.

Zu diesem Zweck wurden Gehirne von WT-Mäusen in verschiedenen Entwicklungsstadien zwischen dem embryonalen Entwicklungstag 13 (E13) und 5 Monate nach der Geburt (P5m) entnommen und mittels qRT-PCR die Menge an UNC93B1-Transkript analysiert (Abb. 6). Die Expression von UNC93B1-RNA steigt ab der Embryonalphase bis lange nach der Geburt kontinuierlich an. Als Ladekontrolle diente die RNA des Housekeeping-Proteins  $\beta$ -Actin, dessen Expression keinen wesentlichen Schwankungen über die Zeit unterliegt.

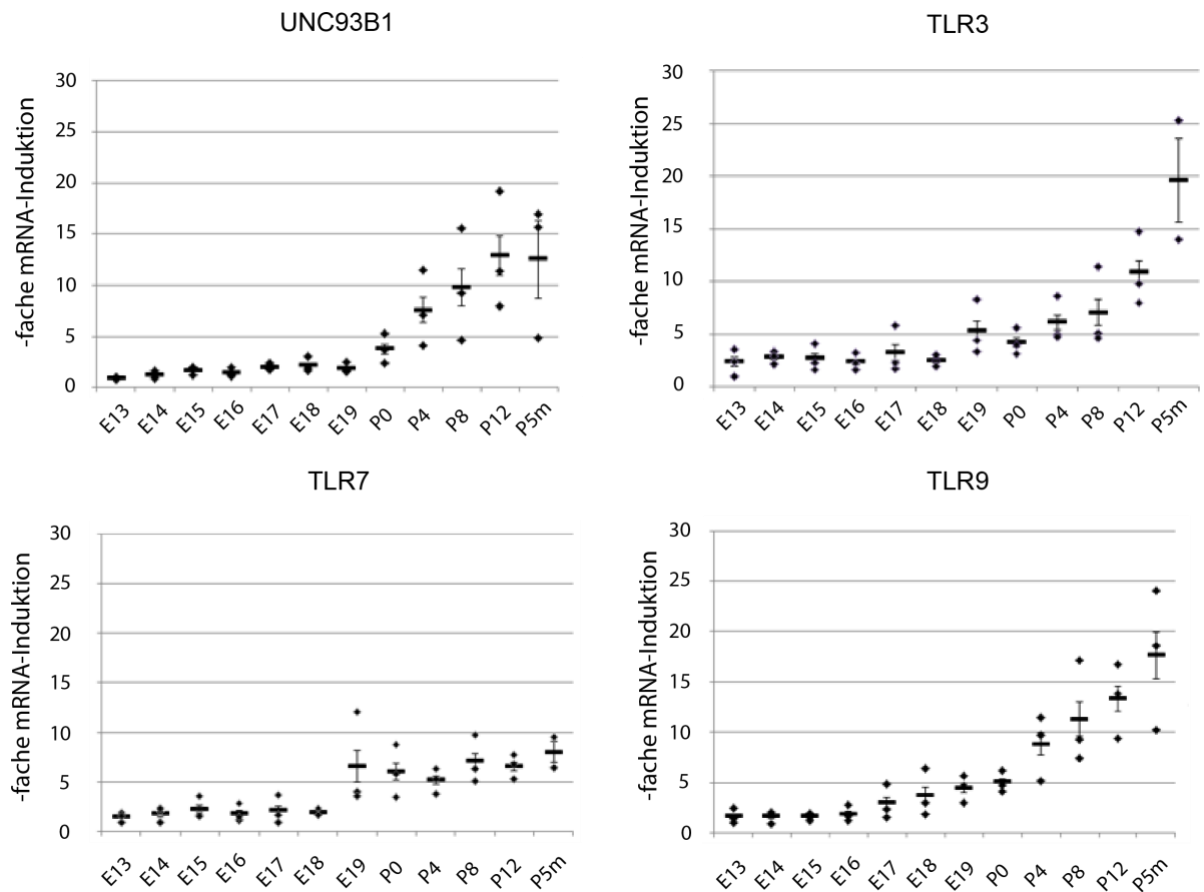
Die oben genannten Mauskortizes wurden des Weiteren mittels immunhistochemischer UNC93B1-Färbung untersucht, wobei das Ergebnis ähnlich dem der PCR ausfiel: Während in der Embryonalphase nur wenig UNC93B1 exprimiert wird, zeigen die Schnitte im Alter P12 und P5m eine eindeutige Zunahme des UNC93B1-Signals. In peripheren Immunzellen ist UNC93B1 als Trafficking-Protein der endosomalen TLRs 3, 7 und 9 bekannt (Brinkmann et al., 2007). Daher wurden neben UNC93B1 auch die Expressionsmuster der genannten TLRs während der Gehirnentwicklung untersucht.

Abb. 7 zeigt, dass die Expression von TLR3 und 9 in sehr ähnlicher Weise wie UNC93B1 prä- und postnatal kontinuierlich ansteigt; TLR7 verhält sich ähnlich, steigt aber im Vergleich zum Ausgangswert (E13) weniger an.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 6 UNC93B1-Expression in Mausehirnen steigt mit fortschreitender Gehirnentwicklung an.** *Oben:* Gehirne von WT-Mäusen aus verschiedenen Entwicklungsstadien zwischen dem embryonalen Entwicklungstag 13 (E13) und 5 Monate nach der Geburt (P5m) wurden mittels qRT-PCR die Menge an UNC93B1-Transkript analysiert. Die Transkriptmenge an E13 wurde als 1 festgelegt und die folgenden Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. *Unten:* Gehirne von WT-Mäusen im Alter von E14 (Embryonaltag 14), P0 (Tag der Geburt), P12 (12 Tage postpartal) und P5m (5 Monate postpartal) zeigen mit fortschreitender Entwicklung mehr UNC93B1-positive Zellen in der immunhistochemischen Färbung mit Antikörper gegen UNC93B1 (grün). Inlay zeigt 100-fache Vergrößerung mit DAPI-gefärbten Zellkernen (blau). Größenmaßstab: 20-fache Vergrößerung 200  $\mu$ m; 100-fache Vergrößerung (Inlays) 20  $\mu$ m. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation



**Abbildung 7 UNC93B1-Expression und Expression der endosomalen TLRs 3, 7 und 9 steigt während der Gehirnentwicklung an.** Mittels qRT-PCR wurde die RNA-Expression von UNC93B1 und der endosomalen TLRs 3, 7 und 9 in Gehirnen von WT-Mäusen aus verschiedenen Entwicklungsstadien (Embryonaltag 13 bis 5 Monate postpartal) ermittelt. Die Expression von TLR3 und TLR9 steigen über den untersuchten Zeitraum hinweg an, ähnlich wie UNC93B1-RNA. Der Anstieg von TLR7-RNA im gleichen Zeitraum zeigte sich weniger stark. Durchschnitt mit Standardabweichung.

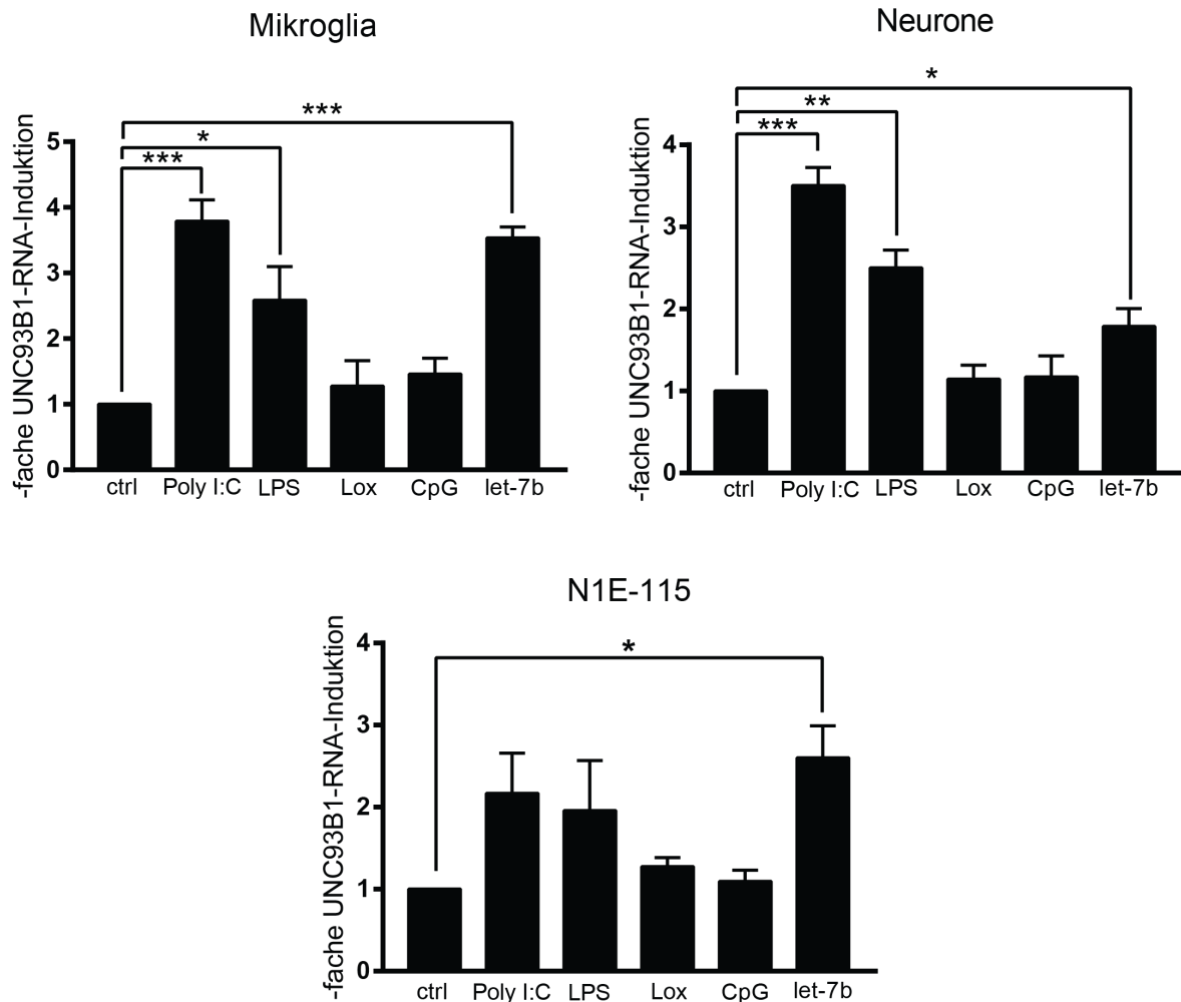
### 3.4 Die Expression von UNC93B1 in Mikroglia und Neuronen nach Stimulation der TLRs 3, 4 und 7 wird *in vitro* hochreguliert

Um zu bestimmen, ob UNC93B1-RNA in ZNS-Zellen konstitutiv exprimiert wird oder ob sich deren Expression nach differenzierter TLR-Stimulation verändert, wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt, welche die Menge an UNC93B1-RNA in Mikroglia, Neuronen und der murinen Neuroblastom-Zelllinie N1E-115 nach Stimulation durch verschiedene TLR-Liganden misst. Dazu wurden die genannten Zelltypen isoliert, ausplattiert und für 72 Stunden mit poly(I:C), LPS, Loxoribine, CpG-DNA und der miRNA *let-7b*, einem endogenen TLR7-Liganden, stimuliert. Nach RNA-Isolation, DNase-Verdau und cDNA-Synthese wurden die Proben unter Verwendung von UNC93B1-Primer mittels Real-Time-PCR analysiert. Die Stimulation von TLR3, TLR4 und TLR7 durch *let-7b* führte zu einer signifikanten Hochregulierung von UNC93B1-RNA in Mikroglia und Neuronen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle



## ERGEBNISSE

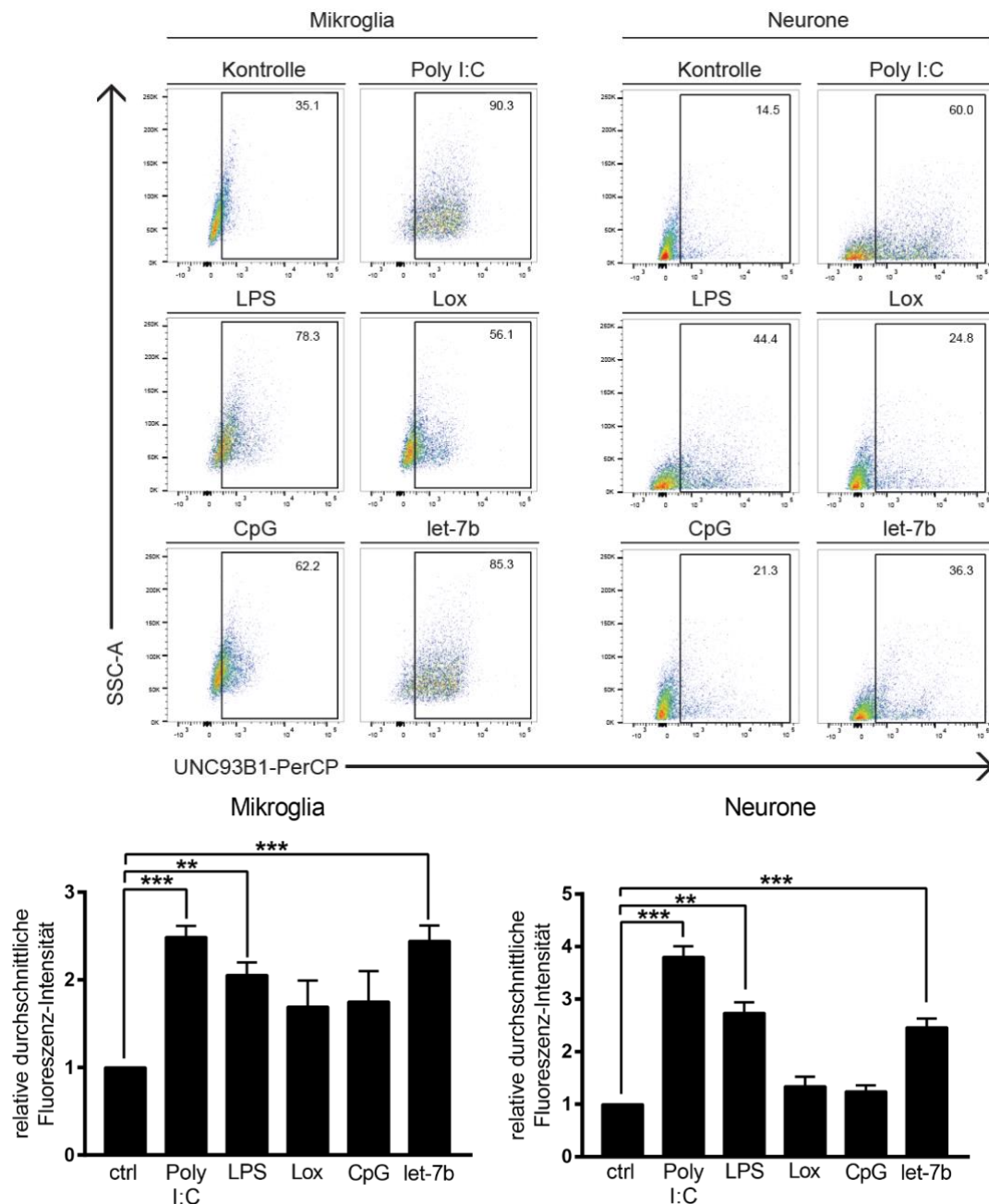
(Abb. 8). Die mit Loxoribine oder CpG-DNA stimulierten Zellen zeigten keine Regulation der UNC93B1-Expression. N1E-Zellen reagierten nur nach Stimulation mit *let-7b* mit einer signifikanten Hochregulierung der UNC93B1-RNA.



**Abbildung 8 Stimulation von TLR 3, 4 und 7 in Mikroglia, Neuronen und N1E-115-Zellen führt zu differenzierter Hochregulation der Expression von UNC93B1.** Primäre WT-Mikroglia, WT-Neurone und N1E-115-Zellen wurden für 72 h mit poly(I:C) (150 µg/ml), LPS (1 µg/ml), Loxoribine (1 mM), CpG-1668 (50 µM) oder der miRNA *let-7b* (20 µg/ml) stimuliert, welche jeweils TLR 3, 4, 7, 9 und 7 aktivieren. Die Real-Time-PCR wurde mit einem gegen UNC93B1 gerichteten Primer durchgeführt. In Mikroglia und Neuronen wurde die Expression von UNC93B1-RNA nach Stimulation von TLR 3, 4 und 7 signifikant hochreguliert. In N1E-115-Zellen wurde die Expression von UNC93B1-RNA nur durch Stimulation mit *let-7b* hochreguliert. Mann-Whitney-Test, Durchschnitt mit Standardabweichung, n = 3. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

Hiernach stellte sich die Frage, ob die Hochregulation von UNC93B1-RNA-Expression nach TLR3-, TLR4- und TLR7-Stimulation auch auf der Ebene des voll translatierten UNC93B1-Proteins stattfindet. Daher wurde mit denselben Zelltypen wie oben nach demselben Stimulationsschema verfahren und die Zellen mittels FACS analysiert. Das Ergebnis entsprach dem der RT-PCR: Nach 72-stündiger Stimulation von TLR 3, 4 und 7 (durch *let-7b*, aber nicht

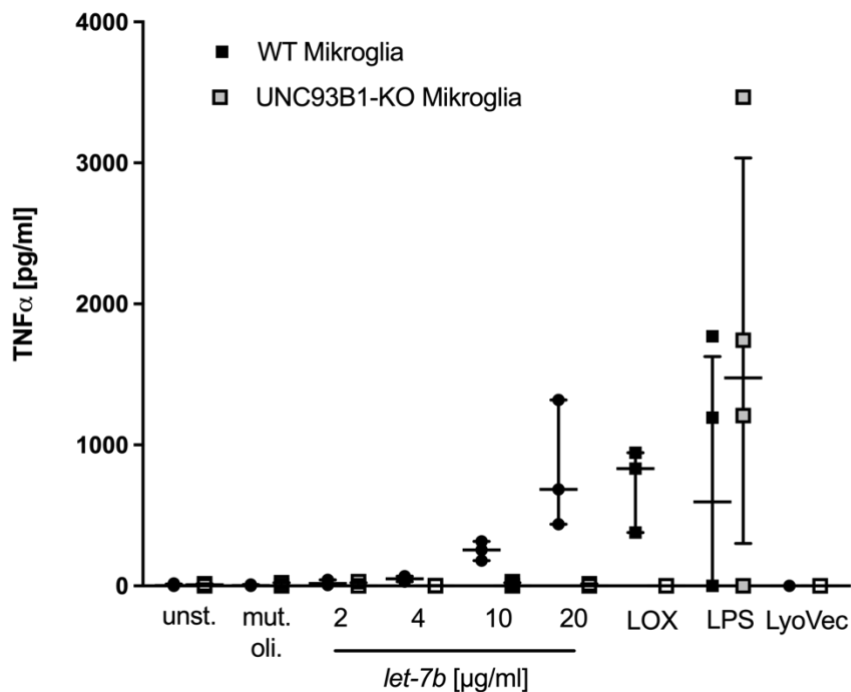
durch Loxoribine) wurde die Expression von UNC93B1-Protein signifikant hochreguliert (Abb. 9).



**Abbildung 9 Die Expression von UNC93B1-Protein in Mikroglia und Neuronen wird nach Stimulation von TLR 3, 4 und 7 hochreguliert.** *Oben:* Primäre Mikroglia und Neurone wurden 72 h lang mit den angegebenen TLR-Liganden stimuliert (Konzentrationen wie in Bildunterschrift von Abb. 8). UNC93B1-Protein-Expression wurde anschließend mittels FACS analysiert. Angabe von UNC93B1-positiven Events je Kondition in Prozenten. *Unten:* Stimulation von TLR3, 4 und 7 (durch *let-7b*) verursachten signifikante Hochregulation der UNC93B1-Protein-Expression in Mikroglia und Neuronen. Mann-Whitney-Test, Durchschnitt mit Standardabweichung, n = 3. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

### 3.5 Die Freisetzung von inflammatorischen Molekülen aus Mikroglia nach Stimulation mit *let-7b* erfordert die Expression von UNC93B1 *in vitro*

In den vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die miRNA *let-7b* eine Hochregulierung der Expression von UNC93B1-RNA und -Protein in Mikroglia induziert. Daher ergab sich die weitere Frage, ob *let-7b*-induzierte Freisetzung von Zytokinen aus Mikroglia von UNC93B1 abhängt. Dafür wurden primäre WT- und UNC93B1-KO-Mikroglia mit verschiedenen Dosen *let-7b* für 12 h stimuliert (Abb. 10). Als Positivkontrolle für TLR7-induzierte Zytokinfreisetzung wurde Loxoribine eingesetzt. LPS diente als Positivkontrolle für die Fähigkeit von Mikroglia, TNF $\alpha$  freizusetzen.

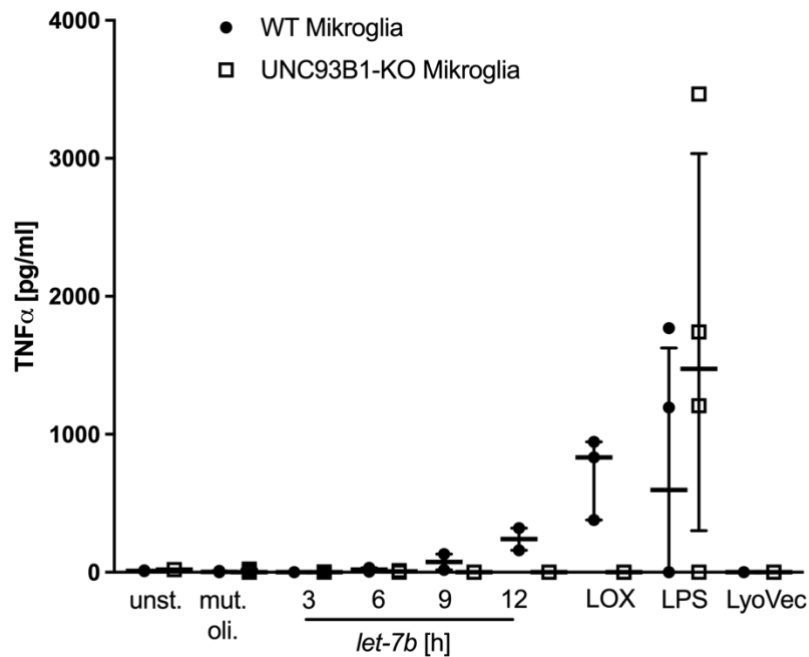


**Abbildung 10** Die dosisabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mikroglia nach Stimulation mit *let-7b* ist abhängig von UNC93B1. WT- und UNC93B1-KO-Mikroglia wurden mit aufsteigenden Dosen *let-7b* für 12 h stimuliert. Mittels ELISA wurden die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Zellüberständen quantifiziert. LyoVec<sup>TM</sup>-stimulierte Mikroglia dienen als Vehikelkontrolle. Median mit Interquartilsbereich,  $n = 3$ . Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

Die ELISA-Analyse der Mikroglia-Kulturüberstände zeigte, dass *let-7b* dosisabhängig zu einer TNF- $\alpha$ -Produktion in Mikroglia führt. Diese wurde in UNC93B1-KO-Mikroglia nicht nachgewiesen. Loxoribine löste erwartungsgemäß eine starke Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus WT-Mikroglia aus; die UNC93B1-KO-Mikroglia wiederum setzten kein TNF- $\alpha$  frei. LPS induzierte die Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus WT- und UNC93B1-KO-Mikroglia. Das mutierte

Oligonukleotid sowie das Transfektionsagens selbst (LyoVec™) hatten erwartungsgemäß keinen Effekt auf TNF- $\alpha$ -Produktion in Mikroglia.

Des Weiteren wurden die Mikroglia mit 5  $\mu\text{g/ml}$  *let-7b* für 3, 6, 9 und 12 h stimuliert (Abb. 11). TNF- $\alpha$  wurde von den WT-Mikroglia im getesteten Zeitraum zunehmend freigesetzt; UNC93B1-KO-Mikroglia zeigten keine relevante TNF- $\alpha$ -Freisetzung über den getesteten Zeitverlauf. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Expression von UNC93B1 in Mikroglia notwendig ist, um TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit *let-7b* freizusetzen.



**Abbildung 11** Zeitabhängige TNF- $\alpha$ -Freisetzung von Mikroglia nach Stimulation mit *let-7b* ist abhängig von UNC93B1. WT- und UNC93B1-KO-Mikroglia wurden mit 5  $\mu\text{g/ml}$  *let-7b* für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Quantifizierung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Kulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Median mit Interquartilsbereich, n = 3. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

### 3.6 *Let-7b*-induzierter, Mikroglia-vermittelter neuronaler Zelltod erfordert UNC93B1 *in vitro*

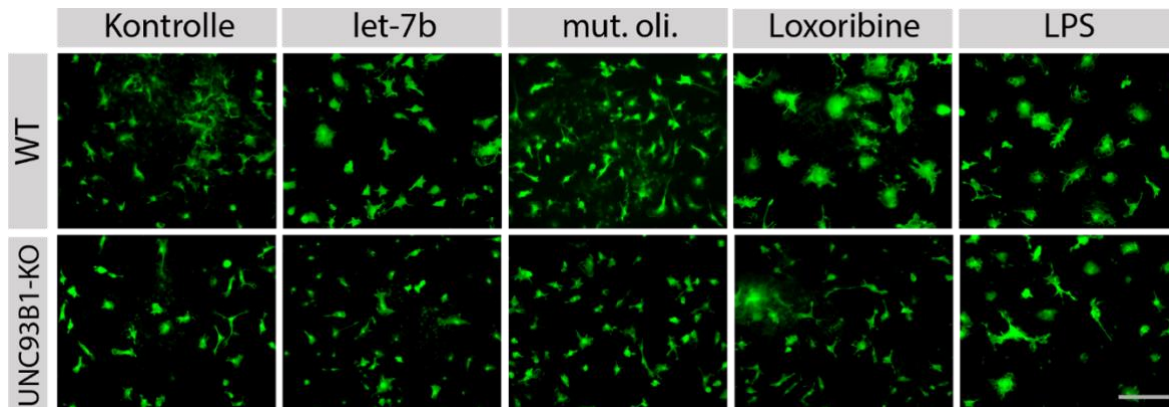
*Let-7b*-induzierte Neuroinflammation kann zu neuronaler Schädigung führen (Lehmann et al., 2012). In den vorangehenden Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die durch *let-7b* induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  über UNC93B1 in Mikroglia vermittelt wird. Nun wird untersucht, ob auch die *let-7b*-induzierten neurotoxischen Effekte von UNC93B1-Expression in Mikroglia abhängig sind.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Kokulturen mit kortikalen Neuronen und Mikroglia mit verschiedenen Dosen der miRNA *let-7b* stimuliert. Das mutierte Oligonukleotid diente als

## ERGEBNISSE

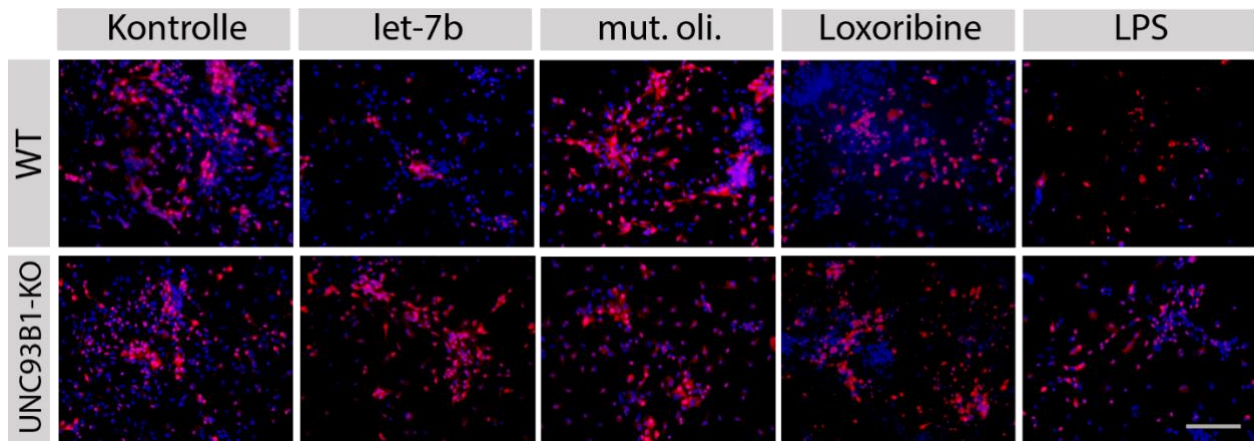
Negativkontrolle für miRNA-vermittelte, toxische Effekte, Loxoribine als Positivkontrolle für TLR7-induzierte Neurotoxizität und LPS als Positivkontrolle für Mikroglia-induzierte Neurotoxizität. Nach 72 Stunden wurden die Zellen fixiert und immungefärbt. Zur Färbung von Mikroglia wurde IBA-1-Antikörper benutzt. Zur Färbung von Neuronen diente ein Antikörper gegen NeuN. Mit DAPI wurden alle Zellkerne angefärbt.

Unstimulierte, naive Mikroglia zeigen wie erwartet eine ramifizierte Morphologie (Abb. 12). In Loxoribine- und LPS-behandelten Kokulturen nahm die Zahl der amöboiden Mikroglia zu. Im Vergleich hierzu erscheinen die WT-Mikroglia nach Stimulation mit *let-7b* einen amöboiden, aktivierten Zustand einzunehmen, wohingegen die UNC93B1-KO-Mikroglia ähnlich wie die Zellen unter unstimulierten Kontrollbedingungen einen ramifizierten, ruhenden Status aufweisen.

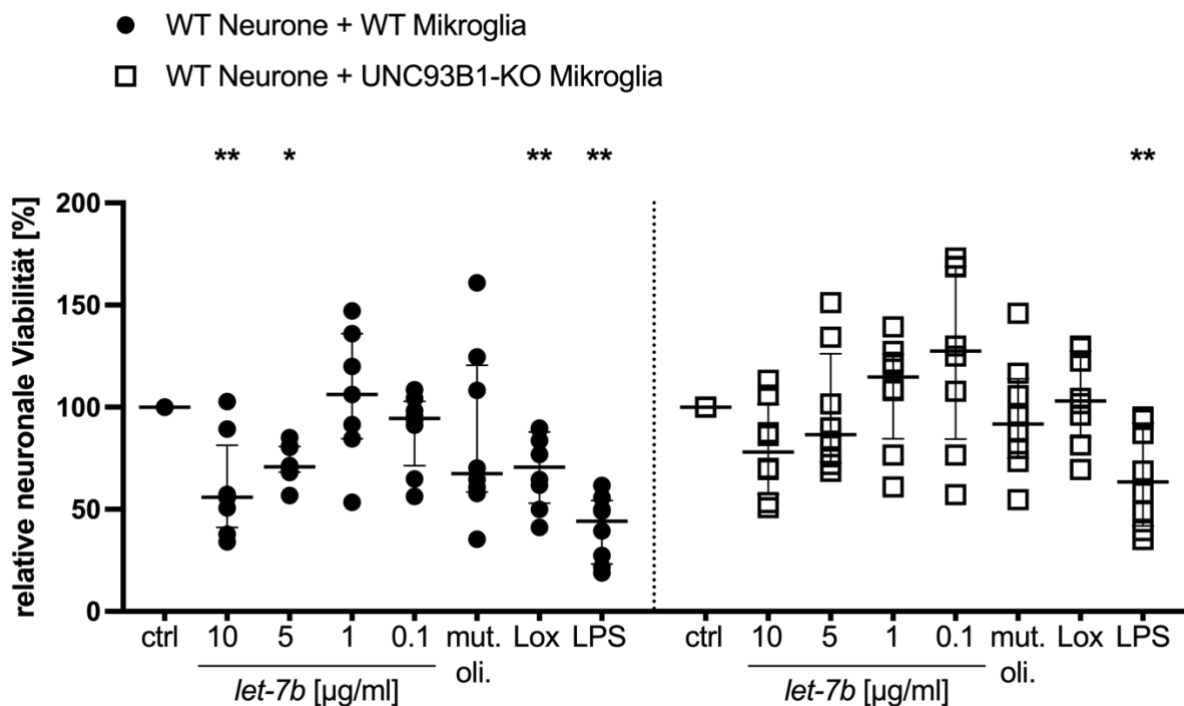


**Abbildung 12** *Let-7b*-stimulierte WT-Mikroglia zeigen immunzytochemische Konformationsänderungen abhängig von UNC93B1 (IBA1-Färbung). WT-Neurone wurden entweder mit WT-Mikroglia (obere Reihe) oder UNC93B1-KO-Mikroglia (untere Reihe) in Kokultur gezüchtet. Neben 72-stündiger Stimulation mit Kontrollen (unstimuliert, mutiertes Oligonukleotid, Loxoribine und LPS) wurde auch eine Dosisreihe für *let-7b* angelegt (0,1; 1; 5; 10 µg/ml; Bild entspricht 10 µg/ml). WT-Mikroglia, welche mit *let-7b*, Loxoribine und LPS stimuliert wurden, zeigen aktivierte WT-Mikroglia in der IBA-1-Färbung. UNC93B1-KO-Mikroglia zeigen sich nur nach Stimulation mit LPS aktiviert. Größenmaßstab: 50 µm. Abbildung in abgeänderter Form aus Klammer et al., 2021.

Die neuronale Dichte der *let-7b*-behandelten Kokulturen mit WT-Mikroglia nahm im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant ab (Abb. 13). Die *let-7b*-stimulierten Kokulturen mit UNC93B1-KO-Mikroglia wiesen hingegen eine vergleichbare neuronale Dichte wie die unstimulierten oder mit mutiertem Oligonukleotid behandelten Kokulturen auf (Abb. 14).



**Abbildung 13** *Let-7b*-Stimulation von WT-Mikroglia führt zur Abnahme der neuronalen Viabilität und ist abhängig von UNC93B1. WT-Neurone wurden entweder mit WT-Mikroglia (obere Reihe) oder UNC93B1-KO-Mikroglia (untere Reihe) in Kokultur gezüchtet. Neben 72-stündiger Stimulation mit Kontrollen (unstimuliert, mutiertes Oligonukleotid, Loxoribine und LPS) wurde auch eine Dosisreihe für *let-7b* angelegt (0,1; 1; 5; 10 µg/ml; Bild entspricht 10 µg/ml). Neuronale Somata sind mit Anti-NeuN-Antikörper markiert (rot), alle Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Es wird ein repräsentatives Experiment von 3 Versuchsdurchgängen (n = 3) gezeigt. Größenmaßstab: 50 µm. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).



**Abbildung 14** Dosisabhängige Reduktion der neuronalen Viabilität nach Stimulation mit *let-7b* ist abhängig von UNC93B1. Die in Abb. 13 gezeigten Kokulturen wurden quantifiziert; es wurde die relative neuronale Viabilität in Prozent verglichen zur unstimulierten Kontrolle (ctrl) dargestellt. 10 µg/ml *let-7b* verursachten in beiden Kokulturen (WT- sowie UNC93B1-KO-Mikroglia) einen signifikanten Effekt. Statistische Unterschiede der Testkonditionen (unst. Kontrolle und *let-7b*-Konditionen) wurden mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison Post-Test berechnet. Unterschiede zwischen Kontrollkonditionen (ctrl, mut. oli., Lox., LPS) wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. Median mit Interquartilsbereich, n = 3. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

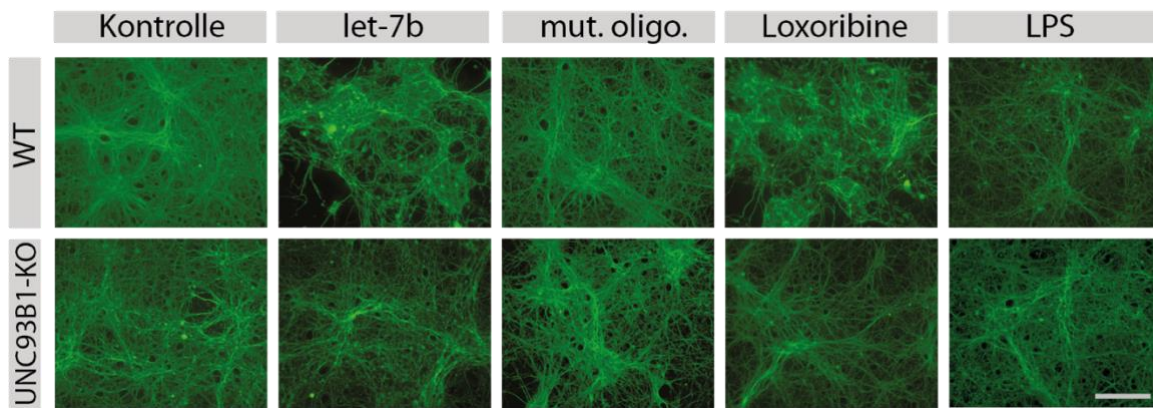
Eine Quantifizierung der neuronalen Viabilität ergab erwartungsgemäß einen dosisabhängigen Abfall nach Stimulation der Kulturen mit *let-7b*, welcher in den Kulturen mit WT-Mikroglia signifikant war. Die neuronalen Kulturen, die UNC93B1-KO-Mikroglia enthielten, zeigten einen im Vergleich weitaus geringeren Abfall der neuronalen Viabilität. Loxoribine löste eine starke Reduktion der neuronalen Viabilität in Kokulturen mit WT-Mikroglia aus. Neurone in Kokultur mit WT-, aber auch in Kokultur mit UNC93B1-KO-Mikroglia zeigten unter Behandlung mit LPS eine signifikant reduzierte Viabilität. *Let-7b*-induzierter, Mikroglia-vermittelter, neuronaler Zelltod wird demzufolge durch die Anwesenheit von UNC93B1 exazerbiert.

### 3.7 Zellautonomer, Caspase-3-positiver Zelltod von Neuronen nach Stimulation mit *let-7b* erfordert UNC93B1-Expression *in vitro*

*Let-7b* löst neuronalen Zelltod *in vitro* aus, welcher Mikroglia-vermittelt, aber auch zellautonom ablaufen kann. Die oben beschriebenen Daten belegen, dass UNC93B1 den Mikroglia-vermittelten, *let-7b*-induzierten neuronalen Schaden *in vitro* vermittelt. Im Weiteren wird untersucht, ob UNC93B1 auch für den zellautonomen, das heißt von Mikroglia unabhängigen Zelltod von Neuronen nach *let-7b*-Stimulation erforderlich ist.

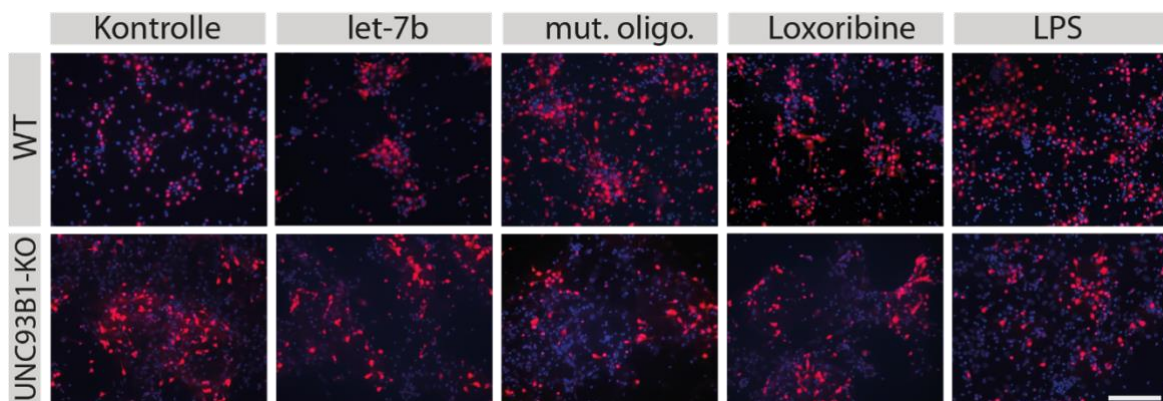
Zur Untersuchung dieser Frage wurden angereicherte kortikale Neurone mit verschiedenen Konzentrationen von *let-7b* oder mit 5 µg/ml *let-7b* über verschiedene Zeitspannen (2, 3, 4 und 6 Tage) inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, das mutierte Oligonukleotid, Loxoribine und LPS. Die Kulturen wurden anschließend mit Anti-Neurofilament-Antikörper und Anti-NeuN-Antikörper immunzytochemisch gefärbt. DAPI färbte unabhängig vom Zelltyp alle Zellkerne an.

Die Färbung durch Anti-Neurofilament-Antikörper veranschaulicht die axonalen Verbindungen zwischen den kultivierten Neuronen. Sie zeigt leichten axonalen Schaden in den angereicherten Neuronenkulturen, die mit *let-7b* behandelt worden sind. Bei der Betrachtung der UNC93B1-KO-Neuronenkulturen fiel auf, dass die Neurone in allen Konditionen inklusive der unstimulierten Kontrolle weniger verzweigt und weniger dicht als in den WT-Kulturen erscheinen. Allerdings gab es keinen sichtbaren Unterschied zwischen den unstimulierten oder mit mutiertem Oligonukleotid behandelten Kulturen und den *let-7b*-behandelten UNC93B1-KO-Neuronenkulturen.



**Abbildung 15** *Let-7b* induziert axonalen Schaden in WT-Neuronenkulturen, aber nicht UNC93B1-KO-Neuronenkulturen. Primäre WT-Neurone wurden für 72 Stunden mit verschiedenen Dosen *let-7b* (0,1; 1; 5; 10 µg/ml; im Bild gezeigt: 10 µg/ml), dem mutierten Oligonukleotid (10 µg/ml), Loxoribine (10 mM) und LPS (100 ng/ml) behandelt, fixiert und mit Anti-Neurofilament-Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Größenmaßstab: 50 µm. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

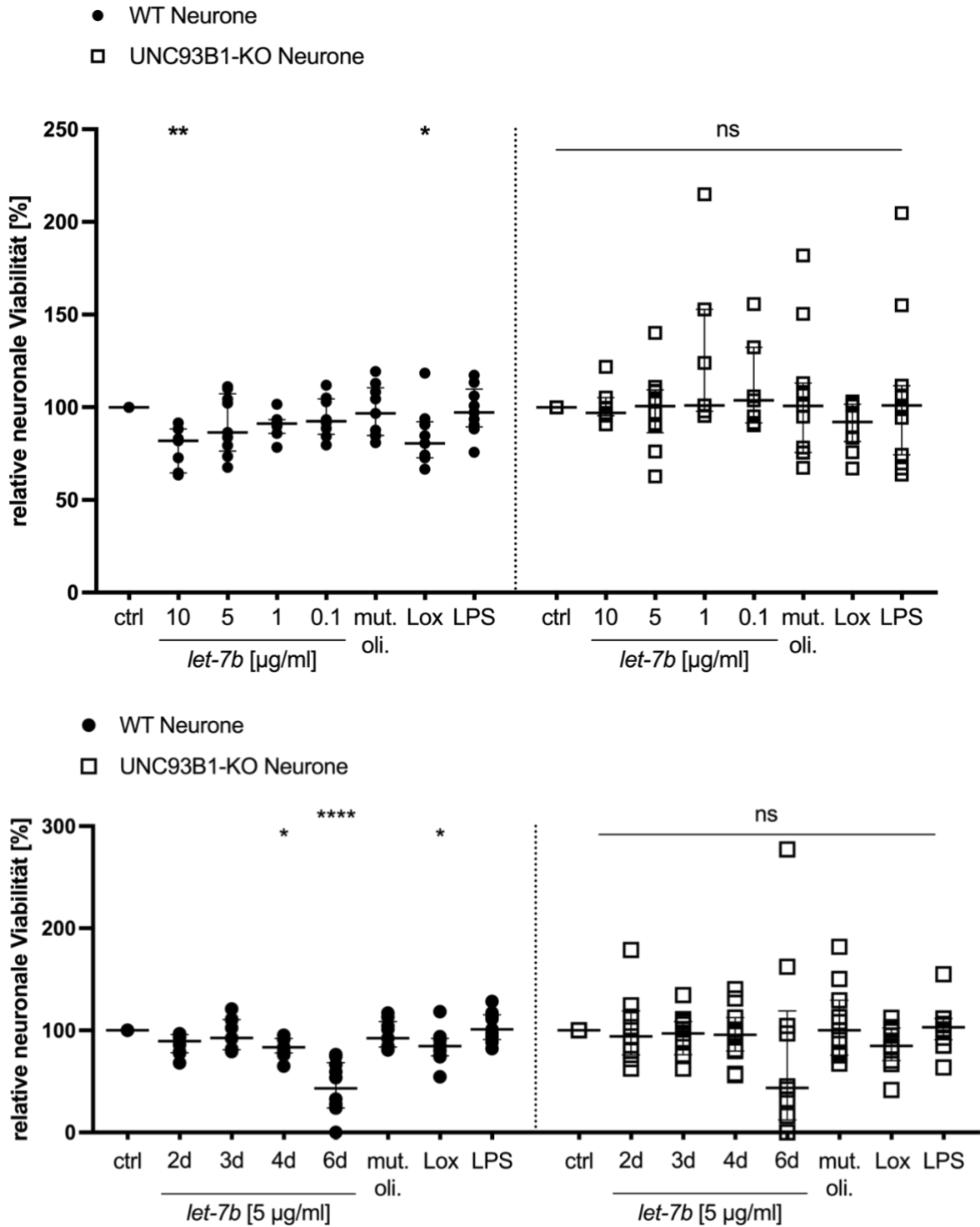
Die quantitative Analyse der neuronalen Dichte erbrachte ein ähnliches Ergebnis. Durch die *let-7b*-Behandlung war eine starke Reduktion der neuronalen Viabilität der angereicherten WT-Neurone, nicht aber der UNC93B1-KO-Neurone erfolgt (Abb. 16a und 16b). Die Reduktion der neuronalen Viabilität nach Inkubation mit *let-7b* war signifikant dosis- und zeitabhängig und auf WT-Neurone beschränkt. Die UNC93B1-KO-Neuronenkulturen zeigten keine signifikante Verminderung der neuronalen Viabilität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle oder der Kontrolle mit dem mutierten Oligonukleotid. Auch die Loxoribine- und LPS-behandelten UNC93B1-KO-Neurone zeigten keine Veränderung hinsichtlich ihrer Viabilität.



**Abbildung 16a** *Let-7b* induziert einen Rückgang der neuronalen Viabilität abhängig von UNC93B1. WT- und UNC93B1-KO-Neuronenkulturen wurden mit verschiedenen Dosen *let-7b* (für 72 h) oder mit 5 µg/ml *let-7b* (für 2, 3, 4 und 6 Tage) behandelt. Die restlichen Konditionen erfolgten analog zu den in Abb. 15 gezeigten Kulturen. Größenmaßstab 50 µm. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

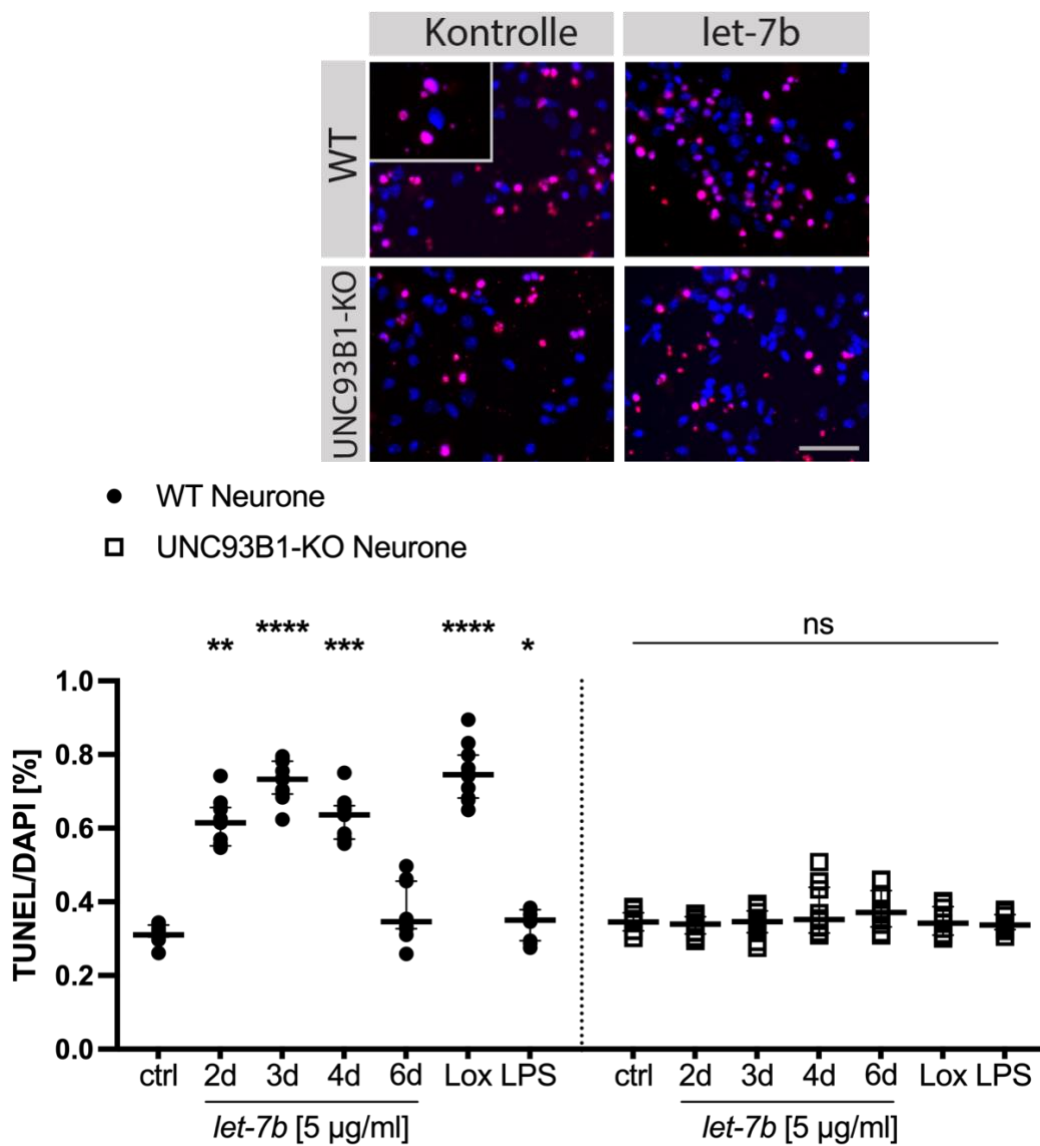


ERGEBNISSE



**Abbildung 16b** *Let-7b* induziert einen Rückgang der neuronalen Viabilität abhängig von UNC93B1. Die neuronale Viabilität der in Abb. 16a gezeigten Neuronenkulturen wurde im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (ctrl) bestimmt. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte damit ins Verhältnis gesetzt. Statistische Unterschiede zwischen den Testkonditionen (uns. ctrl vs. *let-7b*) wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison Post-Test ermittelt. Signifikanzen zwischen den Kontrollen wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ermittelt. Median mit Interquartilsbereich, n = 3. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

Zur weiteren Analyse der Apoptoserate in den oben genannten Versuchen wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt. TUNEL markiert DNA-Einzelstrangbrüche und eignet sich daher zum Nachweis von Apoptose. TUNEL-positive Zellen wurden in den angereicherten Neuronenkulturen quantifiziert und mit der Anzahl von DAPI-positiven Zellen im selben Gesichtsfeld ins Verhältnis gesetzt (Abb. 17). Nach drei Tagen Inkubation mit 5 µg/ml *let-7b* waren hochsignifikant mehr WT-Neurone TUNEL-positiv als UNC93B1-KO-Neurone. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass *let-7b*-induzierte Neurotoxizität auf neuronaler Apoptose, abhängig von UNC93B1, basiert.

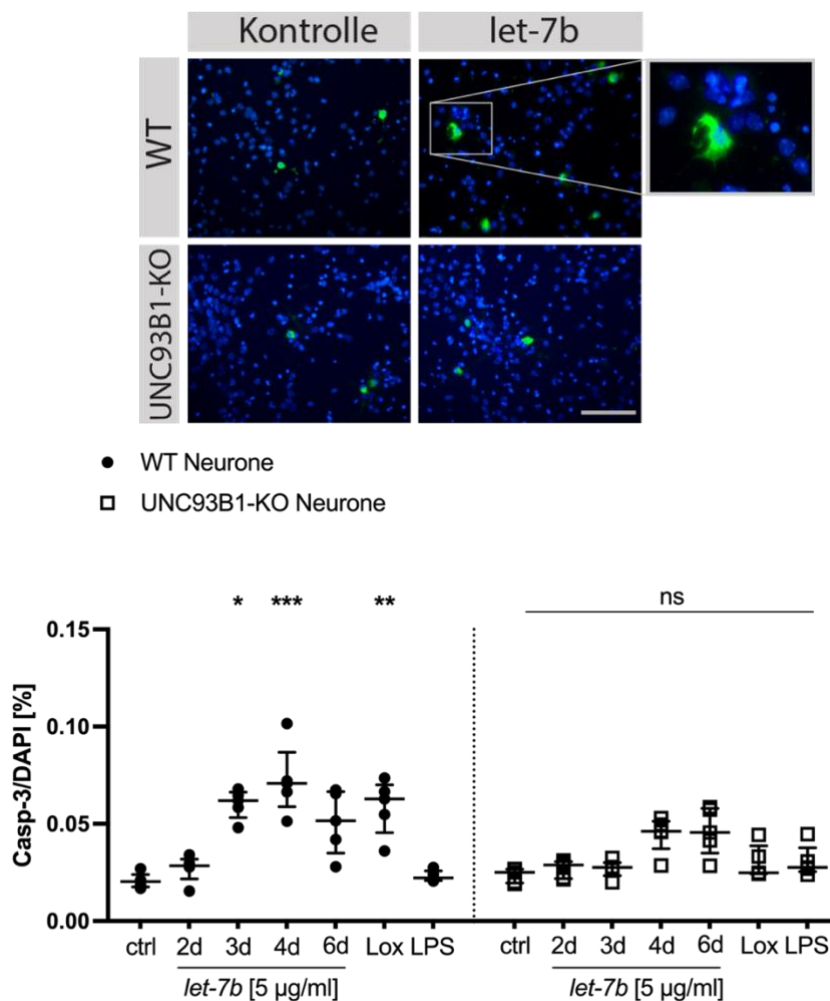


**Abbildung 17** *Let-7b*-induzierte neuronale Apoptose ist abhängig von UNC93B1. WT- und UNC93B1-KO-Neurone wurden für 2, 3, 4 und 6 Tage mit 5 µg/ml *let-7b* sowie mit Loxoribine (10 mM) und LPS (100 ng/ml) behandelt. Apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL-Färbung markiert (rot) und quantifiziert. Statistische Unterschiede zwischen den Testkonditionen (ctrl vs. *let-7b*-Zeitreihe) wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison Post-Test ermittelt. Unterschiede zwischen den Kontrollen wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt. Median mit Interquartilsbereich, n = 4. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

## ERGEBNISSE

Caspase-3 ist eine Apoptose-induzierendes Enzym, welches im Kontext von Neurodegeneration eine Schlüsselrolle spielt (Grütter, 2000). Daher sollte als Nächstes untersucht werden, ob der *let-7b*-induzierte, UNC93B1-abhängige neuronale Zelltod Caspase 3 erfordert.

Es wurden primäre, kortikale WT- und UNC93B1-KO-Neurone kultiviert und mit 5 µg/ml *let-7b* für mehrere Zeiträume (2, 3, 4 und 6 Tage) und verschiedenen Kontrollkonditionen (Inkubation 3 Tage) behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturen fixiert und mit Anti-Caspase-3-Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Unter dem Mikroskop wurden dann Caspase-3-positive Zellen quantifiziert und mit den im selben Sichtfeld liegenden DAPI-positiven Kernen ins Verhältnis gesetzt (Abb. 18).



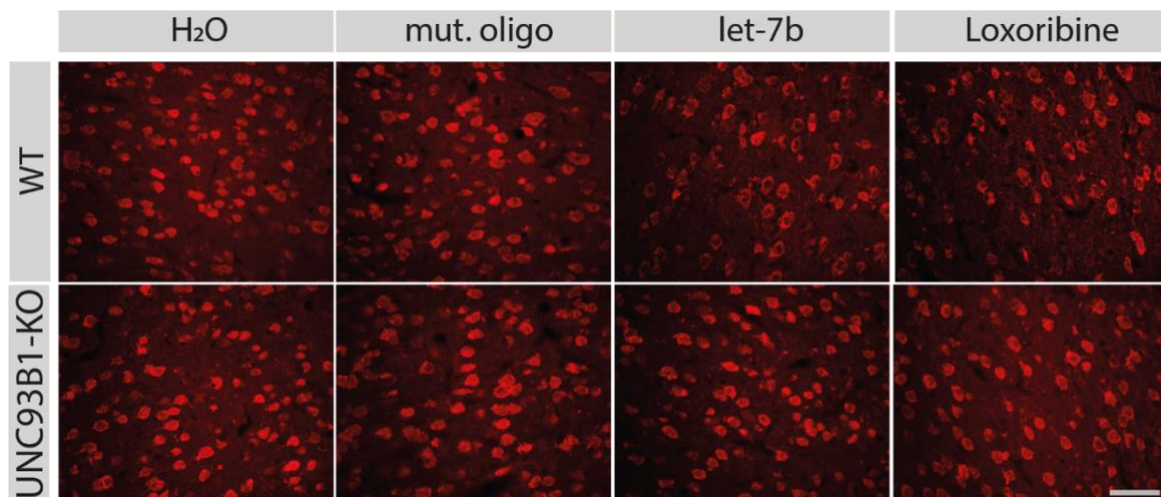
**Abbildung 18** *Let-7b*-induzierte, UNC93B1-abhängige neuronale Apoptose erfordert Caspase 3. WT- und UNC93B1-KO-Neurone wurden für 2, 3, 4 und 6 Tage mit 5 µg/ml *let-7b* sowie mit Loxoribine (10 mM) und LPS (100 ng/ml) behandelt. Apoptotische Neurone wurden mittels Casp-3-Färbung identifiziert (grün) und im Verhältnis zu DAPI-positiven Zellen (blau) im gleichen Gesichtsfeld quantifiziert. Statistische Unterschiede zwischen den Testkonditionen (ctrl vs. *let-7b*-Zeitreihe) wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison Post-Test ermittelt. Unterschiede zwischen den Kontrollen wurden mittels Mann-Whitney-Test berechnet. Median mit Interquartilsbereich, n = 4. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

In WT- wie UNC93B1-KO-Kulturen zeigten sich signifikant mehr Caspase-3-positive Neurone nach vier Tagen Inkubation mit *let-7b* als unter unstimulierten Kontrollbedingungen. Darüber hinaus fanden sich signifikant mehr Caspase-3-positive Neurone in den WT-Kulturen als in den UNC93B1-KO-Neuronenkulturen. *Let-7b*-induzierte, neuronale Apoptose erfordert also UNC93B1 und die Aktivierung von Caspase-3.

### 3.8 Die *let-7b*-induzierte Neurodegeneration erfordert UNC93B1 *in vivo*

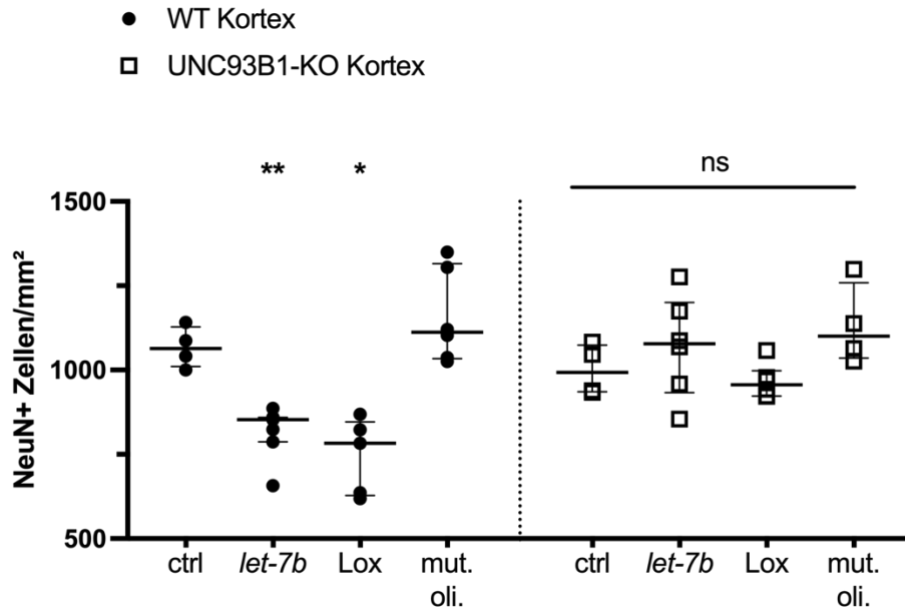
In der Arbeit von Lehmann et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass intrathekal verabreichtes *let-7b* zu TLR7-abhängiger kortikaler Neurodegeneration in Mäusen führt. Es stellte sich die Frage, ob bei diesen neurodegenerativen Prozessen *in vivo* UNC93B1 erforderlich ist.

Zu diesem Zweck wurden intrathekale Injektionen von miRNA und TLR-Liganden vorgenommen: 6–8 Wochen alte WT- und UNC93B1-KO-Mäuse wurden mit *let-7b*, Loxoribine, mutiertem Oligonukleotid und Wasser intrathekal injiziert. Nach 72 Stunden wurden die Versuchstiere mittels Genickbruch getötet und die Gehirne anhand immunhistochemischer Färbungen analysiert. Die immunhistochemische Färbung mit Anti-NeuN- und Anti-Neurofilament-Antikörper zeigte, dass die *let-7b*- und Loxoribine-behandelten WT-Tiere eine signifikante Schädigung der Axone und Neuronensomata im Kortex im Vergleich zu den mit den Kontrollen behandelten Tieren (H<sub>2</sub>O, mut. oligo.) aufwiesen (Abb. 19a).



**Abbildung 19a** *Let-7b*-induzierte Neurodegeneration ist abhängig von UNC93B1 *in vivo*. Hirnschnitte von WT- und UNC93B1-KO-Tieren, welche mit Wasser (WT: n = 4; UNC93B1-KO: n = 4), dem mutierten Oligonukleotid (WT: n = 6; UNC93B1-KO: n = 4), *let-7b* (WT: n = 7; UNC93B1-KO: n = 6) und Loxoribine (WT: n = 6; UNC93B1-KO: n = 6) intrathekal injiziert wurden, wurden mit Anti-NeuN-Antikörper (rot) gefärbt. *Let-7b* und Loxoribine lösten Neurodegeneration *in vivo* aus. Größenmaßstab: 100 µm. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

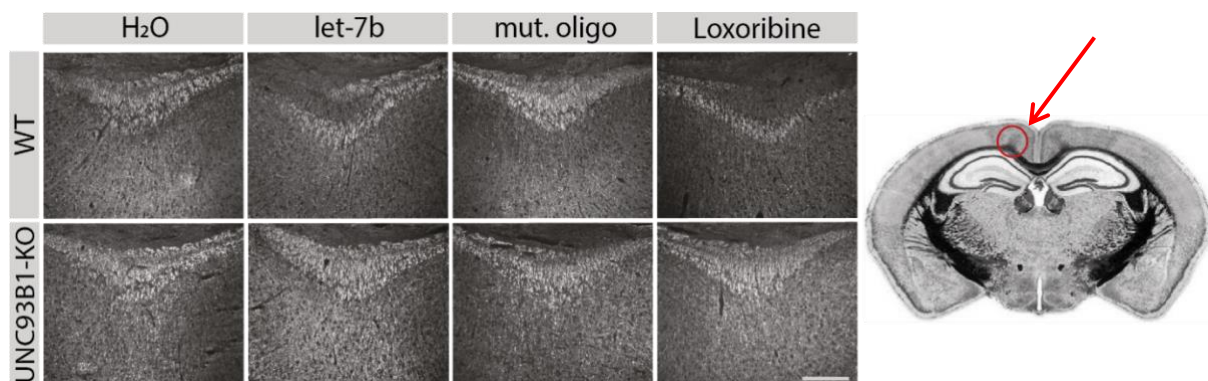
## ERGEBNISSE



**Abbildung 19b** *Let-7b*-induzierte Neurodegeneration ist abhängig von *UNC93B1* *in vivo*. Die Viabilität der kortikalen Neurone der in Abb. 19a gezeigten Präparate wurde quantifiziert und mit der Wasser-stimulierten Kontrolle (*ctrl*) verglichen. Mann-Whitney-Test, Median mit Interquartilsbereich, die jeweiligen *n* sind der Bildunterschrift Abb. 19b zu entnehmen. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

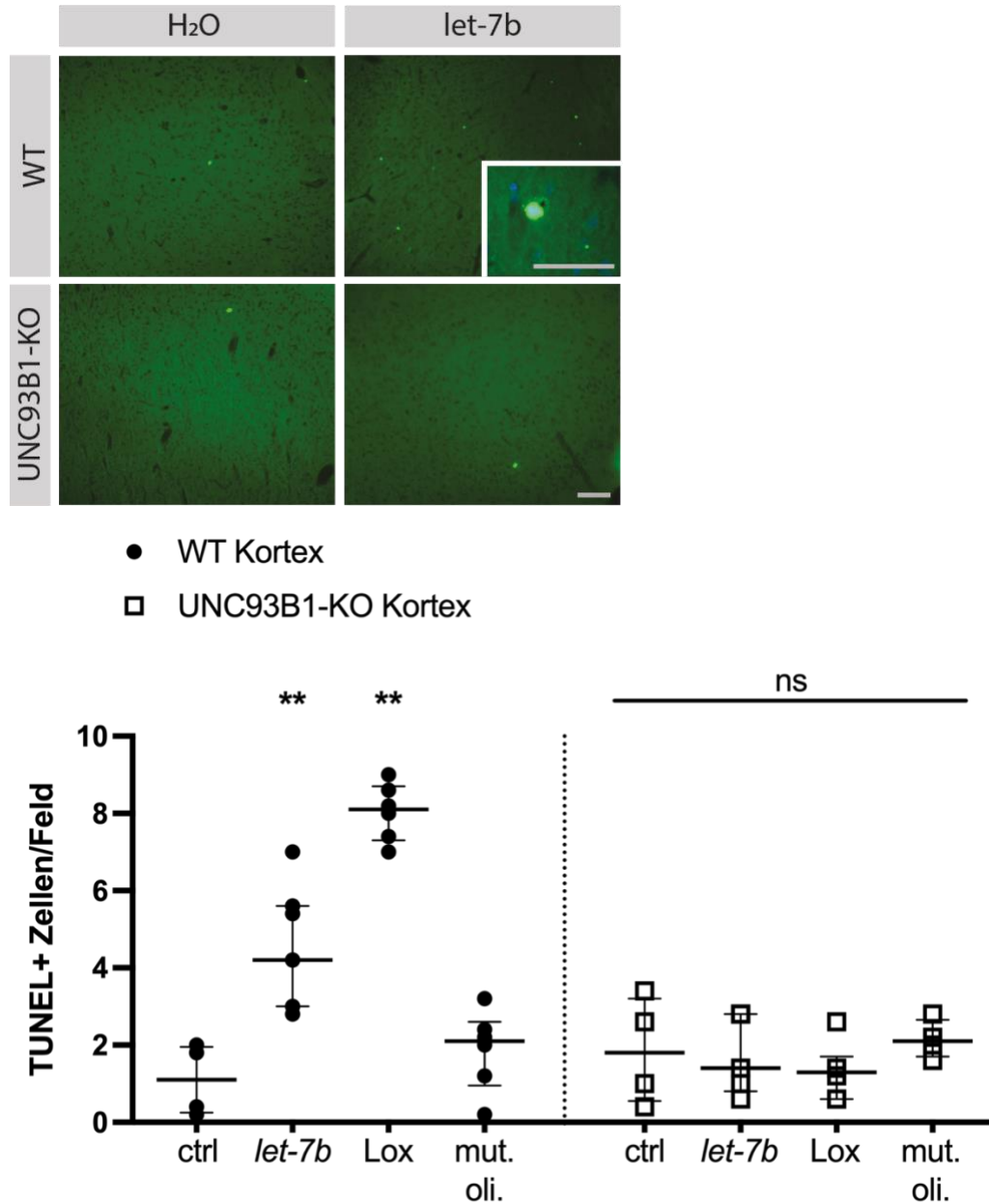
Bei den *UNC93B1*-KO-Tieren wurde keine solche Schädigung beobachtet, während die Quantifizierung der kortikalen Neurone einen signifikanten Rückgang der neuronalen Viabilität in den *let-7b*- und den Loxoribine-behandelten WT-Tieren im Vergleich zur Kontrolle erbrachte (Abb. 19b). *UNC93B1*-KO-Tiere zeigten diese Reduktion von Neuronen nicht.

WT-Tiere, die mit *let-7b* oder Loxoribine behandelt worden waren, zeigten eine sichtbare Verminderung der axonalen Dichte im Corpus Callosum im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 20). Im Corpus Callosum der *UNC93B1*-KO-Tiere wurden keine solchen degenerativen Merkmale nachgewiesen.



**Abbildung 20** *Let-7b*-behandelte Mäuse zeigen eine verminderte axonale Dichte abhängig von *UNC93B1*. Hirnschnitte von intrathekal behandelten WT- und *UNC93B1*-KO-Mäuse wurden mit Wasser (H<sub>2</sub>O), *let-7b*, dem mutierten Oligonukleotid und Loxoribine injiziert. Dann erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit Anti-Neurofilament-Antikörper; die Beurteilung der axonalen Dichte erfolgte am Corpus Callosum (siehe Übersichtsdarstellung rechts). Größenmaßstab: 200 µm. Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

Die Analyse der Hirnschnitte mittels TUNEL-Assay erbrachte einen signifikanten Anstieg an TUNEL-positiven Zellen im Kortex von *let-7b*- und Loxoribine-behandelten WT-Tieren im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21). Dieser Effekt wurde in keinem der untersuchten UNC93B1-KO-Tiere nachgewiesen.



**Abbildung 21 *Let-7b*-induzierte Apoptose im murinen Kortex erfordert UNC93B1.** Hirnschnitte von WT- und UNC93B1-KO-Tieren, welche mit Wasser (*ctrl*; WT: n = 4; UNC93B1-KO: n = 4), dem mutierten Oligonukleotid (WT: n = 6; UNC93B1-KO: n = 4), *let-7b* (WT: n = 7; UNC93B1-KO: n = 6) und Loxoribine (WT: n = 6; UNC93B1-KO: n = 6) intrathekal injiziert wurden, wurden mittels TUNEL-Assay angefärbt (grün). Unterscheide zwischen den Konditionen wurden mittels Mann-Whitney-Test berechnet, Median mit Interquartilsbereich. Inlay: 100-fache Vergrößerung einer TUNEL-positiven Zelle, der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau). Größenmaßstab: 100  $\mu$ m (Inlay: 50  $\mu$ m). Abbildung in abgeänderter Form aus Eigenpublikation (Klammer et al., 2021).

## 4. Diskussion

TLRs im ZNS sind an neurodegenerativen, aber auch an regenerativen Prozessen beteiligt (Heneka et al., 2014, Owens, 2009). Seit einigen Jahren ist bekannt, dass miRNAs im ZNS neben ihrer klassischen Rolle als posttranskriptionelle Genregulatoren auch als direkte TLR-Agonisten fungieren können. Die in dieser Arbeit verwendete miRNA *let-7b* kann in extrazellulärer Form TLR7 in Mikroglia und Neuronen aktivieren und so zu Neuroinflammation und Neurodegeneration beitragen (Lehmann et al., 2012). Dabei wird *let-7b* von sterbenden Neuronen in den Extrazellulärraum freigesetzt und löst als Danger-Signal über die Aktivierung von TLR7 die Apoptose benachbarter Neurone aus. Somit trägt *let-7b* zur Ausbreitung der initialen neuronalen Schädigung bei (Lehmann et al., 2012). Die genauen Signalwege der *let-7b*-induzierten Aktivierung von Mikroglia und Neurone sind bisher wenig bekannt; Lehmann et al. (2012) wiesen nach, dass MyD88 und IRAK-4 aktiviert werden. Der Signalweg nach TLR-Aktivierung in Neuronen mündet unter anderem in der Aktivierung von Caspase-3, der genaue Weg ist allerdings noch unbeschrieben; weitere Kaskaden wurden bisher nicht identifiziert.

Vor dem Verfassen der vorliegenden Arbeit war UNC93B1 im ZNS nur in Verbindung mit Herpes-Simplex-Virus-1-(HSV1-)Enzephalitis beschrieben (Casrouge et al., 2006). Die genauen Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen ZNS-Zellpopulationen und etwaige Funktionen dieses TLR-assoziierten Chaperon-Proteins waren bis dato unbeschrieben.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das UNC93B1 nicht nur – wie bisher bekannt – in Zellen des peripheren Immunsystems exprimiert wird, sondern auch in verschiedenen Zelltypen des ZNS. UNC93B1-Transkripte konnten zuverlässig und spezifisch mittels PCR in murinen Mikroglia, Astrozyten, Neuronen sowie Oligodendrozytenvorläuferzellen nachgewiesen werden. Die Expressionsanalysen der Zelllinien HMC3, also Mikroglia, und SH-SY5Y, also Neuroblastomzellen, weisen nach, dass UNC93B1-RNA nicht nur in murinen, sondern auch in humanen ZNS-Zellpopulationen zu finden ist.

Mittels Durchflusszytometrie und Immunzyto-/histochemie konnte die Expression von UNC93B1-Protein in den verschiedenen ZNS-Populationen bestätigt und quantifiziert werden. Weil Mikroglia als primäre Immunzellen des ZNS agieren, könnte zunächst angenommen werden, dass sie UNC93B1 stärker exprimieren als Neurone. Die FACS-Analysen zeigten jedoch eine stärkere Expression von UNC93B1 in Neuronen im Vergleich zu Mikroglia (38,2 % vs. 15,6 %). Grundsätzlich exprimieren Neurone verschiedene TLRs, inklusive der endosomalen TLRs 3, 7, 8 und 9 (Mishra et al., 2008, Tang et al., 2007). Ob neuronal

exprimiertes UNC93B1 eine Funktion hinsichtlich Immunität innehat oder eine Rolle bei der Stabilität von TLRs spielt oder sonstige Funktionen hat, ist unklar. Die vorliegende Arbeit belegt, dass UNC93B1 eine Rolle bei der miRNA-vermittelten neuronalen Apoptose spielt. Astrozyten wiederum wiesen ähnliche Konzentrationen an UNC93B1-Protein wie Mikroglia auf.

Es gibt nur wenige Daten zur Expression von UNC93B1 in ZNS-Zellen vor Anfertigung dieser Arbeit. Lafaille et al. (2012) haben die Rolle von UNC93B1 bei der Pathophysiologie der HSV-1-Enzephalitis anhand von induzierten, pluripotenten Stammzellen (iPSC) charakterisiert. Die Autor\*innen wiesen nach, dass eine Defizienz des UNC93B1-Proteins die Signaltransduktion durch TLR3 in Neuronen und Oligodendrozyten inhibiert. Dies führt zu einer schwächeren Interferon-Antwort auf eine Infektion mit HSV1, was die Immunantwort des Wirtes wahrscheinlich nicht ausreichend stimuliert, um das Virus effektiv zu beseitigen. Eine weitere Studie analysierte die Expression von UNC93B1-mRNA in verschiedenen Organen der Maus (Ramaiah et al., 2013). Hier wurde eine geringe Expression von UNC93B1-mRNA im murinen Gesamthirn beschrieben. Eine differenziertere Aufschlüsselung der Expression von UNC93B1-mRNA in den einzelnen Zellpopulationen wurde in den oben genannten Studien nicht vorgenommen. Somit charakterisiert und quantifiziert die vorliegende Arbeit erstmals die UNC93B1-Expression vergleichend in verschiedenen ZNS-Zellpopulationen.

Die vorliegenden PCR-Studien zeigten, dass die Expression von UNC93B1 mit fortschreitender Hirnentwicklung zunimmt. Die immunhistochemischen Färbungen von Mausgehirnen in verschiedenen Entwicklungsstadien stehen mit diesem Ergebnis im Einklang. Im Gegensatz hierzu bleibt die Expression von IRAK-1, einem Protein aus dem kanonischen TLR-Signalweg, während des gemessenen Zeitverlaufs weitgehend unverändert. Daten aus früheren Arbeiten meiner Arbeitsgruppe zeigten, dass von allen TLRs nur die Expression von TLR7 und 9, zwei der endosomalen TLRs, in der postnatalen Phase signifikant hochreguliert wird (Kaul et al., 2012). Diese TLRs benötigen UNC93B1 zur Signaltransduktion (Brinkmann et al., 2007). Die Daten aus RNA-Sequenzierungsstudien von Matcovitch-Natan et al. (2016) zeigen ebenfalls, dass die Expression von UNC93B1 in Mikroglia nach der Geburt ansteigt. Allerdings ist über die Funktion von UNC93B1 im Kontext der Hirnentwicklung nichts bekannt. Der parallele postnatale Anstieg der UNC93B1- sowie der TLR3- und TLR9-Expression könnte darauf hinweisen, dass UNC93B1 im Gehirn eine bisher unbekannte Funktion einnimmt und auch an der physiologischen Gehirnentwicklung beteiligt ist. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass UNC93B1 unabdingbar für die Gehirnentwicklung ist: UNC93B1-defiziente Mäuse sind durchaus lebensfähig und ihre Gehirne unterscheiden sich zumindest



makroskopisch nicht wesentlich von WT-Gehirnen. Eine genaue Charakterisierung verschiedener Gehirnregionen auf makro- und mikroskopischer Ebene liegt bis dato nicht vor, könnte aber für zukünftige Forschung interessant sein.

Dennoch gibt es Hinweise, dass insbesondere neuronal exprimierte TLRs bei der Hirnentwicklung von Vertebraten mehr als die von Lehmann et al. beschriebene apoptosevermittelnde Rolle spielen (Chen et al., 2019, Lehmann et al., 2012). Endosomale TLRs in neurogenen Progenitorzellen (NPCs) von Nagetieren regulieren deren Proliferation sowie ihre Morphologie (Hung et al., 2018, Ma et al., 2006). TLR3 beispielsweise bremst die Proliferation von NPCs und TLR3-defiziente Mäuse weisen einen kleineren Gyrus dentatus und eine kleinere CA1-Region im Hippocampus im Vergleich zu WT-Mäusen auf (Rolls et al., 2007). Eine Verstärkung der Expression oder Aktivierung von TLR3, 7 oder 8 in Neuronen führt zu einer Störung der neuronalen Differenzierung und Reifung (Liu et al., 2013). Die Expression von TLR7 und 8 beeinflusst die Morphogenese der Dendriten, wobei sich ihre Rolle im Laufe der prä- und postnatalen Reifung zu ändern scheint: Ein TLR7-Knockdown durch *in-utero*-Elektroporation ab Tag 15,5 der Embryonalentwicklung verursachte eine komplexere Arborisierung, das heißt Dendritenverästelung, von Neuronen der kortikalen Schicht 2/3 während der ersten 2 Wochen nach der Geburt (P7 und P14) im Vergleich zu unbehandelten WT-Mäusen (Liu et al., 2013). Diese Veränderung war an Tag 21 nach Geburt (P21) nicht mehr objektivierbar. Ein TLR8-Knockdown zum selben Zeitpunkt allerdings verstärkte die Arborisierung der Neurone erst an Tag 21 (P21), aber nicht an Tag 7 oder 14 (P7/14) (Hung et al., 2018). Das bedeutet, dass die genannten TLRs diese morphogenetischen Funktionen im Rahmen der Hirnentwicklung nur zu spezifischen Entwicklungszeitpunkten bedienen, gegebenenfalls da dann die jeweiligen endogenen Liganden für die Aktivierung verfügbar sind. Die Identität solcher Liganden ist bis dato nicht bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von UNC93B1 nicht nur in Gliazellen, sondern auch in Neuronen nachgewiesen. Neurone verschiedener Hirnregionen, insbesondere Hippocampus und Neocortex, exprimieren TLR7 und 9, welche bekannte Interaktionspartner für UNC93B1 sind (Kaul et al., 2012, Lehmann et al., 2012). Weitere Forschung ist notwendig, um die Funktion von UNC93B1, vor allem im Kontext neuronaler Apoptose vermittelt durch miRNAs wie *let-7b* beim sich entwickelnden Gehirn von Vertebraten zu analysieren. Warum sich die Expression von UNC93B1 bei der Hirnentwicklung dynamisch und parallel zu derjeniger bestimmter TLRs verändert, ist aktuell unbekannt. Die Funktion von UNC93B1 ist bisher – abgesehen von seiner Transportfunktion für endosomale TLRs in peripheren Immunzellen – wenig erforscht. Insbesondere seine Funktion im zentralen

Nervensystem ist kaum bekannt. Seit der Erstbeschreibung durch Tabeta et al. (2006) sind weitere Studien erschienen, die die funktionelle Bedeutung dieses Proteins in wiederum peripheren Immunzellen weiter untersuchten. Zu Anfang stand seine Rolle als Chaperon für die NA-detektierenden TLRs im Vordergrund. In Mäusen mit einer spezifischen Punktmutation für UNC93B1, der Histidin-zu-Arginin-Mutation H412R, waren die TLRs 3, 7, 8 und 9 funktionslos, weil sie ohne funktionales UNC93B1 das ER nicht verlassen konnten, um dann aktiviert zu werden (Kim et al., 2008). Neuere Daten von Pelka et al. (2018) zeigen, dass UNC93B1 nicht nur das Trafficking von TLRs reguliert, sondern auch ihre Reifung im ER steuert. Der Nachweis gelang durch die Analyse einer neuen spezifischen UNC93B1-Mutation, welche verhindert, dass UNC93B1 das ER verlassen kann und das Endosom erreicht, wodurch die Funktion des Proteins hinsichtlich des TLR-Transports aufgehoben wird. Pelka et al. (2018) beobachteten, dass die Funktion der TLRs 7, 9 und 13 trotz dieses Verbleibs von UNC93B1 im endoplasmatischen Retikulum weiterhin erhalten bleibt, und schlussfolgerten, dass UNC93B1 bereits bei der TLR-Reifung im ER eine Schlüsselrolle übernimmt.

Weitere Studien zeigen, dass UNC93B1 auch an der Feinregulation der Expression und des Aktivierungslevels von NA-detektierenden TLRs beteiligt ist. Unter anderem wurde funktionelles UNC93B1 nicht nur mit der Rekrutierung von TLR7, sondern auch mit der Beendigung der Signaltransduktion durch Überführen des Rezeptors in *multivesicular bodies* (MVB) in Verbindung gebracht (Majer et al., 2019). Eine spezifische Mutation im N-Terminus des UNC93B1-Proteins erhöht die Aktivität von TLR7, wahrscheinlich durch verzögerten Abbau in den MVBs. Der Transport in die MVBs scheint eine Art Autoregulation zu sein, durch welche sich eine Immunreaktion selbst limitiert. So könnte UNC93B1 eine Rolle bei der Vermeidung überschießender Immunreaktionen spielen, indem TLR7 zeitnah nach der Rekrutierung wieder in ein weiteres Kompartiment, die MVBs, transportiert wird, wo er abgebaut werden kann. Gerade vor dem Hintergrund, dass TLR7 ssRNA, inklusive endogene miRNAs wie *let-7b*, erkennt, ist ein solcher Regulationsschritt von signifikanter Bedeutung, um überschießende Immunreaktionen und Autoimmunität zu kontrollieren.

Weitere Studien legen nahe, dass das Angebot und die Verfügbarkeit von UNC93B1 als Transportprotein einen wichtigen Regulationsmechanismus darstellt, welcher die Balance zwischen der Expression von TLR7 und TLR9 sichert. Auch auf diese Weise kann eine Hyperaktivität dieser Rezeptoren verhindert werden (Fukui et al., 2011). In Immunzellen (Bone Marrow-Derived Dendritic Cells (BMDCs) und B-Zellen), welche UNC93B1 überexprimieren, kommt es zu unkontrollierter, TLR7-vermittelter Aktivierung. Eine Hochregulation der Expression von UNC93B1 kann beispielsweise im Mausmodell für Lupus Erythematodes, aber

auch in humanen B-Zellen von Patient\*innen mit Lupus Erythematoses beobachtet werden, was möglicherweise von großer klinischer Relevanz ist (Nakano et al., 2010). Vor allem scheint die Expression von UNC93B1 in den Immunzellen weiblicher Wildtyp-Mäuse grundsätzlich stärker zu sein als in gleichaltrigen männlichen Wildtyp-Mäusen, was zumindest teilweise die höhere Prävalenz von Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses (SLE) bei Frauen erklären könnte (Panchanathan et al., 2013). Neuere Arbeiten zeigen, dass bei Hunden mit exfoliativem, kutanem Lupus erythematoses (ECLE), welcher autoimmune Hautläsionen und gelegentlich sogar systemischen Lupus verursacht, eine Missense-Mutation (UNC93B1: c.1438C>A oder p.Pro480Thr) von UNC93B1 vorliegt (Leeb et al., 2020). Im SLE-Mausmodell kann ein Defekt von UNC93B1 die Menge der zirkulierenden antinukleären Antikörper reduzieren und Symptome der Lupusnephritis lindern (Koh et al., 2013). Weitere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Pollard et al. (2017) wiesen anhand des SLE-Mausmodells nach, dass die Expression von UNC93B1 unabdingbar ist, um bei diesen Mäusen eine systemische Autoimmunität durch Quecksilberbehandlung hervorzurufen. Obwohl bei den meisten SLE-Patient\*innen IFN-Typ-1-induzierte Gene für die Pathogenese eine bedeutsame Rolle spielen, gibt es auch IFN-unabhängige Wege. Pollard et al. (2017) konnten nachweisen, dass in diesen Fällen funktionales UNC93B1 erforderlich ist. Nicht einmal die Behandlung mit Lipid A, einem TLR4-Agonisten, welcher im Tiermodell die Entstehung von SLE und Autoimmunität fördert, konnte eine signifikante Autoantikörperproduktion in UNC93B1-defizienten Mäusen hervorrufen (Kono et al., 2009). Man kann also zusammenfassen, dass UNC93B1 eine Schlüsselrolle bei der B-Zell-gesteuerten Autoantikörperproduktion im Kontext von SLE spielt.

In einem Ischämie-Reperusionsmodell der Ratte wurde nach kurzzeitigem Abklemmen der Nierenarterie eine signifikante Hochregulation der UNC93B1-mRNA-Expression in der Niere nachgewiesen (Ramaiah et al., 2013). Es ist denkbar, dass beim ischämischen Schlaganfall im Gehirn ähnliche Regulationsmechanismen eine Rolle spielen. Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, benötigt *let-7b*-vermittelte Neurodegeneration *in vivo* funktionales UNC93B1. Grundsätzlich könnte UNC93B1 auch an der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls beteiligt sein. Dieselbe Hochregulation von UNC93B1-mRNA-Expression wurde in Mausmodellen für progressive Gewebefibrose an der Niere beobachtet. Nach einseitiger Ureterobstruktion war UNC93B1-Protein signifikant vermehrt in den endothelialen Zellen der Nierengefäße sowie der Bowman-Kapsel nachweisbar (Ramaiah et al., 2013).

Zusammenfassend wurde eine funktionelle Relevanz für UNC93B1 beim SLE und weiterer autoimmunologischer Prozesse, beim Ischämie-Reperfusionssyndrom sowie bei der

progressiven Fibrose beschrieben. Es reguliert nicht nur die Expression von TLRs, sondern ist auch an der Initiierung und Beendigung von TLR-Aktivierung und Kontrolle von Autoimmunität beteiligt. Ob UNC93B1 im ZNS solche Funktionen innehat, bleibt aktuell unklar.

Mittels Stimulation von ZNS-Zellen mit TLR-Agonisten untersuchte ich, ob sich die Expression von UNC93B1 im ZNS durch Stimulation von TLRs verändert. Es zeigte sich eine hochsignifikante Hochregulation der Expression von UNC93B1-mRNA nach Stimulation von TLR3, 4 und 7, wobei die durch TLR7 stimulierte Regulation nur nach Einsatz des endogenen TLR7-Liganden *let-7b* nachzuweisen war, jedoch nicht nach Aktivierung mit dem etablierten TLR-Agonisten Loxoribine. Dieser Effekt zeigte sich deutlich in Mikroglia, war aber auch in Neuronen nachzuweisen. Murine Neuroblastom-Zellen wiesen nur nach Stimulation mit *let-7b* eine Hochregulation von der Expression von UNC93B1-RNA auf. Auf Proteinebene ließen sich diese Ergebnisse replizieren. Wie mittels FACS nachgewiesen, führte die Stimulation von TLR3, 4 und 7 (durch *let-7b*, aber nicht Loxoribine) zu starker Hochregulation der Expression von UNC93B1. Die Interaktion zwischen TLR3 und 7 mit UNC93B1 überrascht nicht, da endosomale TLRs funktional auch im peripheren Immunsystem mit UNC93B1 interagieren (Kim et al., 2008). Eine Interaktion mit dem membranständigen TLR4 war bisher jedoch nicht beschrieben (Brinkmann et al., 2007, Kim et al., 2008, Tabeta et al., 2006). Möglicherweise kann die erhöhte Expression von UNC93B1 nach TLR4-Stimulation dadurch erklärt werden, dass Aktivierung des TLR4 auch die TNF/interferon response factor/AP-1-Signalkaskade induziert, welche den meisten TLRs gemeinsam ist und die Transkription von UNC93B1 nach sich zieht (De Nardo, 2015). Interessanterweise hat die Stimulation von TLR9, welcher im peripheren Immunsystem einen der Interaktionsrezeptoren für UNC93B1 darstellt, keine signifikante Regulation der UNC93B1-Expression ausgelöst, weder in Mikroglia noch in Neuronen. Auch die Stimulation von TLR7 durch Loxoribine konnte keine signifikante Veränderung der Expression hervorrufen. Gegebenenfalls ist die beobachtete Regulation der UNC93B1-Expression nicht nur abhängig vom Organ- und Zelltyp, sondern auch von den verfügbaren Liganden. Es fiel auf, dass Neurone eine stärkere Regulation der UNC93B1-Expression zeigten als Mikroglia. Die Stimulation mit poly(I:C), dem TLR3-Agonisten, führte zu einer fast 4-fachen Erhöhung der nachweisbaren UNC93B1-Proteinmenge, während Mikroglia vergleichsweise nur 2,5-fach mehr UNC93B1-Protein aufwiesen als die unstimulierte Kontrolle. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Mikroglia als klassisch immunkompetente Zellen durch den experimentellen Ablauf auch in der unstimulierten Kontrolle schon in einem unspezifisch aktivierten Zustand befanden (*baseline activation*).

Dadurch fielen die Unterschiede zwischen TLR-stimulierten Konditionen und unstimulierter Kontrolle gegebenenfalls weniger stark aus.

Die Expression von UNC93B1 in Neuronen und Mikroglia unterliegt also Veränderungen, welche potenziell die Funktion von TLRs modulieren. Überexpression von UNC93B1 scheint die endosomalen TLRs zu stabilisieren und in einen hyperaktiven Zustand zu versetzen (Pelka et al., 2018). Ob UNC93B1 im ZNS ähnliche Funktionen einnimmt, ist nicht bekannt. Auch die molekularen Strukturen, auf deren Grundlage UNC93B1 und TLRs interagieren, sind in Zellen des peripheren Immunsystems gut untersucht (Kim et al., 2008). Bei ZNS-Zellen sind diese Aspekte jedoch gänzlich unerforscht und nicht bekannt. Ebenfalls unklar ist, ob UNC93B1 in ZNS-Zellen als Transporter für TLRs dient, wie in peripheren Immunzellen beschrieben.

Dennoch scheint UNC93B1 eine wesentliche, funktionale Bedeutung im ZNS zu haben, wie Untersuchungen von UNC93B1-defizienten Patient\*innen zeigen. Diese Defizienz prädisponiert zur Entwicklung einer HSV-1-Enzephalitis (Casrouge et al., 2006). Der Phänotyp scheint von einer gestörten TLR3-Signalkaskade in Neuronen und Oligodendrozyten herzurühren, da Kinder mit einer autosomal-dominanten TLR3-Mutation ein erhöhtes Risiko für HSV-1-Enzephalitis aufweisen (Zhang et al., 2007). Somit könnte der Transport von TLR3 durch UNC93B1 in Neuronen bei HSV-1-Enzephalitis gestört sein. Eine Kontrollfunktion hinsichtlich der TLR-Expression könnte auch der Grund sein, warum UNC93B1-defiziente Mäuse nach Behandlung mit *let-7b* und Loxoribine im Vergleich zu WT-Mäusen keine signifikante Neurodegeneration aufweisen. Allerdings zeigen Studien an dendritischen Zellen, dass sich eine Defizienz von UNC93B1 nicht auf die Expression von TLR7 auswirkt (Brinkmann et al., 2007). Immunhistochemisch wurden keine offensichtlichen Unterschiede in Art und Intensität der TLR7-Expression in verschiedenen Hirnregionen erkannt (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise begründet sich dieser Schutz vor TLR7-induzierter Neurodegeneration auch in einer generell größeren Resistenz der UNC93B1-defizienten Tiere gegenüber allgemein neurotoxischen Prozessen, zum Beispiel weil Apoptosesignalwege generell gestört werden. Es bleibt unklar, ob UNC93B1 bei weiteren humanen ZNS-Pathologien außer HSV-1-Enzephalitis, insbesondere bei nicht-infektiösen Erkrankungen, eine Rolle spielt. Diese Aufklärung bedarf weiterer Forschung.

Die miRNA *let-7b*, welche in meiner Arbeit als extrazelluläres Signalmolekül untersucht wurde, war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung und scheint außerhalb des ZNS in diversen pathophysiologischen Zusammenhängen eine wichtige Rolle zu spielen. Beispielsweise wird vermutet, dass *let-7b* bei der Pathophysiologie von Hypoxie-assoziiierter

pulmonalarterieller Hypertension (HPH) beteiligt ist (Zhang et al., 2019a). In Rattenlungen wird die Expression von *let-7b* unter Hypoxie-Bedingungen hochreguliert, was zu einer Herunterregulierung von Angiotensin-Converting-Enzyme Typ 2 (ACE2) führt. Dies trägt zur Ausprägung des HPH-Phänotyps in Ratten bei. Ein Knockout von *let-7b* konnte die HPH-Symptome in diesen Ratten lindern, was es als mögliches therapeutisches Target für HPH erscheinen lässt. Außerdem wurde für *let-7b* eine Rolle im Kontext von Infektionen beschrieben. Ein wichtiges Merkmal von Tuberkulose ist der lange Verbleib von Tuberkelbakterien in Makrophagen des Wirtes, ohne dass diese die phagozytierten Antigene präsentieren; so können die Erreger lange der adaptiven Immunantwort entgehen. Bakteriell infizierte Zellen exprimieren üblicherweise einen sog. Todesrezeptor, den Fas-Rezeptor, über welchen zirkulierende Phagozyten die Apoptose der infizierten Zelle auslösen (Tripathi et al., 2018). *Let-7b* scheint das Überleben des Tuberkelbakteriums im Zellinneren durch Herunterregulierung des Fas-Rezeptors zu erleichtern. WT-Mäuse mit experimentell induzierter Endometriose wurden mit synthetischem *let-7b* behandelt, was zu einer Verbesserung der Symptome mit Verkleinerung der Endometrioseläsionen im Uterus einherging und pleiotrope Effekte auf Ebene der Genexpression, des Östrogen-Signalings, der inflammatorischen Reaktion und der Wachstumshormonrezeptoren induzierte (Sahin et al., 2018).

In Gliomen ist die Expression von *let-7b* gegenüber gesundem Hirngewebe verändert (Zhang et al., 2019b). Die Expression dieser miRNA ist in Gliomgeweben tendenziell herunterreguliert, und das Ausmaß dieser Herunterregulation geht mit einer schlechten Prognose einher (Buonfiglioli et al., 2019). Untersuchungen am hippocampal-entorhinalen Kortex der Ratte zeigten, dass Ethanol die Expression von TLR7 und *let-7b* stimuliert (Coleman et al., 2017). Eine Behandlung der Rattenhirne mit Ethanol führte dazu, dass Mikroglia Mikrovesikel sezernierten, welche neben dem endogenen DAMP und TLR4-Agonisten HMGB1 auch *let-7b* beinhalten und so eine neuroinflammatorische Reaktion verstärken. In humanem hippocampalem Postmortem-Gewebe von Patient\*innen mit Alkoholismus wurde eine verstärkte Expression von TLR7 und ein erhöhter Aktivierungsgrad der Mikroglia beobachtet (Coleman et al., 2017). Extrazelluläres *let-7b* wurde vermehrt im Liquor cerebrospinalis von Patient\*innen mit Alzheimer-Demenz (AD) gefunden (Derkow et al., 2018, Lehmann et al., 2012). Aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass extrazelluläres *let-7b* TLR7-abhängig Neurodegeneration induziert (Lehmann et al., 2012). Möglicherweise exazerbiert im Liquor zirkulierendes *let-7b* die Neurodegeneration bei AD.

## DISKUSSION

Diese Daten betten *let-7b* in die Pathophysiologie von AD und ggf. weiterer neurodegenerativer Erkrankungen ein.

In der vorliegenden Arbeit wies ich nach, dass UNC93B1 in unterschiedlichen Zellpopulationen des zentralen Nervensystems exprimiert wird. Es scheint eine funktionale Bedeutung sowohl bei der Hirnentwicklung als auch bei der TLR- und miRNA-induzierten Neuroinflammation und Neurodegeneration zu haben. Die aktuelle Literatur ordnet die funktionale Rolle von UNC93B1 in verschiedene klinische Kontexte ein, darunter autoimmune, infektiöse, ischämische und onkologische Pathologien. In meiner Arbeit fokussierte ich mich auf die Rolle von UNC93B1 in neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen. Die Vielfalt der bisher beschriebenen Funktionen von UNC93B1 in peripheren Immunzellen und spezifischen Organen lässt vermuten, dass auch UNC93B1 im ZNS verschiedene Funktionen und Aufgaben innehat.

## 5. Literaturverzeichnis

- AHMAD-NEJAD, P., HACKER, H., RUTZ, M., BAUER, S., VABULAS, R. M. & WAGNER, H. 2002. Bacterial CpG-DNA and Lipopolysaccharides Activate Toll-like Receptors at Distinct Cellular Compartments. *Eur J Immunol*, 32, 1958-68.
- AKIRA, S., UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- ANDERSON, K. V., BOKLA, L. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1985. Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: The Induction of Polarity by the Toll Gene Product. *Cell*, 42, 791-8.
- BARTON, G. M., KAGAN, J. C. & MEDZHITOV, R. 2006. Intracellular Localization of Toll-Like Receptor 9 Prevents Recognition of Self DNA but Facilitates Access to Viral DNA. *Nat Immunol*, 7, 49-56.
- BIRAGYN, A., RUFFINI, P. A., LEIFER, C. A., KLYUSHNENKOVA, E., SHAKHOV, A., CHERTOV, O., SHIRAKAWA, A. K., FARBER, J. M., SEGAL, D. M., OPPENHEIM, J. J. & KWAK, L. W. 2002. Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by beta-Defensin 2. *Science*, 298, 1025-9.
- BOWMAN, C. C., RASLEY, A., TRANGUCH, S. L. & MARRIOTT, I. 2003. Cultured Astrocytes Express Toll-Like Receptors for Bacterial Products. *Glia*, 43, 281-91.
- BRINKMANN, M. M., SPOONER, E., HOEBE, K., BEUTLER, B., PLOEGH, H. L. & KIM, Y. M. 2007. The Interaction Between the ER Membrane Protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 Is Crucial for TLR Signaling. *J Cell Biol*, 177, 265-75.
- BUONFIGLIOLI, A., EFE, I. E., GUNEYKAYA, D., IVANOV, A., HUANG, Y., ORLOWSKI, E., KRÜGER, C., DEISZ, R. A., MARKOVIC, D., FLÜH, C., NEWMAN, A. G., SCHNEIDER, U. C., BEULE, D., WOLF, S. A., DZAYE, O., GUTMANN, D. H., SEMTNER, M., KETTENMANN, H. & LEHNARDT, S. 2019. Let-7 MicroRNAs Regulate Microglial Function and Suppress Glioma Growth Through Toll-Like Receptor 7. *Cell Rep*, 29, 3460-3471.e7.
- CASROUGE, A., ZHANG, S. Y., EIDENSCHENK, C., JOUANGUY, E., PUEL, A., YANG, K., ALCAIS, A., PICARD, C., MAHFOUFI, N., NICOLAS, N., LORENZO, L., PLANCOULAIN, S., SÉNÉCHAL, B., GEISSMANN, F., TABETA, K., HOEBE, K., DU, X., MILLER, R. L., HÉRON, B., MIGNOT, C., DE VILLEMEUR, T. B., LEBON, P., DULAC, O., ROZENBERG, F., BEUTLER, B., TARDIEU, M., ABEL, L. & CASANOVA, J. L. 2006. Herpes Simplex Virus Encephalitis in Human UNC-93B Deficiency. *Science*, 314, 308-12.
- CHEN, C. Y., SHIH, Y. C., HUNG, Y. F. & HSUEH, Y. P. 2019. Beyond Defense: Regulation of Neuronal Morphogenesis and Brain Functions via Toll-Like Receptors. *J Biomed Sci*, 26, 90.
- COLEMAN, L. G., JR., ZOU, J. & CREWS, F. T. 2017. Microglial-Derived miRNA let-7 and HMGB1 Contribute to Ethanol-Induced Neurotoxicity via TLR7. *J Neuroinflammation*, 14, 22.
- DE NARDO, D. 2015. Toll-Like Receptors: Activation, Signalling and Transcriptional Modulation. *Cytokine*, 74, 181-9.
- DEANE, J. A., PISITKUN, P., BARRETT, R. S., FEIGENBAUM, L., TOWN, T., WARD, JERROLD M., FLAVELL, R. A. & BOLLAND, S. 2007. Control of Toll-Like Receptor 7 Expression Is Essential to Restrict Autoimmunity and Dendritic Cell Proliferation. *Immunity*, 27, 801-810.



- DEGUINE, J. & BARTON, G. M. 2014. MyD88: A Central Player in Innate Immune Signaling. *F1000Prime Rep*, 6, 97.
- DERKOW, K., RÖSSLING, R., SCHIPKE, C., KRÜGER, C., BAUER, J., FÄHLING, M., STROUX, A., SCHOTT, E., RUPRECHT, K., PETERS, O. & LEHNARDT, S. 2018. Distinct Expression of the Neurotoxic MicroRNA Family let-7 in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Alzheimer's Disease. *PLoS One*, 13, e0200602.
- EWALD, S. E., ENGEL, A., LEE, J., WANG, M., BOGYO, M. & BARTON, G. M. 2011. Nucleic Acid Recognition by Toll-Like Receptors Is Coupled to Stepwise Processing by Cathepsins and Asparagine Endopeptidase. *The Journal of Experimental Medicine*, 208, 643-651.
- FARINA, C., KRUMBHOLZ, M., GIESE, T., HARTMANN, G., ALOISI, F. & MEINL, E. 2005. Preferential Expression and Function of Toll-Like Receptor 3 in Human Astrocytes. *J Neuroimmunol*, 159, 12-9.
- FORSBACH, A., NEMORIN, J. G., MONTINO, C., MÜLLER, C., SAMULOWITZ, U., VICARI, A. P., JURK, M., MUTWIRI, G. K., KRIEG, A. M., LIPFORD, G. B. & VOLLMER, J. 2008. Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses. *J Immunol*, 180, 3729-38.
- FUKUI, R., SAITOH, S., KANNO, A., ONJI, M., SHIBATA, T., ITO, A., MATSUMOTO, M., AKIRA, S., YOSHIDA, N. & MIYAKE, K. 2011. UNC93B1 Restricts Systemic Lethal Inflammation by Orchestrating Toll-Like Receptor 7 and 9 Trafficking. *Immunity*, 35, 69-81.
- GAY, N. J. & GANGLOFF, M. 2007. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 141-165.
- GAY, N. J., GANGLOFF, M. & WEBER, A. N. R. 2006. Toll-Like Receptors as Molecular Switches. *Nature Reviews Immunology*, 6, 693.
- GEARHART, P. J. 2004. The Birth of Molecular Immunology. *The Journal of Immunology*, 173, 4259-4259.
- GLEZER, I., SIMARD, A. R. & RIVEST, S. 2007. Neuroprotective Role of the Innate Immune System by Microglia. *Neuroscience*, 147, 867-83.
- GRIFFITHS-JONES, S. 2007. Annotating Noncoding RNA Genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8, 279-98.
- GRÜTTER, M. G. 2000. Caspases: Key Players in Programmed Cell Death. *Curr Opin Struct Biol*, 10, 649-55.
- HENEKA, M. T., KUMMER, M. P. & LATZ, E. 2014. Innate Immune Activation in Neurodegenerative Disease. *Nat Rev Immunol*, 14, 463-77.
- HOFFMANN, O., BRAUN, J. S., BECKER, D., HALLE, A., FREYER, D., DAGAND, E., LEHNARDT, S. & WEBER, J. R. 2007. TLR2 Mediates Neuroinflammation and Neuronal Damage. *J Immunol*, 178, 6476-81.
- HUANG, Y. H., HOEBE, K. & SAUER, K. 2008. New Therapeutic Targets in Immune Disorders: ItpkB, Orail and UNC93B. *Expert Opin Ther Targets*, 12, 391-413.
- HUH, J. W., SHIBATA, T., HWANG, M., KWON, E. H., JANG, M. S., FUKUI, R., KANNO, A., JUNG, D. J., JANG, M. H., MIYAKE, K. & KIM, Y. M. 2014. UNC93B1 Is Essential for the Plasma Membrane Localization and Signaling of Toll-Like Receptor 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 7072-7.
- HUNG, Y. F., CHEN, C. Y., SHIH, Y. C., LIU, H. Y., HUANG, C. M. & HSUEH, Y. P. 2018. Endosomal TLR3, TLR7, and TLR8 Control Neuronal Morphology Through Different Transcriptional Programs. *J Cell Biol*, 217, 2727-2742.

- IGNACIO, G., NORDONE, S., HOWARD, K. E. & DEAN, G. A. 2005. Toll-Like Receptor Expression in Feline Lymphoid Tissues. *Vet Immunol Immunopathol*, 106, 229-37.
- IRIBARREN, P., CUI, Y. H., LE, Y. & WANG, J. M. 2002. The Role of Dendritic Cells in Neurodegenerative Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 50, 187-96.
- ISHII, N., FUNAMI, K., TATEMATSU, M., SEYA, T. & MATSUMOTO, M. 2014. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J Immunol*, 193, 5118-28.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. 2004. Toll-Like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses. *Nat Immunol*, 5, 987-95.
- JANA, M., PALENCIA, C. A. & PAHAN, K. 2008. Fibrillar Amyloid-Beta Peptides Activate Microglia via TLR2: Implications for Alzheimer's Disease. *J Immunol*, 181, 7254-62.
- JANEWAY, C. A. & MEDZHITOV, R. 2002. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197-216.
- JOSEFOWICZ, S. Z., LU, L.-F. & RUDENSKY, A. Y. 2012. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology*, 30, 531-564.
- KARIKO, K., NI, H., CAPODICI, J., LAMPHIER, M. & WEISSMAN, D. 2004. mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-Like Receptor 3. *J Biol Chem*, 279, 12542-50.
- KASHUBA, V. I., PROTOPOPOV, A. I., KVASHA, S. M., GIZATULLIN, R. Z., WAHLESTEDT, C., KISSELEV, L. L., KLEIN, G. & ZABAROVSKY, E. R. 2002. hUNC93B1: A Novel Human Gene Representing a New Gene Family and Encoding an Unc-93-Like Protein. *Gene*, 283, 209-17.
- KAUL, D., HABEL, P., DERKOW, K., KRÜGER, C., FRANZONI, E., WULCZYN, F. G., BERESWILL, S., NITSCH, R., SCHOTT, E., VEH, R., NAUMANN, T. & LEHNARDT, S. 2012. Expression of Toll-Like Receptors in the Developing Brain. *PLoS One*, 7, e37767.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, 13, 460-9.
- KIM, D., KIM, M. A., CHO, I. H., KIM, M. S., LEE, S., JO, E. K., CHOI, S. Y., PARK, K., KIM, J. S., AKIRA, S., NA, H. S., OH, S. B. & LEE, S. J. 2007. A Critical Role of Toll-Like Receptor 2 in Nerve Injury-Induced Spinal Cord Glial Cell Activation and Pain Hypersensitivity. *J Biol Chem*, 282, 14975-83.
- KIM, Y. M., BRINKMANN, M. M., PAQUET, M. E. & PLOEGH, H. L. 2008. UNC93B1 Delivers Nucleotide-Sensing Toll-Like Receptors to Endolysosomes. *Nature*, 452, 234-8.
- KLAMMER, M. G., DZAYE, O., WALLACH, T., KRÜGER, C., GAESSLER, D., BUONFIGLIOLI, A., DERKOW, K., KETTENMANN, H., BRINKMANN, M. M. & LEHNARDT, S. 2021. UNC93B1 Is Widely Expressed in the Murine CNS and Is Required for Neuroinflammation and Neuronal Injury Induced by MicroRNA let-7b. *Frontiers in Immunology*, 12.
- KOH, Y. T., SCATIZZI, J. C., GAHAN, J. D., LAWSON, B. R., BACCALA, R., POLLARD, K. M., BEUTLER, B. A., THEOFILOPOULOS, A. N. & KONO, D. H. 2013. Role of Nucleic Acid-Sensing TLRs in Diverse Autoantibody Specificities and Anti-nuclear Antibody-Producing B Cells. *J Immunol*, 190, 4982-90.
- KONO, D. H., HARALDSSON, M. K., LAWSON, B. R., POLLARD, K. M., KOH, Y. T., DU, X., ARNOLD, C. N., BACCALA, R., SILVERMAN, G. J., BEUTLER, B. A. & THEOFILOPOULOS, A. N. 2009. Endosomal TLR Signaling Is Required for Anti-Nucleic Acid and Rheumatoid Factor Autoantibodies in Lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12061-6.

- LAFAILLE, F. G., PESSACH, I. M., ZHANG, S. Y., CIANCANELLI, M. J., HERMAN, M., ABHYANKAR, A., YING, S. W., KEROS, S., GOLDSTEIN, P. A., MOSTOSLAVSKY, G., ORDOVAS-MONTANES, J., JOUANGUY, E., PLANCOULAIN, S., TU, E., ELKABETZ, Y., AL-MUHSEN, S., TARDIEU, M., SCHLAEGER, T. M., DALEY, G. Q., ABEL, L., CASANOVA, J. L., STUDER, L. & NOTARANGELO, L. D. 2012. Impaired Intrinsic Immunity to HSV-1 in Human iPSC-Derived TLR3-Deficient CNS Cells. *Nature*, 491, 769-73.
- LAIRD, D. J., DE TOMASO, A. W., COOPER, M. D. & WEISSMAN, I. L. 2000. 50 Million Years of Chordate Evolution: Seeking the Origins of Adaptive Immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6924-6926.
- LATZ, E., VISINTIN, A., LIEN, E., FITZGERALD, K. A., MONKS, B. G., KURT-JONES, E. A., GOLENBOCK, D. T. & ESPEVIK, T. 2002. Lipopolysaccharide Rapidly Traffics to and From the Golgi Apparatus With the Toll-Like Receptor 4-MD-2-CD14 Complex in a Process That Is Distinct From the Initiation of Signal Transduction. *J Biol Chem*, 277, 47834-43.
- LEE, J. Y., LEE, J. D., PHIPPS, S., NOAKES, P. G. & WOODRUFF, T. M. 2015. Absence of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Extends Survival in the hSOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuroinflammation*, 12, 90.
- LEEB, T., LEUTHARD, F., JAGANNATHAN, V., KIENER, S., LETKO, A., ROOSJE, P., WELLE, M. M., GAILBREATH, K. L., CANNON, A., LINEK, M., BANOVIC, F., OLIVRY, T., WHITE, S. D., BATCHER, K., BANNASCH, D., MINOR, K. M., MICKELSON, J. R., HYTÖNEN, M. K., LOHI, H., MAULDIN, E. A. & CASAL, M. L. 2020. A Missense Variant Affecting the C-Terminal Tail of UNC93B1 in Dogs with Exfoliative Cutaneous Lupus Erythematosus (ECLE). *Genes (Basel)*, 11.
- LEHMANN, S. M., KRÜGER, C., PARK, B., DERKOW, K., ROSENBERGER, K., BAUMGART, J., TRIMBUCH, T., EOM, G., HINZ, M., KAUL, D., HABEL, P., KÄLIN, R., FRANZONI, E., RYBAK, A., NGUYEN, D., VEH, R., NINNEMANN, O., PETERS, O., NITSCH, R., HEPPNER, F. L., GOLENBOCK, D., SCHOTT, E., PLOEGH, H. L., WULCZYN, F. G. & LEHNARDT, S. 2012. An Unconventional Role for miRNA: Let-7 Activates Toll-Like Receptor 7 and Causes Neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 15, 827-35.
- LEHNARDT, S. 2010. Innate Immunity and Neuroinflammation in the CNS: The Role of Microglia in Toll-Like Receptor-Mediated Neuronal Injury. *Glia*, 58, 253-63.
- LEHNARDT, S., LACHANCE, C., PATRIZI, S., LEFEBVRE, S., FOLLETT, P. L., JENSEN, F. E., ROSENBERG, P. A., VOLPE, J. J. & VARTANIAN, T. 2002. The Toll-Like Receptor TLR4 Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Oligodendrocyte Injury in the CNS. *J Neurosci*, 22, 2478-86.
- LEHNARDT, S., LEHMANN, S., KAUL, D., TSCHIMMEL, K., HOFFMANN, O., CHO, S., KRUEGER, C., NITSCH, R., MEISEL, A. & WEBER, J. R. 2007. Toll-Like Receptor 2 Mediates CNS Injury in Focal Cerebral Ischemia. *J Neuroimmunol*, 190, 28-33.
- LEHNARDT, S., MASSILLON, L., FOLLETT, P., JENSEN, F. E., RATAN, R., ROSENBERG, P. A., VOLPE, J. J. & VARTANIAN, T. 2003. Activation of Innate Immunity in the CNS Triggers Neurodegeneration Through a Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8514-9.
- LEHNARDT, S., SCHOTT, E., TRIMBUCH, T., LAUBISCH, D., KRUEGER, C., WULCZYN, G., NITSCH, R. & WEBER, J. R. 2008. A Vicious Cycle Involving Release of Heat Shock Protein 60 From Injured Cells and Activation of Toll-Like Receptor 4 Mediates Neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci*, 28, 2320-31.

- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1996. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spätzle/Toll/Cactus Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, 86, 973-83.
- LETIEMBRE, M., LIU, Y., WALTER, S., HAO, W., PFANDER, T., WREDE, A., SCHULZ-SCHAEFFER, W. & FASSBENDER, K. 2009. Screening of Innate Immune Receptors in Neurodegenerative Diseases: A Similar Pattern. *Neurobiol Aging*, 30, 759-68.
- LEVIN, J. Z. & HORVITZ, H. R. 1992. The *Caenorhabditis Elegans* unc-93 Gene Encodes a Putative Transmembrane Protein That Regulates Muscle Contraction. *J Cell Biol*, 117, 143-55.
- LIM, L. P., GLASNER, M. E., YEKTA, S., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2003. Vertebrate microRNA Genes. *Science*, 299, 1540.
- LIN, S.-C., LO, Y.-C. & WU, H. 2010. Helical Assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 Complex in TLR/IL-1R Signalling. *Nature*, 465, 885.
- LITMAN, G. W. & COOPER, M. D. 2007. Why Study the Evolution of Immunity? *Nature Immunology*, 8, 547.
- LIU, H. Y., HONG, Y. F., HUANG, C. M., CHEN, C. Y., HUANG, T. N. & HSUEH, Y. P. 2013. TLR7 Negatively Regulates Dendrite Outgrowth Through the MyD88-C-Fos-IL-6 Pathway. *J Neurosci*, 33, 11479-93.
- LIU, Y., DODDS, P., EMILION, G., MUNGALL, A. J., DUNHAM, I., BECK, S., WELLS, R. S., CHARNOCK, F. M. & GANESAN, T. S. 2002. The Human Homologue of unc-93 Maps to Chromosome 6q27 - Characterisation and Analysis in Sporadic Epithelial Ovarian Cancer. *BMC Genet*, 3, 20.
- LIU, Y., WALTER, S., STAGI, M., CHERNY, D., LETIEMBRE, M., SCHULZ-SCHAEFFER, W., HEINE, H., PENKE, B., NEUMANN, H. & FASSBENDER, K. 2005. LPS Receptor (CD14): A Receptor for Phagocytosis of Alzheimer's Amyloid Peptide. *Brain*, 128, 1778-89.
- MA, Y., HAYNES, R. L., SIDMAN, R. L. & VARTANIAN, T. 2007. TLR8: An Innate Immune Receptor in Brain, Neurons and Axons. *Cell Cycle*, 6, 2859-68.
- MA, Y., LI, J., CHIU, I., WANG, Y., SLOANE, J. A., LÜ, J., KOSARAS, B., SIDMAN, R. L., VOLPE, J. J. & VARTANIAN, T. 2006. Toll-Like Receptor 8 Functions as a Negative Regulator of Neurite Outgrowth and Inducer of Neuronal Apoptosis. *J Cell Biol*, 175, 209-15.
- MAJER, O., LIU, B., KREUK, L. S. M., KROGAN, N. & BARTON, G. M. 2019. UNC93B1 Recruits Syntenin-1 to Dampen TLR7 Signalling and Prevent Autoimmunity. *Nature*, 575, 366-370.
- MATCOVITCH-NATAN, O., WINTER, D. R., GILADI, A., VARGAS AGUILAR, S., SPINRAD, A., SARRAZIN, S., BEN-YEHUDA, H., DAVID, E., ZELADA GONZÁLEZ, F., PERRIN, P., KEREN-SHAUL, H., GURY, M., LARA-ASTAISO, D., THAISS, C. A., COHEN, M., BAHAR HALPERN, K., BARUCH, K., DECZKOWSKA, A., LORENZO-VIVAS, E., ITZKOVITZ, S., ELINAV, E., SIEWEKE, M. H., SCHWARTZ, M. & AMIT, I. 2016. Microglia Development Follows a Stepwise Program to Regulate Brain Homeostasis. *Science*, 353, aad8670.
- MAURI, C. & BOSMA, A. 2012. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*, 30, 221-241.
- MISHRA, B. B., GUNDRU, U. M. & TEALE, J. M. 2008. Expression and Distribution of Toll-Like Receptors 11-13 in the Brain During Murine Neurocysticercosis. *J Neuroinflammation*, 5, 53.

- NAKANO, S., MORIMOTO, S., SUZUKI, S., WATANABE, T., AMANO, H. & TAKASAKI, Y. 2010. Up-Regulation of the Endoplasmic Reticulum Transmembrane Protein UNC93B in the B Cells of Patients With Active Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, 49, 876-81.
- NETEA, MIHAI G., QUINTIN, J. & VAN DER MEER, JOS W. M. 2011. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe*, 9, 355-361.
- NIELSEN, C. B., SHOMRON, N., SANDBERG, R., HORNSTEIN, E., KITZMAN, J. & BURGE, C. B. 2007. Determinants of Targeting by Endogenous and Exogenous MicroRNAs and siRNAs. *Rna*, 13, 1894-910.
- NISHIYA, T. & DEFRANCO, A. L. 2004. Ligand-Regulated Chimeric Receptor Approach Reveals Distinctive Subcellular Localization and Signaling Properties of the Toll-Like Receptors. *J Biol Chem*, 279, 19008-17.
- O'NEILL, L. A. J. & BOWIE, A. G. 2007. The Family of Five: TIR-Domain-Containing Adaptors in Toll-Like Receptor Signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7, 353.
- OLDENBURG, M., KRUGER, A., FERSTL, R., KAUFMANN, A., NEES, G., SIGMUND, A., BATHKE, B., LAUTERBACH, H., SUTER, M., DREHER, S., KOEDEL, U., AKIRA, S., KAWAI, T., BUER, J., WAGNER, H., BAUER, S., HOCHREIN, H. & KIRSCHNING, C. J. 2012. TLR13 Recognizes Bacterial 23S rRNA Devoid of Erythromycin Resistance-Forming Modification. *Science*, 337, 1111-5.
- OWENS, T. 2009. Toll-Like Receptors in Neurodegeneration. *Curr Top Microbiol Immunol*, 336, 105-20.
- PAIS, T. F., FIGUEIREDO, C., PEIXOTO, R., BRAZ, M. H. & CHATTERJEE, S. 2008. Necrotic Neurons Enhance Microglial Neurotoxicity Through Induction of Glutaminase by a MyD88-Dependent Pathway. *J Neuroinflammation*, 5, 43.
- PANCHANATHAN, R., LIU, H. & CHOUBEY, D. 2013. Expression of Murine UNC93B1 Is Up-Regulated by Interferon and Estrogen Signaling: Implications for Sex Bias in the Development of Autoimmunity. *Int Immunol*, 25, 521-9.
- PARHAM, P. 2005. Putting a Face to MHC Restriction. *The Journal of Immunology*, 174, 3-5.
- PAUL, W. E. 2013. *Fundamental immunology*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- PELKA, K., BERTHELOOT, D., REIMER, E., PHULPHAGAR, K., SCHMIDT, S. V., CHRIST, A., STAHL, R., WATSON, N., MIYAKE, K., HACOHEN, N., HAAS, A., BRINKMANN, M. M., MARSHAK-ROTHSTEIN, A., MEISSNER, F. & LATZ, E. 2018. The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport. *Immunity*, 48, 911-922.e7.
- PISITKUN, P., DEANE, J. A., DIFILIPPANTONIO, M. J., TARASENKO, T., SATTERTHWAITE, A. B. & BOLLAND, S. 2006. Autoreactive B Cell Responses to RNA-Related Antigens Due to TLR7 Gene Duplication. *Science*, 312, 1669-1672.
- POLLARD, K. M., ESCALANTE, G. M., HUANG, H., HARALDSSON, K. M., HULTMAN, P., CHRISTY, J. M., PAWAR, R. D., MAYEUX, J. M., GONZALEZ-QUINTIAL, R., BACCALA, R., BEUTLER, B., THEOFILOPOULOS, A. N. & KONO, D. H. 2017. Induction of Systemic Autoimmunity by a Xenobiotic Requires Endosomal TLR Trafficking and Signaling from the Late Endosome and Endolysosome but Not Type I IFN. *J Immunol*, 199, 3739-3747.
- RAMAIAH, S. K., GÜNTNER, R., LECH, M. & ANDERS, H. J. 2013. Toll-Like Receptor and Accessory Molecule mRNA Expression in Humans and Mice as Well as in Murine Autoimmunity, Transient Inflammation, and Progressive Fibrosis. *Int J Mol Sci*, 14, 13213-30.

- REINHART, B. J., SLACK, F. J., BASSON, M., PASQUINELLI, A. E., BETTINGER, J. C., ROUGVIE, A. E., HORVITZ, H. R. & RUVKUN, G. 2000. The 21-Nucleotide Let-7 RNA Regulates Developmental Timing in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature*, 403, 901-6.
- RINK, L. 2012. *Immunologie für Einsteiger*, Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.
- ROLLS, A., SHECHTER, R., LONDON, A., ZIV, Y., RONEN, A., LEVY, R. & SCHWARTZ, M. 2007. Toll-Like Receptors Modulate Adult Hippocampal Neurogenesis. *Nat Cell Biol*, 9, 1081-8.
- ROSENBERGER, K., DERKOW, K., DEMBNY, P., KRUGER, C., SCHOTT, E. & LEHNARDT, S. 2014. The Impact of Single and Pairwise Toll-Like Receptor Activation on Neuroinflammation and Neurodegeneration. *J Neuroinflammation*, 11, 166.
- SAHIN, C., MAMILLAPALLI, R., YI, K. W. & TAYLOR, H. S. 2018. microRNA Let-7b: A Novel Treatment for Endometriosis. *J Cell Mol Med*, 22, 5346-5353.
- SMILEY, S. T., KING, J. A. & HANCOCK, W. W. 2001. Fibrinogen Stimulates Macrophage Chemokine Secretion Through Toll-Like Receptor 4. *J Immunol*, 167, 2887-94.
- STEIN, D., ROTH, S., VOGELSANG, E. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1991. The Polarity of the Dorsoventral Axis in the *Drosophila* Embryo Is Defined by an Extracellular Signal. *Cell*, 65, 725-35.
- TABETA, K., HOEBE, K., JANSSEN, E. M., DU, X., GEORGEL, P., CROZAT, K., MUDD, S., MANN, N., SOVATH, S., GOODE, J., SHAMEL, L., HERSKOVITS, A. A., PORTNOY, D. A., COOKE, M., TARANTINO, L. M., WILTSHIRE, T., STEINBERG, B. E., GRINSTEIN, S. & BEUTLER, B. 2006. The Unc93b1 Mutation 3D Disrupts Exogenous Antigen Presentation and Signaling via Toll-Like Receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol*, 7, 156-64.
- TANG, S. C., ARUMUGAM, T. V., XU, X., CHENG, A., MUGHAL, M. R., JO, D. G., LATHIA, J. D., SILER, D. A., CHIGURUPATI, S., OUYANG, X., MAGNUS, T., CAMANDOLA, S. & MATTSON, M. P. 2007. Pivotal Role for Neuronal Toll-Like Receptors in Ischemic Brain Injury and Functional Deficits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 13798-803.
- TANJI, H., OHTO, U., SHIBATA, T., MIYAKE, K. & SHIMIZU, T. 2013. Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic Ligands. *Science*, 339, 1426-1429.
- TRIPATHI, A., SRIVASTAVA, V. & SINGH, B. N. 2018. has-let-7B-5p Facilitates Mycobacterium Tuberculosis Survival in THP-1 Human Macrophages by Fas Downregulation. *FEMS Microbiol Lett*, 365.
- VAN NOORT, J. M. & BSIBSI, M. 2009. Toll-Like Receptors in the CNS: Implications for Neurodegeneration and Repair. *Prog Brain Res*, 175, 139-48.
- VIDYA, M. K., KUMAR, V. G., SEJIAN, V., BAGATH, M., KRISHNAN, G. & BHATTA, R. 2018. Toll-Like Receptors: Significance, Ligands, Signaling Pathways, and Functions in Mammals. *Int Rev Immunol*, 37, 20-36.
- WALTER, S., LETIEMBRE, M., LIU, Y., HEINE, H., PENKE, B., HAO, W., BODE, B., MANIETTA, N., WALTER, J., SCHULZ-SCHUFFER, W. & FASSBENDER, K. 2007. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*, 20, 947-56.
- WANG, C., DENG, L., HONG, M., AKKARAJU, G. R., INOUE, J.-I. & CHEN, Z. J. 2001. TAK1 Is a Ubiquitin-Dependent Kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 346.
- YATIM, K. M. & LAKKIS, F. G. 2015. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10, 1274-81.

## LITERATURVERZEICHNIS

- ZHANG, R., SU, H., MA, X., XU, X., LIANG, L., MA, G. & SHI, L. 2019a. MiRNA let-7b Promotes the Development of Hypoxic Pulmonary Hypertension by Targeting ACE2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 316, L547-1557.
- ZHANG, S. Y., JOUANGUY, E., UGOLINI, S., SMAHI, A., ELAIN, G., ROMERO, P., SEGAL, D., SANCHO-SHIMIZU, V., LORENZO, L., PUEL, A., PICARD, C., CHAPGIER, A., PLANCOULAIN, S., TITEUX, M., COGNET, C., VON BERNUTH, H., KU, C. L., CASROUGE, A., ZHANG, X. X., BARREIRO, L., LEONARD, J., HAMILTON, C., LEBON, P., HÉRON, B., VALLÉE, L., QUINTANA-MURCI, L., HOVNANIAN, A., ROZENBERG, F., VIVIER, E., GEISSMANN, F., TARDIEU, M., ABEL, L. & CASANOVA, J. L. 2007. TLR3 Deficiency in Patients With Herpes Simplex Encephalitis. *Science*, 317, 1522-7.
- ZHANG, W., ZHAO, W., GE, C., LI, X., YANG, X., XIANG, Y. & SUN, Z. 2019b. Decreased let-7b Is Associated With Poor Prognosis in Glioma. *Medicine (Baltimore)*, 98, e15784.
- ZHU, Y. & CHEN, L. 2009. Turning the Tide of Lymphocyte Costimulation. *The Journal of Immunology*, 182, 2557-2558.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Markus Klammer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Expression und Funktion von UNC93B1 im zentralen Nervensystem“ (engl. Titel: „Expression and Function of UNC93B1 in the Central Nervous System“ 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, Prof. Dr. Seija Lehnardt, 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



**Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Markus Klammer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Klammer, M. G., Dzaye, O., Wallach, T., Krüger, C., Gaessler, D., Buonfiglioli, A., Derkow, K., Kettenmann, H., Brinkmann, M. M., & Lehnardt, S. (2021). *UNC93B1 Is Widely Expressed in the Murine CNS and Is Required for Neuroinflammation and Neuronal Injury Induced by MicroRNA let-7b*. *Frontiers in Immunology*, 12, 715774.

Beitrag im Einzelnen: Markus Klammer generierte den Großteil der verwendeten Daten in dieser Publikation und führte sämtliche statistische Auswertungen durch. Die in den Abbildungen verwendeten Bilder und Graphen sind bis auf wenige Ausnahmen in den Figures 1 und 2 des Artikels alle durch Markus Klammer erstellt worden. Der Methodik- und Ergebnisteil sowie sämtliche Legenden der Publikation wurden durch Markus Klammer verfasst.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden

# Lebenslauf

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

## Publikationsliste

- 2022            Polymeris, A. A., Meinel, T. R., Oehler, H., Hölscher, K., Zietz, A., Scheitz, J. F., Nolte, C. H., Stretz, C., Yaghi, S., Stoll, S., Wang, R., Häusler, K. G., Hellwig, S., **Klammer, M.**, Litmeier, S., Leon Guerrero, C. R., Moeini-Naghani, I., Michel, P., Strambo, D., Salerno, A., ... Seiffge, D. J. (2022). Aetiology, secondary prevention strategies and outcomes of ischaemic stroke despite oral anticoagulant therapy in patients with atrial fibrillation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, jnnp-2021-328391.
- 2021            **Klammer, M.**, Dzaye, O., Wallach, T., Krüger, C., Gaessler, D., Buonfiglioli, A., Derkow, K., Kettenmann, H., Brinkmann, M. M., & Lehnardt, S. (2021). UNC93B1 Is Widely Expressed in the Murine CNS and Is Required for Neuroinflammation and Neuronal Injury Induced by MicroRNA *let-7b*. *Frontiers in immunology*, 12, 715774.

# Danksagung

Das Schreiben einer Doktorarbeit kostet viel Arbeit und Zeit. Dies wäre niemals allein möglich gewesen.

Zuallererst möchte ich meiner Doktormutter, Prof. Dr. Seija Lehnardt, für die Möglichkeit dieser spannenden und lehrreichen Promotion sowie für die stetige, zuverlässige Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen danken.

Des Weiteren möchte ich der gesamten AG Lehnardt danken: Dr. Katja Derkow, welche mich gerade am Anfang an die Hand genommen hat; Christina Krüger, welche mir geduldig und immer wieder die Präparation von primären Neuronenkulturen, aber auch viele andere Labortechniken gezeigt hat; Dr. Patricia Schröder, Dr. Paul Dembny und Alice Buonfiglioli, PhD, welche immer für gute Stimmung im Labor gesorgt haben; Jutta Schüler, welche mir den richtigen Umgang mit dem Fluoreszenzmikroskop beigebracht hat.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich dem Max-Planck-Institut und der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken, welche mich über ein Jahr mit einem Vollstipendium gefördert haben.

Außerdem möchte ich meiner Familie danken: meinen Eltern Manfred Klammer und Eva Maria Kofler, welche mich finanziell und emotional über das gesamte Studium hinweg unterstützt haben: ohne euch wäre das alles hier niemals möglich gewesen; meinen Geschwistern Magdalena, Maximilian, Martina, Marion und Meinhard: mit euch im Rücken ist alles einfacher.

Ich möchte mich auch bei meinen Freundinnen und Freunden für ihre Unterstützung bedanken: Cynthia und Iris, welche wissen, wieviel Arbeit in so einer Doktorarbeit steckt; Greta, Lukas, Moni, Julia und Basti, welche schon seit vielen Jahren immer mit nützlichem Ratschlag für mich da sind; meinem Chor, den Village Voices Berlin, welche mich trotz häufigem Fehlen immer wieder in den Proben willkommen hießen.

Im Speziellen möchte ich noch einmal Martina und Greta danken, welche diese Arbeit korrekturgelesen haben.

Die größte tagtägliche Unterstützung kam aber von meinem Partner Hugo, der immer an mich und diese Arbeit geglaubt hat: ich wüsste nicht, wo ich ohne dich wäre.

# Bescheinigung über statistische Beratung



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 552171  
geraldine.rauch@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



**Name, Vorname:** Markus Klammer  
**Emailadresse:** markus.klammer@charite.de  
**Matrikelnummer:** 215741  
**PromotionsbetreuerIn:** Prof. Dr. Seija Lehnardt  
**Promotionsinstitution / Klinik:** Institut für Zell- und Neurobiologie

## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr *Markus Klammer* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 19.04.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Nicht-parametrische Tests bei Gruppenvergleichen mit niedriger Fallzahl
- Median mit IQR berichten
- Für Darstellungen Boxplots verwenden (bei  $n = 3$  können Punkte dargestellt werden)

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum:

Name des Beraters/ der Beraterin:



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

