

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Dr. Senckenbergische Anatomie  
Institut für Anatomie II  
Experimentelle Neurobiologie  
Komm. Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Verteilung von TLR 2 und TLR 4 Rezeptoren in den  
circumventriculären Organen der Wistar Ratte  
- Speziell im Subcommissuralorgan -**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Elisabeth Ariane Ernst

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Frank Nürnberger
Korreferent:	Prof. Dr. Alexander Steinle
Tag der mündlichen Prüfung:	10.03.2021

Für meine lieben Eltern Sylvia und Michael, sowie meine Großmutter Lieselotte.

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
1.1	Abbildungsverzeichnis	6
1.2	Tabellenverzeichnis	6
1.3	Abkürzungsverzeichnis	7
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
4.1	Die circumventriculären Organe	12
4.2	Das Subcommissuralorgan (SCO)	16
4.3	Das humane Immunsystem	21
4.3.1	Das Immunsystem - Ein kurzer Überblick	21
4.3.2	Das angeborene Immunsystem	21
4.3.3	Das erworbene Immunsystem	22
4.4	Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem	23
4.5	Toll-like Rezeptoren (TLR)	24
4.6	TLR 2	28
4.7	TLR 4	30
4.8	Die Rolle von TLR im zentralen Nervensystem, besonders in den CVOs	32
4.9	Fragestellung	33
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>34</b>
5.1	Versuchstiere und Gewebeerzeugung	34
5.1.1	Versuchstiere	34
5.1.2	Anästhesie	34
5.1.3	Perfusion	34
5.1.4	Entnahme des Gehirns	35
5.1.5	Gewebefixierung	35
5.1.6	Gewebeschnitte	35
5.2	Materialien und Gerätschaften	36
5.2.1	Puffer und Lösungen	37
5.3	Immunhistochemie	40
5.3.1	Avidin-Biotin-Methode (LAB-Methode)	41

5.3.2	Inhibition endogener Peroxidase	42
5.3.3	Primäre Antikörper	43
5.3.4	Sekundäre Antikörper	43
5.3.5	Avidin Komplex	43
5.3.6	DAB-Farbreaktion	43
5.3.7	Entwässerung und Fertigstellung	44
5.4	Auswertung	44
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
6.1	Verteilung TLR2 und TLR4 im Subcommissuralorgan	46
6.1.1	Immunreaktivität gegen TLR2 im SCO	46
6.1.2	Immunreaktivität gegen TLR4 im SCO	50
6.2	TLR2- und TLR4-immunreaktive Elemente im Plexus choroideus	54
6.2.1	Immunreaktivität gegen TLR2 im Plexus choroideus	54
6.2.2	Immunreaktivität gegen TLR4 im Plexus choroideus	58
6.3	Verteilung der TLR2- und TLR4-immunreaktiven Elemente im Subfornicalorgan	60
6.3.1	TLR2-Immunreaktivität im SFO	60
6.3.2	TLR4-Immunreaktivität im SFO	62
6.4	Verteilung der TLR2- und TLR4-immunreaktiven Elemente im OVLT	64
6.4.1	TLR2-Immunreaktivität im OVLT	64
6.4.2	TLR4-Immunreaktivität im OVLT	66
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>70</b>
7.1	Das Subcommissuralorgan	72
7.2	Der Reissner'sche Faden	73
7.3	Das OVLT	74
7.4	Das SFO	75
7.5	Der Plexus choroideus	75
7.6	Ausblick	76
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>87</b>

## **1.1 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung zur anatomischen Lage der CVOs der Ratte im Sagittalschnitt	13
Abbildung 2: CSF-Kontaktzellen (Neurone und Gliaabkömmlinge) der CVOs	15
Abbildung 3: Lokalisation des SCO in sagittaler (oben) und coronaler (unten) Ansicht eines Nagetierhirns	16
Abbildung 4: Thrombospondinfamilie und SCO-Spondin im Vergleich	18
Abbildung 5: SCO im Coronalschnitt	20
Abbildung 6: SCO im Horizontalschnitt	20
Abbildung 7: TLRs und ihre Liganden	27
Abbildung 8: TLR2 Signalweg	29
Abbildung 9: TLR4 Signalweg	31
Abbildung 10: Avidin-Biotin-Methoden	42

## **1.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Chemikalien Übersicht	36
Tabelle 2: Gerätschaften Übersicht	39
Tabelle 3: TLR2 Färbung (Serie a)	40
Tabelle 4: TLR4 Färbung (Serie b)	40

### 1.3 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5HT	5-Hydroxytryptamin
ABC	Avidin-Biotin-Komplexmethode
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ak	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	Area postrema
AP-1	Activator Protein-1
aqua dest	Aqua destillata
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
CD14/36	cluster of differentiation 14 bzw. 36
CH	Congenitaler Hydrocephalus
CpG	Cytosin Phosphat Guanin
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CVO	Circumventrikuläres Organ
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMP	danger-associated molecular pattern
DC	dendritische Zelle
DISC	Death inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extracellular signal regulated kinases
g	Gramm
GABA	Gamma Aminobuttersäure
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp	heat shock proteins
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon

IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRF	Interferon regulatory factor
I- $\kappa$ B	Inhibitor of kappa B
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LAB	labelled Avidin-Biotin Methode
LAK	lymphokine activated killer cells
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich-repeats
LSAB	labelled Streptavidin-Biotin-Methode
Lsg.	Lösung
M	Mol
Mal	MyD88 adapter-like
MAP-Kinase	Mitogen activated protein Kinase
MD-2	Myeloid Differentiation Factor-2
ME	Eminentia mediana
mg	Milligramm
min	Minuten
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B	Nuclear Faktor-kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGS	Normal Goat Serum
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NL	Lobus posterior der Hypophyse
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase

OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS-Puffer mit Triton
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIN	Glandula pinealis
PIP	Phosphatidylinositolphosphate
PKB	Proteinkinase B
PRR	Pattern Recognition Receptor
RF	Reisschner'sche Faden
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSV	respiratorisches Syncytial Virus
SARM	Sterile- $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein
SCO	Organum subcommissurale
SFO	Organum subfornicale
TICAM	TIR domain-containing adapter molecule
TIR	Toll/II-1-Rezeptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAM	translocating chain-associating membrane protein
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon- $\beta$
Tris	Tris-aminomethan
TSR	Thrombospondinrepeats
VP	Vasopressin
ZNS	Zentrales Nerven System
ZO-1	Zonula Occludens-1

## 2 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielen als Pathogen-Erkennungsrezeptoren eine wichtige Rolle und vermitteln die angeborene Immunität. Nach Erkennung spezifischer Pathogene lösen sie in der Rezeptor tragenden Zelle eine Entzündungsreaktion aus und es kommt unter anderem zur Aktivierung von Proteinkinasen, des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und zur Sekretion von Zytokinen. Während der TLR4 für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) verantwortlich ist, dient der TLR2 unter anderem als Rezeptor für Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und Lipoproteine von gram-positiven Bakterien. In dieser Dissertation wurde das Vorkommen der TLR2 und TLR4 in den circumventriculären Organen (CVO), speziell im Subcommissuralorgan (SCO), untersucht. Im Hinblick darauf, dass die circumventriculären Organe durch das Fehlen einer Blut-Hirn-Schranke gekennzeichnet sind, ist das Vorkommen einer Abwehr durch das angeborene Immunsystem im Sinne von TLR2 und TLR4 von besonderem Interesse gewesen. Zur Darstellung der Verteilung der beiden Rezeptoren wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten von Wistar-Ratten durchgeführt.

Es konnte ein Vorkommen beider Rezeptor-Typen in den circumventriculären Organen und dem Plexus choroideus nachgewiesen werden. Vor allem zeigt sich ein verstärktes Vorkommen von TLRs an Gefäßen und dem fenestrierten Endothel der circumventriculären Organe sowie den umgebenden perivaskulären Räumen. Das SCO zeigte vor allem dort eine starke Tingierung, wo es in Kontakt zu den Ependymzellen des dritten Ventrikels steht. Die Rezeptoren scheinen auf Eventualitäten an prädisponierten Stellen entwickelt zu sein. Dies ermöglicht eine sofortige Abwehrreaktion auch bei raschem Eindringen von Pathogenen. Es wurden kaum immunreaktive Neurone oder Perikaryen gefunden, was auf eine Auseinandersetzung der Pathogene im zentralen Nervensystem (ZNS) mit den Epithelbarrieren spricht. Die frühzeitige Inhibition der Schadenskaskade durch die TLRs bereits an den Gefäßen der CVOs könnte neuroprotektive Bedeutung haben.

### **3 Summary**

Toll-like receptors (TLRs) play an important role as pathogen recognition receptors and mediate innate immunity. After recognition of specific pathogens, they trigger an inflammatory reaction in the receptor-bearing cell and mediate the activation of protein kinases, the transcription factor NF- $\kappa$ B and the secretion of cytokines. While TLR4 is responsible for the recognition of lipopolysaccharides (LPS), TLR2 serves as a receptor for peptidoglycan, lipoteichoic acid and lipoproteins of gram-positive bacteria. This dissertation investigates the presence of TLR2 and TLR4 in circumventricular organs (CVO), especially in the subcommissural organ (SCO). The fact that the circumventricular organs are characterized by the absence of a blood-brain barrier, the presence of a defense system based on the innate immune system by TLR2 and TLR4 might be particularly necessary for preventing pathogens from entering the central nervous system (CNS). To illustrate the distribution of the two receptors, immunohistochemistry was applied on tissue sections of Wistar rats.

The presence of both receptor types in the circumventricular organs and the choroid plexus was detected. In particular, an increased occurrence of TLRs at blood vessels and the fenestrated endothelium of the circumventricular organs as well as the surrounding perivascular spaces was observed. The SCO displayed a strong staining, especially at its contact to ependymal cells of the third ventricle. The receptors seem to be expressed in order to defend against possible invasions of the CNS by pathogens. Even after rapid penetration, such pathogens can be immediately eliminated. Hardly any immunoreactive neuron or neuronal process could be found, which suggests a defense against pathogens at the epithelial barrier. The early inhibition of the damage cascade by TLRs at the walls of vessels of the CVOs imply an important neuroprotective relevance of TLR2 and TLR4.

## 4 Einleitung

### 4.1 Die circumventriculären Organe

Circumventrikuläre Organe (CVOs) sind spezialisierte Gehirnstrukturen, die in den Wänden der Ventrikel, insbesondere des dritten und vierten Ventrikels, lokalisiert sind <sup>1</sup>. Sie unterscheiden sich strukturell und funktionell vom Rest des Gehirnparenchyms bzw. der Ventrikelepithelien und besitzen einen organähnlichen Charakter bestehend aus neuronalen und/oder glialen Komponenten. Eine Besonderheit der CVOs ist ihre starke Vaskularisierung und das Fehlen einer Blut-Hirn-Schranke (BHS). Die Kapillaren der CVOs sind gefenstert, wodurch sie in ständigem Kontakt mit den im Blutkreislauf zirkulierenden Signalmolekülen stehen <sup>2</sup>. Ihre Randzonen zum umliegenden Hirngewebe oder zum Ventrikelraum sind dagegen abgedichtet <sup>3</sup>.

Insgesamt gibt es bisher sieben beschriebene CVOs bei Mammalia, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können <sup>4</sup>, sowie das Paraventricular Organ bei Non-Mammalia:

Die sekretorischen CVOs:

- Organum subcommissurale (SCO)
- Eminentia mediana (ME)
- Lobus posterior der Hypophyse (NL)
- Glandula pinealis (PIN, Epiphyse)

Die sensorischen CVOs:

- Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)
- Organum subfornicale (SFO)
- Area postrema (AP)

Neben diesen Regionen gilt der choroidale Plexus, der in den meisten ventrikulären Systemen vorhanden ist und Liquor produziert als CVO, da er gefensterte Kapillaren besitzt, aber keine Neurone.

Die offene Blut-Hirn-Schranke (BHS), basierend auf fenestrierten Gefäßen, relativ großen perivaskulären Räumen und fehlender astroglialer Barriere, ist der Grund, warum CVOs als "brain windows" bezeichnet werden <sup>5</sup>. Die BHS trennt effektiv das zentrale Nervensystem vom Blutmilieu, indem sie Neurotransmitter, Neuromodulatoren, Neuropeptide und Wachstumsfaktoren im Hirn-/Rückenmarksmilieu einschließt und Krankheitserreger, aber auch periphere Botenstoffe wie die meisten endokrinen

Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren und dergleichen, vom Eindringen in das ZNS ausschließt. So wird das Gehirn vor bioaktiven und toxischen Stoffen aus dem Blut geschützt. Dennoch ist eine Kommunikation zwischen Peripherie und dem ZNS enorm wichtig, um physiologische Körperfunktionen zu regulieren; die CVOs spielen gerade im Hinblick auf die nicht-neuronale Kommunikation eine entscheidende Rolle <sup>4</sup>.

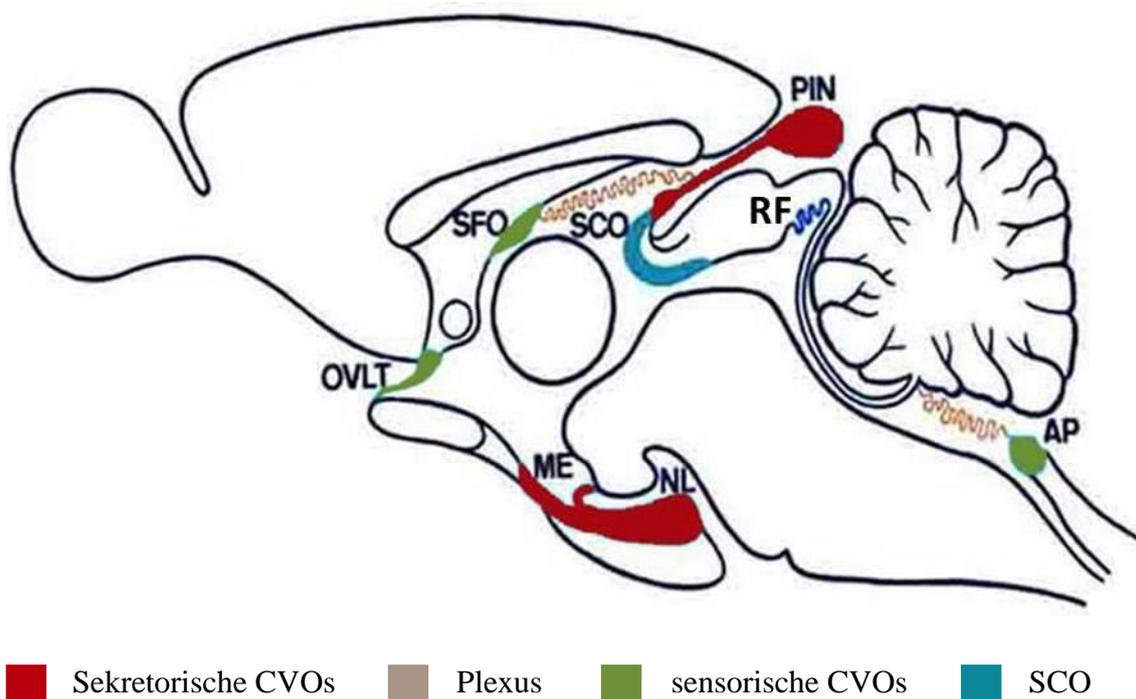


Abbildung 1: Schematische Darstellung zur anatomischen Lage der CVOs der Ratte im Sagittalschnitt

*Organum subfornicale (SFO), Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), Area postrema (AP), Eminentia mediana (ME), Glandula pinealis (PIN), Lobus posterior der Hypophyse (NL), Plexus choroidei, Organum subcommissurale (SCO) mit dem Reissner'schen Faden (RF) [modifiziert nach <sup>6</sup>]*

Eine Besonderheit der sensorischen CVOs sind intrinsische, osmoregulatorische Neurone, um wichtige Bestandteile von Körperflüssigkeiten zu überwachen. Es konnte gezeigt werden, dass sie zirkulierende Konzentrationen von Angiotensin II, Vasopressin (VP), atrialem natriuretischen Peptid (ANP), Endothelin, Kalzium und Natrium, ebenso wie die Osmolarität wahrnehmen können. Über efferente Projektionen zu autonomen Kontrollzentren des Hypothalamus und des Hirnstamms können so resultierende Signale

weitergegeben werden <sup>2</sup> . Die sensorischen CVOs steuern maßgeblich homöostatische Prozesse wie die Kontrolle des Salz- und Wasserhaushalts und den Energiestoffwechsel. Aber auch kardiovaskuläre Funktionen durch Einflussnahme auf das Herzzeitvolumen und den Gefäßtonus werden von den sensorischen CVOs kontrolliert und gesteuert <sup>4</sup>. Zahlreiche umfassende Übersichtsarbeiten, die sich speziell mit der Rolle der sensorischen CVOs bei der Kontrolle des Flüssigkeitshaushaltes befassen, wurden bereits veröffentlicht <sup>7 8 9 10 11 12 13</sup> .

Im Gegensatz dazu spielen die sekretorischen CVOs eine wichtige Rolle bei der Abgabe vieler der im Hypothalamus und Anderorts (Corpus pineale) produzierten Neurohormone, die ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes im Körper, des Nährstoffhaushalts und der Fortpflanzung spielen.

So schüttet der Lobus posterior der Hypophyse unter Einbindung des Subfornicalorgans Adiuretin (ADH, Vasopressin) in den Blutkreislauf aus <sup>14 15 16</sup>. Die physiologisch wichtigste Funktion von ADH ist die Rückgewinnung von Wasser aus dem Primärharn, wodurch der Harn an Volumen abnimmt und der Organismus an Volumen einspart <sup>17</sup>. Auf die sekretorische Rolle des SCO soll im Folgenden Kapitel eingegangen werden.

Die CVOs besitzen an ihrer Oberfläche Ependymozyten, die über *tight junctions* verbunden sind. Oft finden sich in CVOs auch Tanyzyten, die mit ihren zahlreichen Fortsätzen Kontakt zwischen der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), den CVOs und dem Subarachnoidalraum herstellen.

CVOs weisen eine hohe Vielfalt an Zelltypen auf. So gehören dazu unter anderem CSF-kontaktierende Neurone, die hinsichtlich ihrer zellulären Morphologie sehr variabel sind.

### Beeinflussende Faktoren

Peptide, Neurotransmitter, Proteine, CSF-Strömung,  
Ionen, Photonen

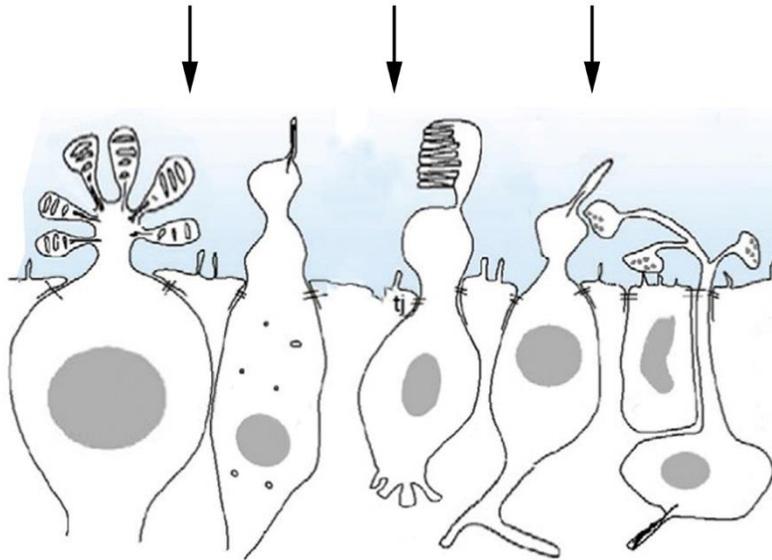


Abbildung 2: CSF-Kontaktzellen (Neurone und Gliaabkömmlinge) der CVOs  
[modifiziert nach <sup>18</sup>]

Im Gegensatz zu anderen Neuronen der CVOs sind die CSF-Kontaktneurone nicht vom Liquor isoliert und reagieren sehr empfindlich auf dessen Zusammensetzung, wie durch elektrophysiologische Experimente gezeigt werden konnte <sup>7</sup>.

Sie spielen eine besondere Rolle bei der Aufnahme, Umwandlung und Aussendung von nichtsynaptischen Signalen, die vom inneren und äußeren Liquor und der interzellulären Flüssigkeit des Gehirns vermittelt werden. Sie befinden sich in verschiedenen Abständen zum ventrikulären Lumen (ependymale, hypendymale, proximale oder distale Neurone), bleiben aber mit dem Liquor verbunden.

## 4.2 Das Subcommissuralorgan (SCO)

Das Subcommissuralorgan ist ein kleines sekretorisches Organ, das sich in der dorsalen Wand des dritten Ventrikels im Bereich der hinteren Kommissur befindet und am Eingang zum und - artspezifisch unterschiedlich - auch bis weit hinein in den sylvischen Aquädukt (*Aquaeductus mesencephali*) lokalisiert ist. Es erstreckt sich vom tiefen Ende der Epiphyse bzw. des Epiphysenstiels bis in das Anfangsviertel des *Aquaeductus mesencephali*<sup>19</sup>. Das SCO ist prinzipiell eine besondere Abwandlung des Ependyms und eine sehr alte Struktur des Wirbeltiergehirns<sup>19 20</sup>. Selbst bei Chordaten, den Tunicaten, lassen sich Vorläufer nachweisen<sup>21</sup>. Es ist bei Affen und jungen Menschenaffen gut entwickelt. Beim Menschen und Menschenaffen erreicht das SCO die volle Entwicklung während des fetalen Lebens und bildet sich nach der Geburt zurück<sup>22</sup>. Das SCO entwickelt sich sehr früh in der Ontogenese und stellt eine der ersten sekretorischen Hirnstrukturen dar, die während der Ontogenese aufgefunden werden können<sup>23</sup>.

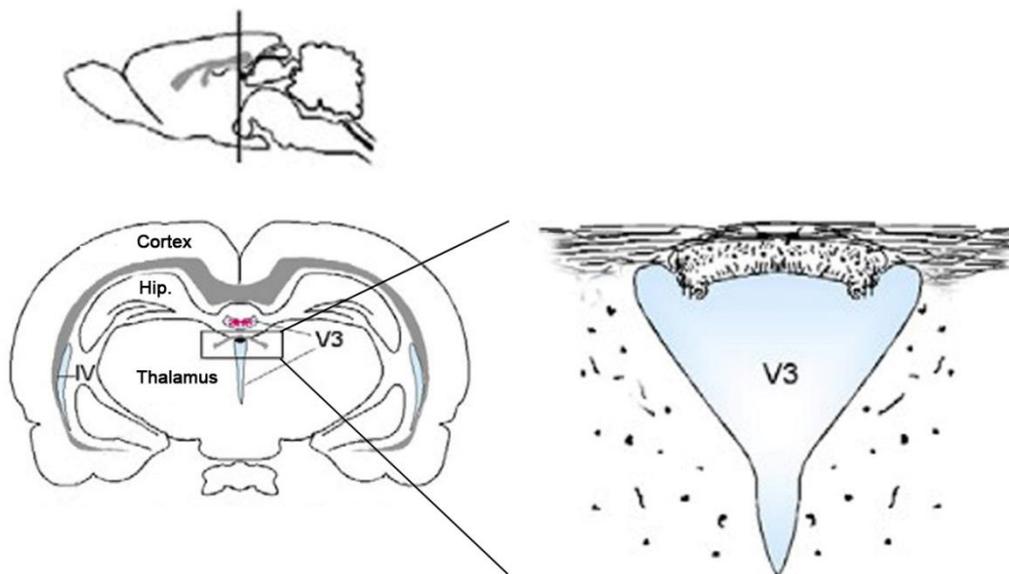


Abbildung 3: Lokalisation des SCO in sagittaler (oben) und coronaler (unten) Ansicht eines Nagetierhirns  
[modifiziert nach<sup>18</sup>]

Es hat im Vergleich zu den anderen CVOs keine gefensterten Kapillaren und die BHS ist geschlossen und damit voll funktionsfähig. Dennoch besitzt es eine bedeutende sekretorische Rolle <sup>4 24 25</sup>.

Die Vaskularisierung des SCO unterscheidet sich zwischen verschiedenen Spezies: bei der Katze, aber auch beim Dachs und dem Schwein besteht eine dichte Vaskularisation, bei der Ratte ist sie sehr begrenzt, beim Affen und beim Menschen fehlt sie sogar gänzlich <sup>24</sup>.

Das SCO hat eine drüsenähnliche Struktur und besteht aus ependymalen und hypendymalen Zellen, die auf die Sekretion von Glycoproteinen spezialisiert sind <sup>26</sup>.

Das Hypendym setzt sich aus Gliazellen, Neuronenfortsätzen in einem dichten Neuropil und vaskulären Elementen zusammen. Die hypendymalen Zellen sezernieren in die lokalen Blutgefäße und stehen bei einigen Spezies sogar mit dem Subarachnoidalraum in Verbindung.

Die großen hochprismatischen ependymalen Zellen stehen apikal mit der Cerebrospinalflüssigkeit in Kontakt. Sie sezernieren ihr Sekret in den Liquor cerebrospinalis <sup>27</sup>. Diese Zellen sind über *tight junctions* verbunden, wobei im SCO drei *tight junction* Proteine eine besondere Rolle spielen, nämlich ZO-1, Occludin und Claudin 1. Diese Proteine spielen eine wichtige funktionelle Rolle als CSF-Diffusionsbarriere. Im Gegensatz zu den ependymalen Zellen anderer CVOs weisen die ependymalen Zellen im SCO zahlreiche Cilien auf, die die Ventrikelwand bedecken und in das ventrikuläre Lumen hineinragen <sup>28</sup>. Die Funktion des SCO ist noch immer unklar, aber die Synthesewege und die ausgeprägte sekretorische Aktivität des Organs ist sehr gut bekannt.

Das Sekret, das in den Liquor cerebrospinalis ausgeschieden wird, ist ein Glykoprotein hoher molekularer Masse, das SCO-Spondin <sup>29</sup>, dessen Kondensation den Reissner'schen Faden (RF) bildet. Die Spondine bilden eine Proteinfamilie, die als Thrombospondin bekannt ist. Gemeinsames Strukturmerkmal sind die Thrombospondinrepeats (TSR), die leicht chemische Verbindungen mit anderen Molekülen eingehen können. Der RF erstreckt sich entlang des *Aquaeductus mesencephali*, des vierten Ventrikels, durch den Zentralkanal des Rückenmarks bis hin in die Ampulla caudalis, wo er sich auflöst und resorbiert wird <sup>29 30 31</sup>.

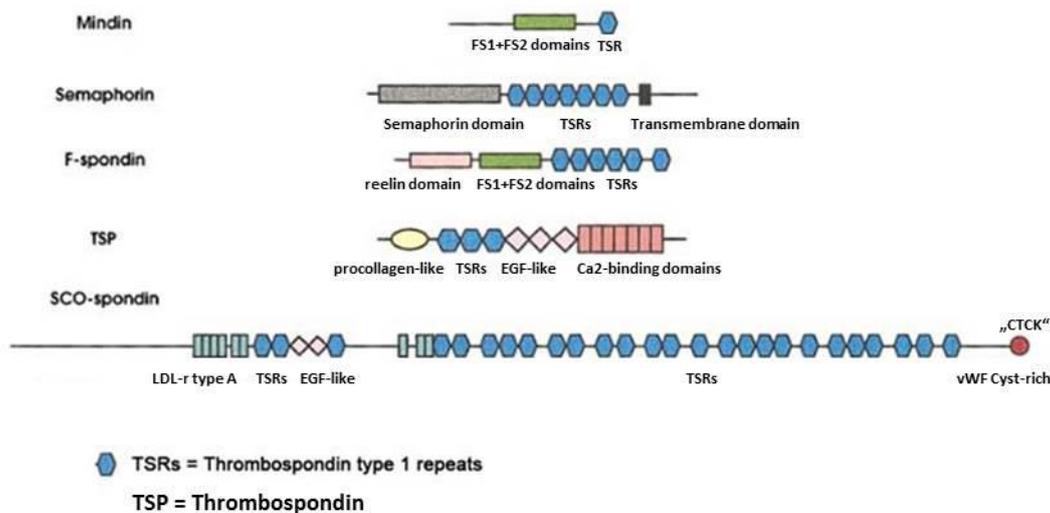


Abbildung 4: Thrombospondinfamilie und SCO-Spondin im Vergleich

Dies ist eine schematische Darstellung von Proteinen mit Thrombospondin Typ I Repeats (TSRs) [modifiziert nach <sup>32</sup>]

Es wird angenommen, dass der RF den Fluss der Liquorflüssigkeit im Ventrikelsystem, speziell in der Enge des *Aquaeductus mesencephali*, erleichtert <sup>24 33</sup>. Der *Aquaeductus mesencephali* ist ein Anteil des Ventrikelsystems, der die Engstelle zwischen dem dritten und vierten Ventrikel beschreibt. Diese Engstelle ist eine Prädilektionsstelle für Aquäduktstenosen. Bei einer Fehlfunktion, insbesondere bei einer Agenesie des SCO, bei der kein RF gebildet wird, kann es zu einer Erkrankung kommen, die als *Congenitaler Hydrocephalus* (CH) bezeichnet wird. Experimentell hervorgerufenes Fehlen des RF (durch intraventrikuläre Gabe von RF-Antikörpern) führt zu einem CH. Zu einem CH kommt es durch eine große und abnorme Ansammlung von CSF in den Ventrikeln des Vorderhirns; in der Regel wird dieses Krankheitsbild durch genetische Mutationen verursacht <sup>33</sup>.

Andere Hypothesen messen dem Sekret eine Differenzierungsfunktion zu. Während der Embryogenese exprimieren die Vorläuferzellen des SCO im dorsalen Neuroektoderm spezifische Komponenten, einschließlich dem SCO-Spondin, schon früh vor der Bildung der hinteren Kommissur. Das Forscherteam von Gobron et al. (2000) <sup>32</sup> hat mit Versuchen von SCO-Spondin an einer Neuroblastom-Zelllinie (B 104) das Neuritenauswachsen beobachtet. So deuten diese funktionellen Tests und die molekularen Daten darauf hin,

dass SCO-Spondin eine potentielle Rolle bei der Entwicklung von Kommissurbahnen spielt. Diese Wirkung beruht auf der Förderung des axonalen Wachstums und des „Pathfinding“.

Im SCO sind neuronale Innervationsmuster festgestellt worden, insbesondere peptiderger, GABAerger, katecholaminerger und serotoninerger Natur. Die serotoninerge Innervation ist bei Säugetieren am häufigsten zu beobachten (75% aller synaptischen Kontakte <sup>34</sup>) und spielt gerade im Hinblick auf sekretorische Aktivität des SCO eine entscheidende Rolle. Die Zellkörper der serotoninergen Neurone befinden sich hauptsächlich in den Raphe-Kernen des Hirnstamms <sup>35</sup>. In Versuchsreihen des Forscherteams Møllgard und Wiklund (1979) <sup>27</sup> führte die Degeneration der serotoninergen (5HT) Synapsen zu einer lang anhaltenden, ausgeprägten Zunahme der sekretorischen Aktivität des SCO. Sie schreiben daher der serotoninergen Innervation eine hemmende Wirkung auf die sekretorischen Zellen des SCO zu.

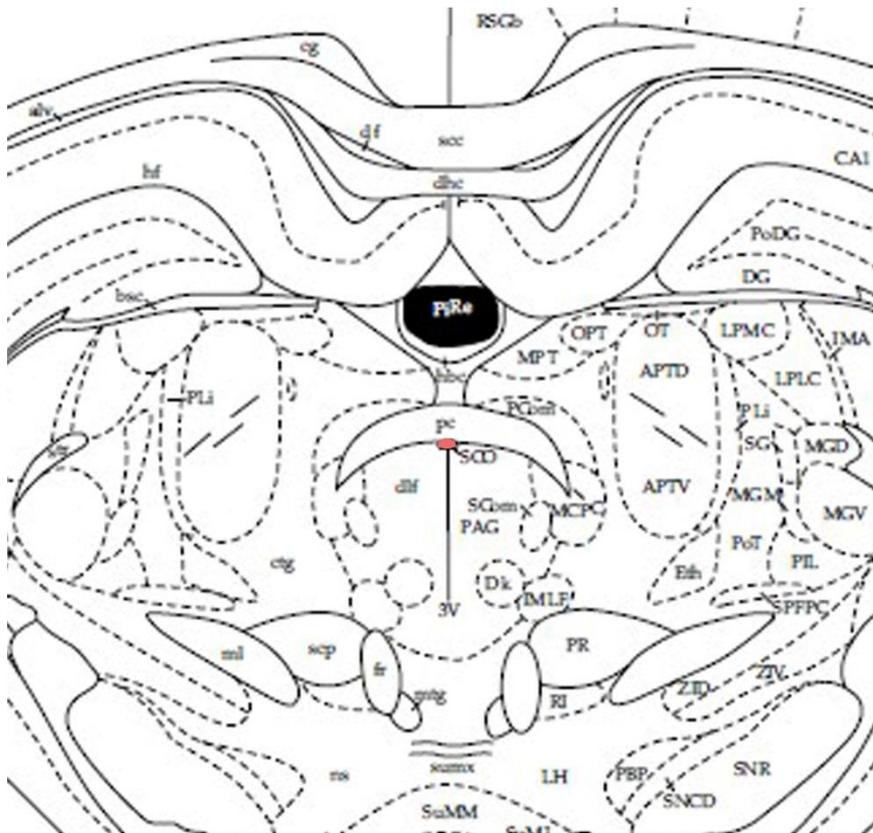


Abbildung 5: SCo im Coronschnitt

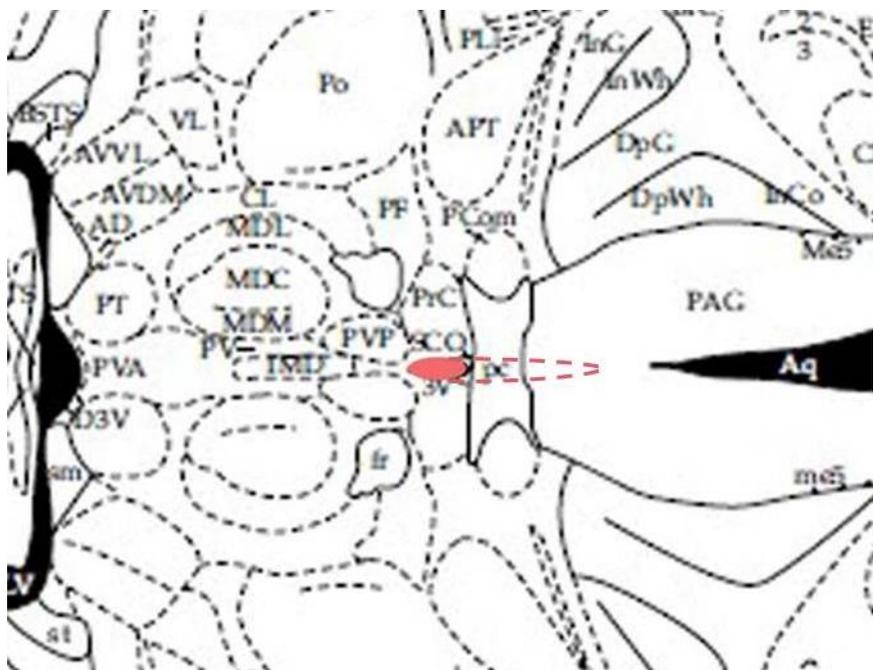


Abbildung 6: SCo im Horizontalschnitt

## 4.3 Das humane Immunsystem

### 4.3.1 Das Immunsystem - Ein kurzer Überblick

Das Abwehrsystem höherer Vertebraten bezeichnet man als Immunsystem.

Eine zentrale Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor Infektionen durch Pathogene wie Viren, Bakterien, Parasiten und Pilze zu schützen und toxische Substanzen zu eliminieren. Dazu haben sich im Laufe der Evolution zwei Abwehrsysteme entwickelt, die eng miteinander verknüpft sind und miteinander kooperieren: das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Mit Hilfe dieser beiden Systeme kann der Körper Pathogene als Fremdstoffe erkennen, darauf reagieren und die Immunantwort einleiten<sup>36</sup>.

Diese beiden Immunsystemkomponenten sollen im Folgenden vorgestellt werden.

### 4.3.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immun- bzw. Abwehrsystem ist phylogenetisch sehr alt und vermutlich in allen mehrzelligen Tierarten und auch in Pflanzen vorhanden<sup>31 37</sup>.

Es ist bei Säugetieren von Geburt an vorhanden und besitzt ein fixes Wirkungsspektrum; es ist nicht in der Lage, sich an variierende Schadwirkstoffe anzupassen und wird daher auch als angeborenes Immunsystem bezeichnet. Über eine limitierte Anzahl von Rezeptoren kann es Pathogene erkennen und eliminieren<sup>36</sup>.

Die erste Verteidigungslinie wird durch die äußere, epitheliale Barriere gebildet. So verhindern bereits Haut und Schleimhäute des Respirations-, Urogenital- oder Gastrointestinaltrakts das Eindringen von Pathogenen. Auch abgesonderte Drüsensekrete, wie zum Beispiel Speichel, Schweiß und Nasensekret enthalten das antibakterielle Enzym Lysozym, welches Bakterienzellwände abbauen kann<sup>38</sup>. Im Darmrohr werden Defensine sezerniert, die Lysozym ähnliche Wirkung aufweisen. Auf der Haut spielen ebenfalls nichtpathogene Bakterien eine wichtige Rolle, die antimikrobielle Substanzen produzieren und mit Pathogenen um Raum und Nährstoffe konkurrieren.

Sofern Pathogene die erste Barriere überwinden, reagiert das angeborene Immunsystem binnen weniger Minuten bis Stunden auf ein Eindringen in den Organismus. Dieser zweite Teil des angeborenen Immunsystems wird im Wesentlichen durch Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten vermittelt<sup>39</sup>. Dieses ermöglicht schnelle Effektor-Mechanismen wie die Phagozytose, Opsonierung von Bakterien, proteolytische Kaskaden durch die Aktivierung des Komplementsystems und

die Synthese von potenten antimikrobiellen Peptiden und proinflammatorischen Mediatoren wie dem Zytokin TNF- $\alpha$  <sup>31</sup>.

Diese Mechanismen können meist die Entstehung von Infektionsherden verhindern.

Im Gegensatz zur Antigen-spezifität der Effektorzellen des erworbenen Immunsystems fokussiert sich das angeborene Immunsystem auf die Erkennung von molekularen Mustern, die größeren Gruppen von Pathogenen gemeinsam sind <sup>40 41</sup>. Das angeborene Immunsystem erkennt darüber hinaus nicht nur molekulare Muster von Pathogenen (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), sondern zum Beispiel auch danger-associated molecular patterns (DAMPs) oder Zell-assoziierte Stressmarker (durch NK-Zellen).

Eine angeborene Immunreaktion erfordert keine vorausgegangene Exposition gegenüber den Antigenen, allerdings zeigt das angeborene Immunsystem auch keine Adaptation an spezifische Pathogene.

#### 4.3.3 *Das erworbene Immunsystem*

Das erworbene (adaptive) Immunsystem entstand vor ca. 450 Millionen Jahren, ist phylogenetisch also jünger als das angeborene Immunsystem und kommt bei allen Vertebraten vor <sup>37</sup>.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem vermitteln hier Lymphozyten eine Immunantwort, die in B- und T-Lymphozyten unterteilt werden. Die B-Lymphozyten wurden erstmals in der *Bursa fabricii* von Vögeln entdeckt und reifen im Knochenmark (bone marrow). Die T-Lymphozyten reifen im Thymus.

Diese Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren, die durch somatische Rekombination in extremer Vielfalt entstanden sind <sup>39</sup>. Dieses Gen-Rearrangement erlaubt die Entstehung einer fast unbegrenzten Anzahl von unterschiedlichen Antigenrezeptoren <sup>40</sup>. Jeder B- und T-Lymphozyten besitzt einen unterschiedlichen, hochspezifischen Antikörper- oder Erkennungsrezeptor. Bei einem Kontakt von Antigen mit seinem spezifischen Erkennungsrezeptor kommt es zu einer Kaskade biochemischer Prozesse, die im Zusammenspiel von B- und T-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen zur Ausbildung von Plasmazellen und T-Killerzellen führen. Zudem bilden sich Gedächtniszellen, sodass eine erneute Infektion mit dem gleichen Erreger schnell erkannt und eliminiert werden kann.

Da es in der Regel mehrere Tage dauert, bis das adaptive Immunsystem die Pathogenbekämpfung übernimmt, stellt das angeborene Immunsystem eine unabdingbare erste Verteidigungslinie dar.

Die folgende Arbeit befasst sich primär mit der angeborenen Immunität, so dass im Weiteren nicht näher auf das adaptive Immunsystem eingegangen wird.

#### **4.4 Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem**

Pathogene Substanzen, Parasiten und Mikroorganismen tragen auf ihrer Oberfläche molekulare Muster, die sich in Intervallen wiederholen. Aber auch die Nukleinsäuren von Bakterien und Viren weisen derartige repetitive molekulare Muster auf <sup>36</sup>. Die Erkennung dieser pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) erfolgt über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems <sup>42 43</sup>. Die Rezeptoren, die diese molekularen Muster erkennen, werden daher als Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRR) bezeichnet <sup>44</sup>.

PAMPs sind hoch konservierte, also sehr beständige, molekulare Strukturen, die folgende drei essentielle Bedingungen erfüllen:

Zum einen werden sie nur im Organismus des Pathogens produziert und nicht vom Wirtsorganismus, wodurch es dem Immunsystem in der Peripherie oder in inneren Organen, ja selbst direkt durch Zellen der CVOs im Gehirn ermöglicht wird, schnell zwischen Fremd und Eigen zu unterscheiden <sup>45 46 47 48</sup>. Dadurch, dass die PRRs keine Affinität zu Selbstantigenen haben, wird eine Autoaggression mit schweren Gewebs- und Zellschäden vermieden.

Zum anderen sind PAMPs innerhalb einer Klasse von Pathogenen beständig. Damit erhält das Immunsystem nicht nur die Information über eine Infektion, sondern auch über den Typ des Pathogens.

Des Weiteren kann es sich bei hoch konservierten und invariablen Mustern nur um solche handeln, die für das Überleben von Mikroorganismen essentiell sind <sup>41</sup>. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung, der Strukturbildung, dem Erhalt der Homöostase und anderen Stoffwechselfvorgängen.

Die bekanntesten Musterstrukturen sind (1.) Lipopolysaccharide (LPS), sie sind wichtiger und sehr häufig vorkommender Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien und ein starkes Endotoxin <sup>41</sup>, (2.) Lipoteichonsäure auf gram-positiven Bakterien, sowie

(3.) Peptidoglykane, welche in allen Zellwand-tragenden Bakterien vorkommen <sup>49</sup>. Auch (4.) das Genom von Viren, wie DNA, doppelsträngige RNA (dsRNA) und einzelsträngige RNA (ssRNA)<sup>50</sup>, aber auch bakterielle CpG-DNA sind PAMPs und werden von den Mustererkennungsrezeptoren detektiert <sup>41</sup>.

Werden PAMPs von PRRs erkannt, kommt es zu inflammatorischen Antworten, einhergehend unter anderem mit der Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Des Weiteren wird über Antigenpräsentation, Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen die adaptive Immunität initiiert.<sup>36</sup>

Zu den PRRs gehören – neben einer Reihe anderer Moleküle – die Toll-like Rezeptoren, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

#### **4.5 Toll-like Rezeptoren (TLR)**

1984 wurde das Toll-Protein erstmals von einer Forschungsgruppe in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und beschrieben. Dem Protein wurde primär eine Bedeutung für die dorsoventrale Polarisierung des Embryos zugeschrieben <sup>51</sup>. Erst einige Jahre später konnte bei der adulten Taufliege *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass das Toll-Protein eine wichtige Rolle bei der Immunantwort während einer Pilzinfektion spielt. So werden bei einer Aktivierung durch gram-positive Bakterien oder Pilze, antimikrobielle Peptide produziert und die Zellimmunität aktiviert <sup>52 53</sup>. Nachdem in *Drosophila melanogaster* die Beteiligung an der Zellimmunität nachgewiesen wurde, suchte man nach Toll-Homologen in Säugetieren und entdeckte die sogenannten Toll-like-Rezeptoren <sup>43</sup>.

Mittlerweile konnten 13 Toll-Homologe in Säugetieren identifiziert werden <sup>54 55</sup>. TLR 1-9 wurde sowohl im Menschen als auch in der Maus konserviert, während TLR 10 in der Maus aufgrund einer Retrovirus-Insertion nicht funktionsfähig ist und nur im Menschen aktiv ist. Die TLR11, TLR12 und TLR13 sind aus dem menschlichen Genom verschwunden und nur in der Maus vorhanden <sup>43 56 57 58 59 60</sup>.

Strukturell sind Toll-like Rezeptoren Typ-I Transmembranrezeptoren, bestehend aus drei Domänen. Die extrazelluläre, aminoterminal Domäne mit leucinreichen Wiederholungen (LRR) ist für die Erkennung von PAMPs verantwortlich.

Einer kurzen Transmembrandomäne schließt sich die intrazellulär hochkonservierte, carboxyterminale TIR-Domäne, nämlich die Toll/IL-1 Rezeptor Domäne an, die den intrazellulären Signalweg initiiert<sup>55 57 61</sup>.

Diese Zytoplasmadomäne ist homolog zum Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R), weshalb die TLR zur *IL-1 Rezeptor/ Toll-like Rezeptor-Superfamilie* gehören<sup>62</sup>.

Der IL-1R induziert Signalwege, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie führen<sup>63</sup>. Mitglieder dieser Rezeptorfamilie spielen eine Schlüsselrolle in der Induktion von Immun- und Entzündungsreaktionen bei Säugetieren<sup>64</sup>.

Über die charakteristische TIR-Domäne erfolgt auch die Interaktion mit zytosolischen Adapterproteinen und ermöglicht die Interaktion zwischen homo- und heterodimerisierten TLR-Untereinheiten.

Folgende Adapterproteine wurden bisher beschrieben: Der MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TRIF/TICAM1 (TIR- related adaptor protein inducing Interferon- $\beta$ ), Mal/TIRAP (TIR domain containing adaptor protein), TRAM/TICAM2 (TRIF related adaptor molecule) und der negative Regulator SARM (Sterile- $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein). MyD88 rekrutieren alle TLRs, bis auf TLR3, der TRIF als Adaptermolekül nutzt<sup>40 62 65 66</sup>.

TLR2 und TLR4 generieren den MyD88-abhängigen Weg zusätzlich über TIRAP, welcher die Signaltransduktion zwischen TLR und MyD88 mediiert<sup>67</sup>.

Die Rekrutierung von MyD88 führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren, besonders dem NF- $\kappa$ B, sowie AP-1 und IRF3<sup>66</sup>.

NF- $\kappa$ B besteht aus mehreren Untereinheiten und liegt im Ruhezustand als Komplex mit seinem Inhibitor I- $\kappa$ B im Zytoplasma gebunden vor. Durch die Aktivierung der Kinasen wird unter anderem die Phosphorylierung des Inhibitors I- $\kappa$ B katalysiert, wodurch NF- $\kappa$ B aus der Bindung befreit wird und in den Zellkern translozieren kann. Dort kann der Faktor nun viele verschiedene Gene aktivieren, unter anderem führt er zur Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, antimikrobieller Peptide und antiapoptotischer Proteine.

NF- $\kappa$ B und AP-1 führen zur Aktivierung von immunologisch aktiven Zytokinen, wie dem TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 oder IL-12, dem T-Zell costimulatorischen Protein B7.1, GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), MIP-1 $\beta$  und MIP-2<sup>68</sup>. IL-1 wird als Cofaktor für die T-Zell-Aktivierung angesehen und triggert die IL-2 Produktion. IL-6 spielt eine wichtige Rolle bei der B-Zell-Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen, und IL-12 fördert unter anderem die Proliferation mononukleärer Zellen im

peripheren Blut und die Generation von LAK-Zellen (lymphokine activated killer cells). TNF- $\alpha$  fördert die Phagozytose und die Proliferation der T-Zellen <sup>69</sup>.

TNF- $\alpha$  hat viele Wirkungen, die von Entzündungsreaktionen, über Nekrosen, septischem Schock bis zur Apoptose reichen. So erhöht es entzündungsfördernde Moleküle, wie IL-1, IL-6, IL-8 und NF- $\kappa$ B (positiver Feedback-Mechanismus).

Bindet TNF- $\alpha$  an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1, so wird der Death inducing signaling complex (DISC) aktiviert, der eine Reihe von Caspasen aktiviert, welche zur Apoptose der Zielzelle führt <sup>70</sup>.

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist ein zeitlich limitierter Prozess, da NF- $\kappa$ B seinen eigenen Inhibitor I- $\kappa$ B transkribiert, und sich im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus selbst inaktiviert <sup>71</sup>.

Obwohl es einige wenige Ausnahmen gibt, in denen NF- $\kappa$ B zum Zelltod beiträgt, fördert die Expression der NF- $\kappa$ B Zielgene in den meisten Fällen das zelluläre Überleben <sup>72</sup>. Bezogen auf die Zellen der circumventriculären Organe sind beide NF- $\kappa$ B Wirkungsweisen prinzipiell denkbar. Da diese Zellen regenerationsfähig sind, würde der apoptotische Verlust durch Neubildung ausgeglichen werden können (dieser Weg ist für virale Entzündungen sehr gut denkbar). Die Expression von besonderen Transkriptionsfaktoren, die für die Synthese von spezifischen Abwehrfaktoren verantwortlich sind, ist gut für bakterielle Erreger geeignet.

Jeder TLR rekrutiert eine spezifische Kombination von Adaptern, um verschiedene Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, was zu angemessenen und effektiven Reaktionen auf unterschiedliche Typen von Krankheitserregern führt.

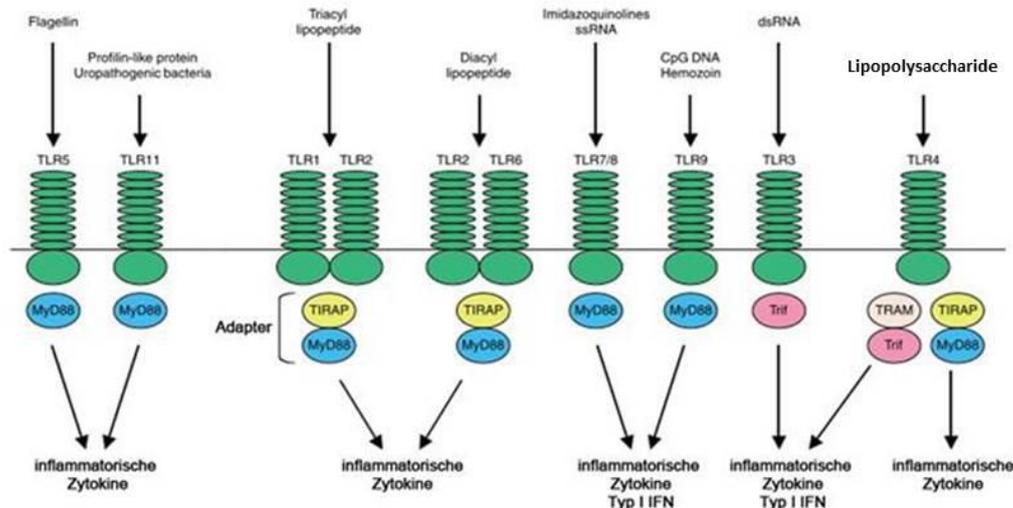


Abbildung 7: TLRs und ihre Liganden

*TLR2 ist essentiell für die Erkennung von mikrobiellen Lipopeptiden und kooperiert mit TLR1 und TLR6, um zwischen diacylierten und triacylierten Lipopeptiden zu unterscheiden. TLR 3 erkennt virale dsRNA. TLR4 ist der Rezeptor für bakterielles LPS. TLR9 ist ein Sensor für CpG-DNA von Bakterien und Viren. TLR7/8 vermittelt die Erkennung von Imidazochinolin und ssRNA. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin und Maus TLR11 erkennt Komponenten uropathogener Bakterien und profilinähnliche Moleküle des Protozoenparasiten *Toxoplasma gondii* [modifiziert nach <sup>73</sup>]*

TLRs sind membranständige Rezeptoren, die auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, in zellulären Organellen, sowie auf epithelialen Zellen im Darm exprimiert sind <sup>74</sup>. Jeder TLR hat seine spezifischen Liganden, die das Expressionsmuster der Rezeptoren zu bestimmen scheinen.

Entsprechend ihrer zellulären Verteilung lassen sich die TLRs in zwei Gruppen einteilen. So kommen die TLR 1, -2, -4, -5, -6 und -11 auf der Zelloberflächenmembran von Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs), natürlichen Killerzellen, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten, sowie B- und T-Zellen vor. Sie erkennen hauptsächlich mikrobielle Murein-Sacculus-Bestandteile wie Lipide, Lipoproteine und Proteine und ermöglichen so die Bekämpfung extrazellulärer Erreger <sup>41</sup>.

Die TLR3, -7, -8 und -9 werden in den intrazellulären endosomalen Kompartimenten, wie dem endoplasmatischen Retikulum, Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen, exprimiert <sup>56</sup>. Sie sind für die Abwehr intrazellulärer Erreger zuständig und erkennen bakterielle oder virale Nukleinsäuren <sup>75</sup>.

Diese differenzierte Expression von TLRs ist allerdings nicht statisch, sondern wird durch Umweltfaktoren wie Pathogene oder Zytokine beeinflusst <sup>41</sup>.

## 4.6 TLR 2

TLR2 erkennt von allen TLRs die größte Vielfalt an Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen. So dient es als Sensor für z.B. bakterielles Peptidoglykan und Lipoteichonsäure von gram-positiven Bakterien, Lipoproteine und Lipopeptide aus verschiedenen pathogenen Mikroorganismen, wie Mykoplasmen und Spirochäten, sowie Lipoarabinomannan aus Mykobakterien und Zymosan von *Candida*-Hefen<sup>76 77 78 79 80 81</sup>. Außerdem erkennt TLR2 atypische Formen von LPS, die z.B. von *Leptospira interrogans* gebildet werden<sup>82</sup>.

Dieses Ligandenspektrum lässt sich zum Teil über die Bildung von Heterodimeren zwischen TLR1/TLR2 sowie TLR2/TLR6 erklären. TLR1 erkennt gemeinsam mit TLR2 triacylierte Lipopeptide. Diese finden sich als Bestandteil des Mureinsacculus in verschiedenen Bakterien, so z.B. *Borrelia burgdorferi*<sup>78</sup>. Das TLR1/TLR6-Heterodimer erkennt diacylierte Lipopeptide von gram-positiven Bakterien und Mykoplasmen. Eine Dimerisierung dieser Rezeptoren ermöglicht die Unterscheidung zwischen den molekularen Strukturen von Lipoproteinen und Lipopeptiden<sup>82 83 84</sup>. Zudem assoziiert TLR2 mit anderen Rezeptoren, wie dem Dectin-1; dadurch werden  $\beta$ -Glucane in der Zellwand von Pilzen erkannt<sup>85</sup>. TLR2 ist schließlich auch mit dem Scavenger Receptor CD36 assoziiert, der vornehmlich intracorporale Abbauprodukte erkennt<sup>86</sup>.

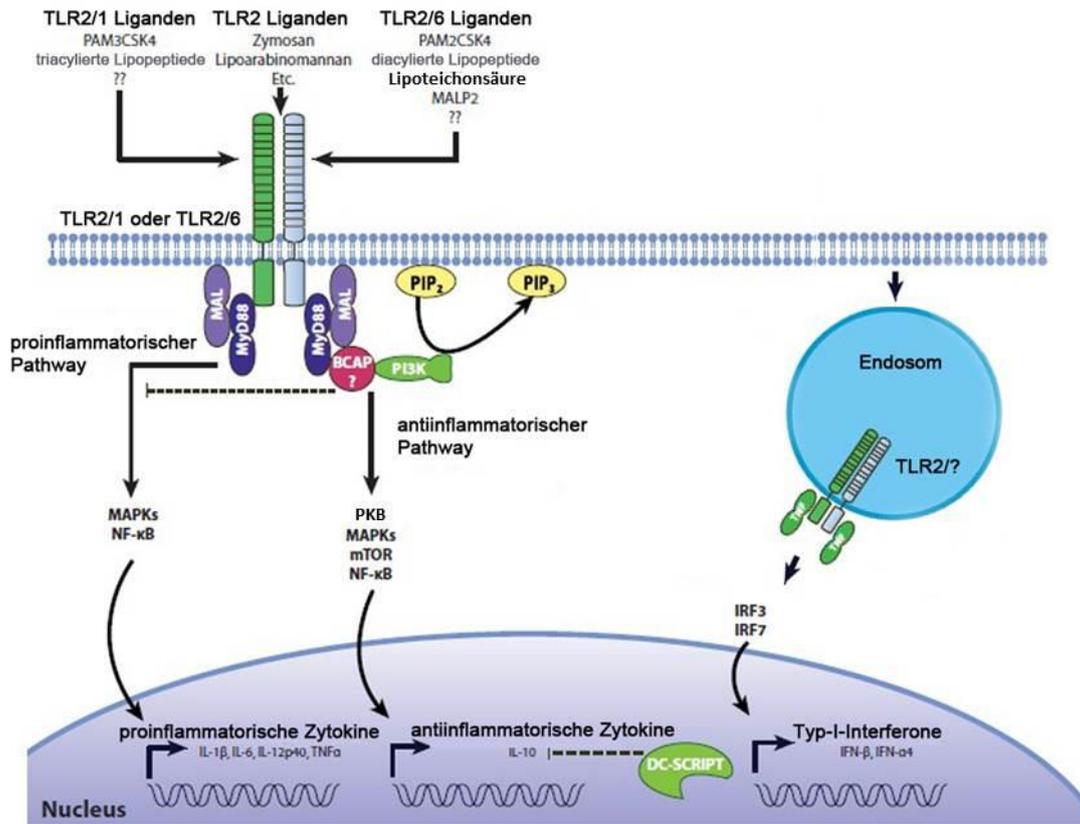


Abbildung 8: TLR2 Signalweg

Der pro-inflammatorische Signalweg durch TLR2 beinhaltet die Rekrutierung der Adapter MyD88 und Mal/TIRAP, um entzündliche Zytokine durch ERK, JNK und NF-κB zu induzieren. BCAP interagiert mit MyD88 und MAL, um PI3K zu rekrutieren, dass dann PKB phosphoryliert und die Sekretion von entzündungshemmendem IL-10 induziert. TLR2-Aktivierung kann auch Typ-I-Interferone durch IRF3 und IRF7 aus endosomalen Kompartimenten induzieren. [modifiziert nach <sup>87</sup>]

## 4.7 TLR 4

Der TLR 4 ist der zuerst entdeckte (von Medzhitov et al., 1997) <sup>43</sup> und am besten charakterisierte Rezeptor seiner Familie. TLR 4 wurde als Signalrezeptor für das endotoxisch aktive Lipopolysaccharid nachgewiesen, einem integralen Bestandteil der äußeren Membranwand gramnegativer Bakterien <sup>88 89 90 91</sup>.

Ist LPS im Serum vorhanden, wird es durch das Akut-Phase Protein, dem Lipopolysaccharid bindenden Protein (LBP) gebunden und so von CD14 erkannt <sup>69</sup>. CD14 ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein, das vor allem auf Makrophagen und Monozyten gebildet wird, aber auch in Zellen des Hirns wie dem Plexus choroideus und den Leptomeningen vorkommt und keine Transmembrandomäne besitzt.

Der gebildete Komplex kann nun mit dem TLR 4 interagieren, der daraufhin dimerisiert, eine intrazelluläre MyD88-abhängige und MyD88-unabhängige Signalkaskade anstößt und so NF- $\kappa$ B und IRF-3 aktiviert. Die Bindung von LPS an den TLR 4 wird durch das TLR4-assoziierte Protein MD-2 (Myeloid Differentiation Factor-2) unterstützt, welches extrazellulär bindet. Es wurde nachgewiesen, dass MD-2 obligat für die LPS-Erkennung durch TLR4 ist <sup>92</sup>.

Weitere PAMPs, die als Liganden für TLR 4 fungieren, sind unter anderem das Fusionsprotein des respiratorischen Syncytial Virus (RSV) <sup>93</sup>, Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* <sup>94</sup>, Lipoteichonsäure <sup>81</sup> oder Taxol, ein Produkt der pazifischen Eibe <sup>95</sup>. TLR4 erkennt auch endogene Substanzen wie das Fibronectin <sup>96</sup> und die Hitzeschockproteine Hsp60 und Hsp70 <sup>41</sup>.

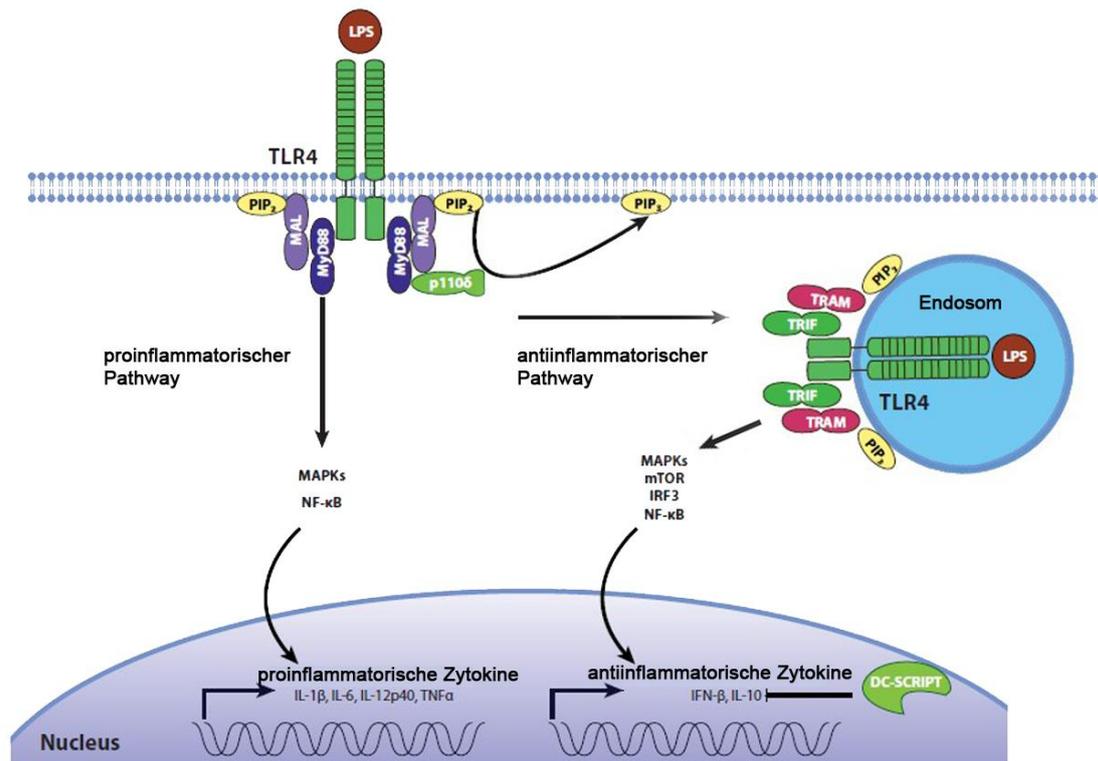


Abbildung 9: TLR4 Signalweg

Im Ruhezustand existiert Phosphatidylinositol auf der Zelloberfläche meist als PIP<sub>2</sub>, was die Rekrutierung von Mal/TIRAP ermöglicht, das eine PIP<sub>2</sub>-Bindungsdomäne enthält. Nach der Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) führt die TLR4-Aktivierung zur Rekrutierung von Adaptern Mal/TIRAP und MyD88 in frühen Stadien der PAMP-Erkennung, um die Produktion entzündlicher Zytokine durch die MAP-Kinasen JNK und p38, sowie den Transkriptionsfaktor NF-κB zu fördern. Die Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> in PIP<sub>3</sub> durch das p110δ bewirkt die Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes in endosomale Kompartimente. TLR4 induziert dabei über die Adapter TRIF und TRAM, sowie über die MAP-Kinasen, NF-κB und IRF3 die Sekretion von IL-10 und Typ I IFNs. [modifiziert nach <sup>87</sup>]

#### **4.8 Die Rolle von TLR im zentralen Nervensystem, besonders in den CVOs**

Lange Zeit galt das Gehirn aus immunologischer Sicht als privilegiertes Organ, da es eine Blut-Hirn-Schranke besitzt und es dadurch kein Eindringen von Keimen geben sollte. Man konnte dies mittlerweile widerlegen und weiß, dass Immunreaktionen auch in diesem Organ auftreten und eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese bestimmter ZNS-Erkrankungen spielen. Das ZNS ist als besonders vulnerabel anzusehen, da CVOs Einfallstore für Inflammationen sein können. Die CVOs mit gefensterten Kapillaren und ohne BHS sind daher, gerade im Hinblick auf eine immunologische Abwehr, von besonderer Bedeutung. So ist hier ein erhöhtes Vorkommen von TLR zu erwarten.

#### **4.9 Fragestellung**

Toll-like Rezeptoren nehmen gerade in Bezug auf immunmodulierende und immunstimulierende Antworten eine entscheidende Rolle ein.

Da organspezifische Expressionsmuster der TLR2 und TLR4 eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen, ist das Ziel der Arbeit deren Verteilung in den verschiedenen CVOs zu untersuchen. Unter diesen waren die CVOs des dritten Ventrikels, das SCO und das OVLT, sowie das SFO von besonderem Interesse.

Speziell für das SCO stellt sich weiterhin die Frage, ob Beziehungen zwischen dem Reissner'schen Faden und den TLR-Typen des SCO bestehen. Gerade im Hinblick auf die Tatsache, dass der Reissner'sche Faden, der in den Liquor sezerniert wird, klebriger Natur ist, muss die Problematik, dass angeheftete Antigene den TLR-Typen zugeführt werden könnten, beleuchtet werden.

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Versuchstiere und Gewebegewinnung**

#### *5.1.1 Versuchstiere*

Die Tierversuchsreihe und die histologischen Untersuchungen wurden im Institut für Anatomie II der Dr. Senckenbergischen Anatomie der Johann-Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt. Alle an den Tieren vorgenommenen Eingriffe zur Gewebeentnahme waren von der zuständigen Behörde genehmigt und entsprachen den gesetzlichen Richtlinien. Bei den Versuchstieren handelt es sich um fünf männliche Ratten des Wistar-Auszuchtstammes, die von Charles River (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH in D-Sulzbach) bezogen wurden. Alle Ratten wurden unter kontrollierten Bedingungen (handelsübliches Rattenfutter und Wasser ad libitum, Licht von 06:00 bis 18:00 Uhr, Temperatur 22 °C) in einem Gruppenkäfig zusammen gehalten. Die Tiere befanden sich nach Ankunft im Institut noch zwei Wochen in Gruppenhaltung. Zu dem Zeitpunkt der Gewebeentnahme waren die Ratten acht Wochen alt.

#### *5.1.2 Anästhesie*

Die Anästhesie erfolgte intraperitoneal mit Pentobarbital-Natrium (60mg/kg KG) (Nembutal; Ceva Tiergesundheit GmbH, D-Düsseldorf). Die Dosis führte zu tiefer Narkose.

#### *5.1.3 Perfusion*

In tiefer Narkose wurden die Tiere in einer Präparierschale fixiert und anschließend der Thorax eröffnet, um einen Zugang zum Herzen zu erlangen. Nach Aufsuchen des linken Ventrikels und Insertion einer Kanüle wurde transcordial mit einer Heparin-Kochsalzlösung (0,9%) durchgespült. Um eine Perfusion zu ermöglichen wurde gleichzeitig der rechte Vorhof, um den Durchfluss zu ermöglichen, eröffnet. Als kein Blutaustritt, sondern nur noch Ausfluss von Kochsalzlösung aus dem rechten Vorhof erkennbar war, erfolgte die Perfusion mit dem Fixativ. Dazu wurde der angeschlossene Dreiwegehahn umgelegt. Die Fixation erfolgte mit einem 4%igen Paraformaldehyd-Phosphatpuffer-Gemisch. Pro Ratte waren 200 ml Perfusionsvolumen notwendig. Die Perfusionsdauer betrug etwa 5 Minuten.

#### *5.1.4 Entnahme des Gehirns*

Direkt im Anschluss erfolgte die Dekapitation. Die Schädeldecke wurde vorsichtig entlang der medianen Schädelnaht eröffnet, die Bulbi olfactorii rostral des Chiasma opticum abgetrennt und die Hirne entnommen. Die Gewebereste wurden fachgerecht entsorgt.

#### *5.1.5 Gewebefixierung*

Die Gehirne wurden nach der Entnahme für 24 Stunden bei 5 °C nachfixiert, um durch vollständige Fixierung eine postmortale Gewebeveränderung zu verhindern. Bei der Fixierlösung handelt es sich um eine 4%ige phosphatgepufferte Paraformaldehyd-Lösung. Da das in den Zellen befindliche Wasser durch Kristallisation beim Einfrieren zu einer Zerstörung der Gewebe führt, dies jedoch verhindert werden muss, wurden die Gehirne in Saccharose-Lösungen aufsteigender Konzentration inkubiert. Begonnen wurde mit einer 10%igen Saccharose-Lösung für 24 Stunden, gefolgt von einer 20%igen und 30%igen Lösung für den jeweils gleichen Zeitraum. Dabei war ein Absinken der Gehirne auf den Boden bereits vor dem Ende der Inkubationszeiträume ein Zeichen für deren vollständige Infiltration mit Saccharose. Nun konnten die Gewebe für die Kryostatschnittherstellung gefroren werden. Dazu wurde Isopenthan in einem Gefäß auf Trockeneis platziert. Die Gehirne wurden dann in die kalte Flüssigkeit hineingegeben. So werden die Gewebe gleichmäßig von Kälte erfasst, frieren schnell ein und eine Bildung von großen Eiskristallen, die später zu Artefakten in den Präparaten führen könnte, wird verhindert. Bei -25°C konnten die Gewebe nun im Gefrierschrank gelagert werden.

#### *5.1.6 Gewebeschnitte*

Die Schnitte wurden am Kryostaten (Modell: Leica CM3050 S) angefertigt. Die Schnittdicke betrug für alle Präparate 20 µm. Die Temperatur des Kryostaten wurde auf eine Kammertemperatur von -26 °C eingestellt und die Kühltemperatur der Gewebehalter variierte je nach Ergebnis der Schnittherstellung und der Raumtemperatur zwischen -27 °C und -25 °C. Jedes Hirn wurde zunächst manuell getrimmt und dann auf dem Präparatehalter mit Tissue Tek geklebt. So konnten die Gewebe geschnitten und auf Objektträgern aufgefangen werden. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Präparate im Gefrierschrank bei -25°C gelagert.

## 5.2 Materialien und Gerätschaften

Tabelle 1: Chemikalien Übersicht

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Aqua dest.	Apotheke Uniklinikum, D-Frankfurt
BSA	PAA Laboratories GmbH, A-Pasching
D (+) Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Entellan	Merck KGaA, D-Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, D-Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe
HCl (konzentriert)	Merck KGaA, D-Darmstadt
Heparin	Ratiopharm, D-Ulm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, D-Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, D-Darmstadt
NaCl (0,9% Lsg.)	Braun, D-Melsungen
Nembutal	Sanofi Ceva, D-Hamburg
NGS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Tissue Tek	Sakura Finetek, USA-Torrance
Tris	Merck KGaA, D-Darmstadt
Triton X-100	AppliChem GmbH, D-Darmstadt
Xylol	Thermo Fisher Scientific GmbH, D-Braunschweig

### 5.2.1 Puffer und Lösungen

#### *Heparin-Lösung*

1000 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung wurden mit 5000 IE unfraktioniertem Heparin versetzt. Die Volumenmenge reichte für die Perfusion von fünf Ratten.

#### *Paraformaldehyd (PFA)-Lösung*

Paraformaldehyd dient der Fixierung von Geweben. Für die Herstellung von einem Liter Fixierlösung wurde 40g Paraformaldehyd bei maximal 60 °C in 500 ml aqua dest. unter ständigem Rühren gelöst (dies entspricht einer 8%igen Lösung). Dazu wurde tropfenweise (30 Tropfen) NaOH-Lösung zugegeben, welches die Depolymerisation beschleunigt. Dieser Lösung wurden 500 ml 0,2 M PB hinzugefügt, wodurch eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung in 0,1 M PB mit dem voreingestellten pH-Wert entstand.

#### *Phosphatpuffer (PB)*

Für die Herstellung einer 0,2 M PB-Stammlösung wurden 22,71 g·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 5,44 g·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde mit Hilfe des pH-Meters auf 7,4 aus den beiden Lösungen titriert.

#### *Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)*

Für die Herstellung von 3 Liter einer PB-Stammlösung (0,02 M mit 0,9%) wurde 27 g NaCl, 6,82 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,63 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde mit Hilfe des pH-Meters auf 7,4 eingestellt.

#### *PBS-Puffer mit Triton (PBST)*

Es wurden zu einem Liter der 0,2 M PBS-Stammlösung 3 ml Triton X-100 gegeben.

### *Tris-Puffer*

Tris-Puffer (0,05 M) wird als Reaktionslösung für die DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reaktion verwendet. Benötigt werden 6,06 g·l<sup>-1</sup> Tris je einem Liter aqua dest. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Salzsäure und dem pH-Meter auf 7,4 eingestellt.

### *Saccharose-Lösung*

Benötigt wurden Saccharose-Lösungen unterschiedlicher Konzentration. Zu je 200 ml aqua dest. gab man 20g, 40g und 60g D (+) -Saccharose hinzu, um eine 10%ige, 20%ige und 30%ige Lösung zu erhalten.

### *Bovines Serum-Albumin (BSA) – Lösung*

Für eine 5%ige BSA-Lösung werden 2,5g BSA in 50 ml der PBST-Stammlösung gelöst.

### *DAB-Färbelösung*

Um 400 ml der DAB-Färbelösung herzustellen, wurden 0,2 mg 3,3'-Diaminobenzidin in 400 ml Tris-Puffer gelöst. Kurz vor dem Gebrauch wurde dann 200 µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt.

### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol*

In 360 ml Methanol wurden 40ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst. Diese Lösung dient der Blockade der endogenen Peroxidase.

*Tabelle 2: Gerätschaften Übersicht*

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Präzisionswaage	Sartorius AG, D-Göttingen
Kryostat	Leica CM3050 S, D-Wetzlar
Axioskop, HBO50	Zeiss, D-Oberkochen
AxioCam HRc	Zeiss, D-Oberkochen
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf AG, D-Hamburg
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, D-Staufen im Breisgau
pH-Meter	WTW GmbH, D-Weilheim
Reagenzglasschüttler	IKA, D-Staufen im Breisgau
Gefrierschrank	Liebherr, CH-Bulle
Pasteurpipetten	BRAND GmbH + CO KG, D-Wertheim
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, D-Hamburg
Messbecher 50ml, 100ml	Duran Group, D-Wertheim
Objektträger	Thermo Fisher Scientific GmbH, D-Braunschweig
Deckgläser	Knittel-Glasbearbeitungs GmbH, D-Bielefeld

### 5.3 Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren dienen dazu, Antigene in Gewebeschnitten zu lokalisieren. Dazu bedient man sich der Bindung von spezifischen Antikörpern an den gesuchten Antigenen. Durch eine angeschlossene Färbeprozedur werden die gebundenen spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. Die neueren Techniken verfügen alle über eine erhöhte Spezifität und Sensitivität. Die hier verwendete Färbemethode ist die labelled Avidin-Biotin-Methode (LAB-Methode), die sich der starken Affinität von Avidin und Biotin bedient.

Es wurden zwei Färbereihen erstellt:

*Tabelle 3: TLR2 Färbung (Serie a)*

	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Hersteller</b>
Primärantikörper	1:1000	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Sekundärantikörper	1:100	Biotinylierter Goat anti-Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Komplex	1:100	ExtrAvidin- Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Farbreaktion		DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

*Tabelle 4: TLR4 Färbung (Serie b)*

	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Hersteller</b>
Primärantikörper	1:1000	Goat	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Sekundärantikörper	1:100	Biotinylierter Rabbit anti-Goat	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Komplex	1:100	ExtrAvidin - Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Farbreaktion		DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

### 5.3.1 Avidin-Biotin-Methode (LAB-Methode)

Die starke Affinität zwischen dem Glykoprotein Avidin (oder auch Streptavidin) und dem Vitamin Biotin ist Grundlage dieser Färbemethode<sup>97</sup>. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, welches nichtkovalent an Avidin bindet. Biotin kann zudem mit einem sekundären Antikörper gekoppelt werden, der gegen das IgG der Wirtsart gerichtet ist, aus der der spezifische Antikörper stammt (biotinylierter Ak), ohne dessen Funktion zu beeinträchtigen.

Gegenwärtig werden zwei verschiedene Avidin-Biotin-Färbungen durchgeführt. Die Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC) und die markierte Avidin-Biotin-Methode (labelled Avidin/Streptavidin-Biotin-Methode, LAB/LSAB). Beide Methoden benötigen einen biotinylierten Zweitantikörper. Freie Bindungsstellen am Avidin des Avidin-Biotin-Komplexes oder des enzymgekoppelten Avidin binden an das Biotin des Brücken-(zweit-)antikörpers.

Bei der hier verwendeten LAB-Methode ist das Avidin direkt mit einem Enzym markiert (labelled). Aufgrund der molekularen Konfiguration binden in der Regel weniger als vier Biotin Moleküle, so dass mindestens eine Bindungsstelle für Enzym-geladenes Avidinmolekül frei bleibt. So kann die Verbindung zu dem Avidin-Komplex hergestellt werden.

Häufig verwendete Enzyme sind Meerrettichperoxidase und alkalische Phosphatase. Die in dieser Arbeit verwendete Meerrettichperoxidase bildet mit dem Chromogen ein braunes Reaktionsprodukt. Im Vergleich zur ABC-Methode, welches größere Komplexe bildet, stehen bei der LAB-Methode alle (maximal vier) freien Bindungsstellen dem Avidin zur Verfügung. Bei der ABC-Methode ist der Avidin-Biotin-Enzymkomplex vorgeformt<sup>98</sup>, durch deren Größe kommt es zu einer sterischen Begrenzung der angelagerten ABC-Komplexe. Die LAB-Färbung wird als annähernd 4- bis 8-fach empfindlicher als die ABC-Methode beschrieben<sup>99</sup>, weshalb mit dieser Methode gearbeitet wurde.

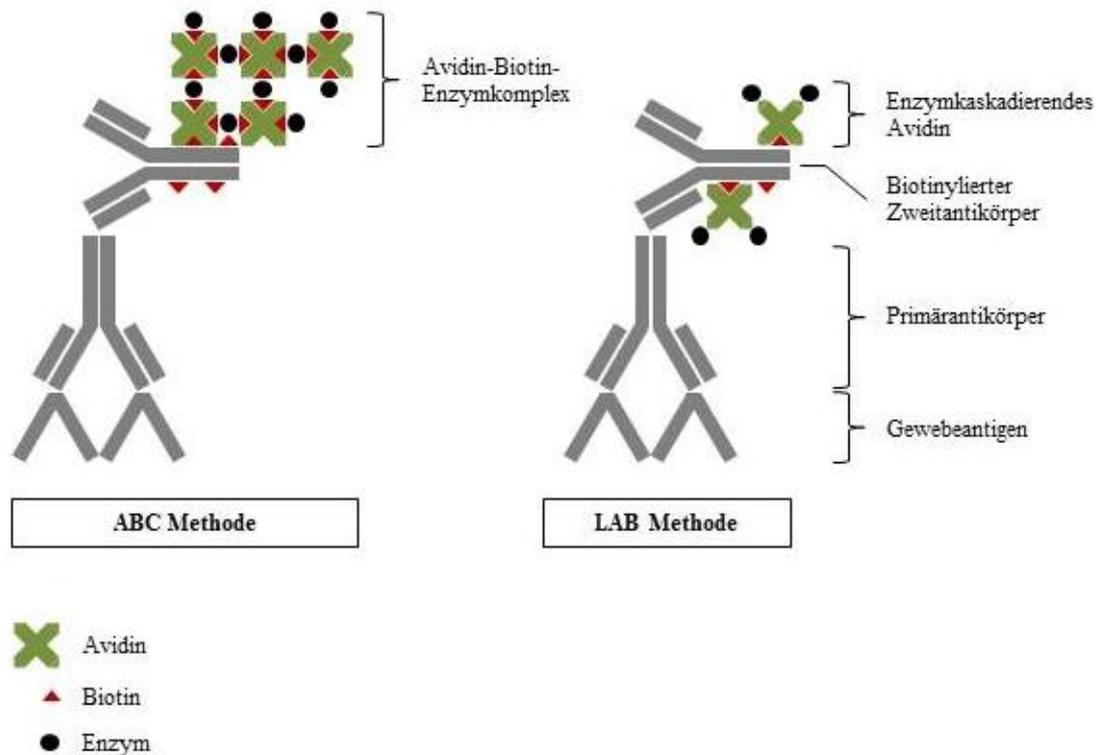


Abbildung 10: Avidin-Biotin-Methoden

Vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe (ABC) oder enzymmarkiertes Avidin (LAB) reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern [modifiziert nach <sup>98</sup>]

### 5.3.2 Inhibition endogener Peroxidase

Die Blockierung der gewebesigenen, endogenen Peroxidase ist notwendig, um unerwünschte Hintergrundfärbungen zu reduzieren. Die Objektträger wurden in Inkubationsboxen platziert. Vor der Färbung wurde die endogene Peroxidase der Präparate durch Inkubation mit 3%igem  $H_2O_2$  in Methanol für zehn Minuten blockiert. Anschließend werden sie mit PBST gewaschen.

Das Triton im PBST Puffer benetzt die Membranen im Gewebe. So können im Rahmen der Antikörperinkubation die Antikörper besser in die Zellen eindringen.

Nun erfolgt die 30-minütige Vorinkubation mit 5%igem BSA. Dieses dient ebenfalls der Reduzierung von unspezifischen Hintergrundfärbungen. Das Bovine Serum Albumin besetzt stark geladene Kollagen- und Bindegewebsstrukturen, an die der Primärantikörper unspezifisch binden könnte und so zu einer falsch positiven Reaktion führen würde.

### 5.3.3 Primäre Antikörper

Der spezifische Antikörper gegen TLR2 bzw. TLR4 wurde in der Inkubationsbox auf die Schnitte aufgebracht. Pro Objektträger wurden 300 µl der Antikörperlösung gebraucht, die bei Raumtemperatur (23 °C) und über Nacht inkubieren konnten. Die Antikörperkonzentration der Lösung betrug 1:1000. Die primären Antikörper lagern sich nun an die gesuchten Zielstrukturen, den TLR2 und TLR4 Rezeptoren der Membranen, an. Die gewählte Konzentration ist titerabhängig und bewirkt ein Maximum an spezifischer Färbung und ein Minimum unerwünschter Hintergrundfärbung.

Damit die Präparate nicht austrocknen konnten, wurden die Inkubationsboxen mit feuchten Tüchern abgedeckt. Nach der Inkubation erfolgte eine dreifache Spülung mit PBST (3 x 5 min).

### 5.3.4 Sekundäre Antikörper

Mit dem biotinylierten zweiten Antikörper wurde für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Präparate wieder mit PBST gewaschen (3 x 5 min), um so die ungebundenen Antikörper zu entfernen.

### 5.3.5 Avidin Komplex

Für eine Stunde wurde nun der Avidin-Komplex aufgetragen, bestehend aus Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Avidin. Dieses ist in PBST in einer Konzentration von 1:100 gelöst. Da der sekundäre Antikörper biotinyliert war, kam es dadurch zur hochaffinen Bindung zwischen dem Biotin des sekundären Antikörpers und dem Avidin des Nachweiskomplexes. Nach dem Waschen mit PBS (3 x 5 min) wurde für 5 min mit Tris-Puffer gespült. Danach erfolgte die DAB-Farbreaktion.

### 5.3.6 DAB-Farbreaktion

Die hier angewendete Nachweismethode beruht auf der Oxidation des Chromogens 3,3-Diaminobenzidin (DAB) nach Graham und Karnovsky<sup>100</sup>, die als Puffersystem Tris-Puffer benötigt.

DAB bildet bei Oxidation ein braunes Farbprodukt, wodurch ein guter Kontrast zwischen Bindungsort und Hintergrund gewährleistet werden kann. Da DAB auch endogene Peroxidasen nachweisen kann, wurden diese im ersten Schritt mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geblockt.

Die Reaktionszeiten waren bei den Anfärbereihen sehr unterschiedlich. Zwischen 3 bis 7 Minuten dauerte die Einwirkzeit, bis die gewünschte Farbintensität erzielt wurde. Es wurde unter einem Abzug gearbeitet. Da DAB karzinogen ist, wurde die Lösung anschließend mit Natriumhypochlorid oxidiert und so neutralisiert.

### 5.3.7 Entwässerung und Fertigstellung

Um die Schnitte für die mikroskopische Auswertung vorzubereiten, wurde diesen das Wasser entzogen. Dazu wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema dehydriert.

5 min	70% Ethanol
5 min	80% Ethanol
5 min	90% Ethanol
5 min	96% Ethanol
2 x 2-3 min	100% Ethanol

Nach Abschluss der Entwässerung wurden die Präparate für 2 x 5 min mit Xylol entfettet. Nach diesem Arbeitsschritt konnten die Schnitte mit einem Deckglas und einem wasserfreien Eindeckmittel (Entellan) eingedeckt werden.

## 5.4 Auswertung

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Zeiss, Axioskop mit HBO 50-Beleuchtung und AxioCam HRC-Dokumentation) ausgewertet. Mit Hilfe der Software Axiovision SE64 konnten die Bilder digitalisiert auf dem PC gespeichert werden. Die Bildtafeln wurden mit Photoshop CS5 Extended und Microsoft PowerPoint (Office Home and Student 2016) unter Microsoft Windows 7 erstellt.

## **6 Ergebnisse**

Generell ließ sich die immunhistochemische Färbung für TLR2 und TLR4 in Ependymzellen aller Ventrikelabschnitte nachweisen. Auch die überwiegende Zahl der Plexus choroideus-Zellen zeigte Immunreaktivität gegenüber den Toll-like Rezeptoren. Darüber hinaus waren immunreaktive Elemente in den Endothelstrukturen von Blutgefäßen im Hirngewebe beobachtet worden, und einzelne Faserprofile und Perikarya von Gliazellen und Neuronen zeigten TLR-Färbung.

In den folgenden Paragraphen werden die Befunde im Hinblick auf ihre zellulären und entitären Spezifika beschrieben:

## 6.1 Verteilung TLR2 und TLR4 im Subcommissuralorgan

### 6.1.1 Immunreaktivität gegen TLR2 im SCO

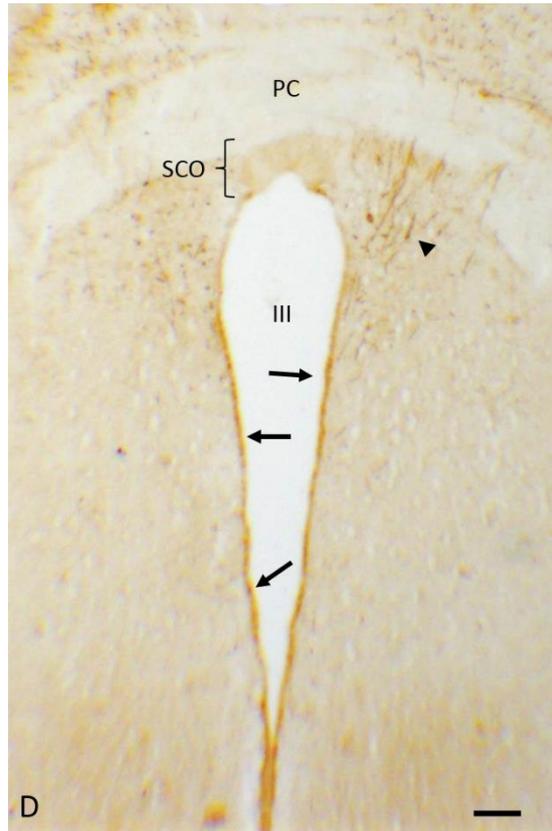
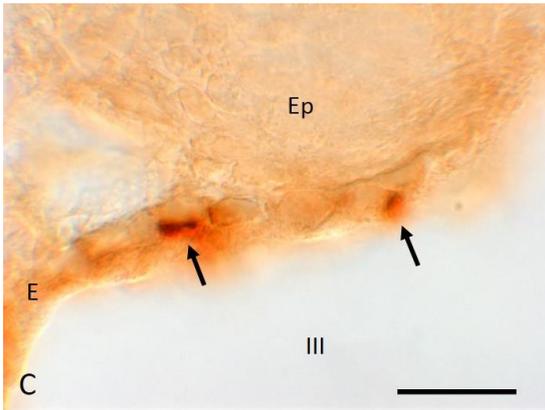
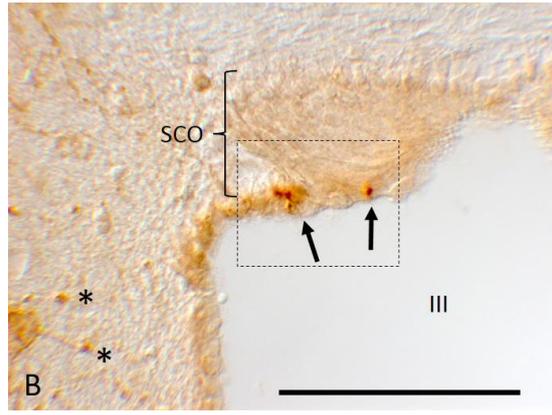
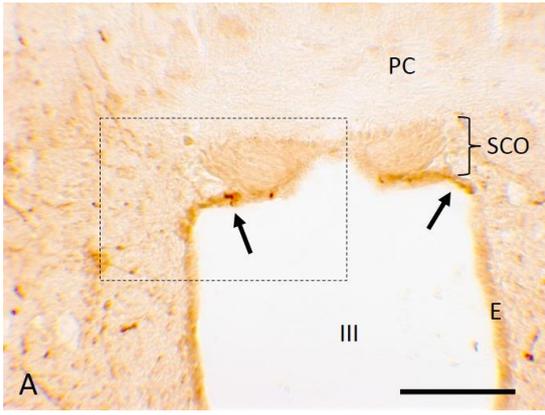
Die TLR2 Immunfärbung stellt sich im SCO deutlich schwächer dar als in anderen positiven Hirnregionen (Fig. 1 A). Die ependymalen Zellen des SCO sind ebenfalls nur schwach gefärbt. Eine stärkere Tingierung erkennt man dagegen in Ependymzellen in unmittelbarer Nachbarschaft des SCO sowohl in den Bereichen des lateralen Ventrikeldachs (Fig. 1 B, C) als auch in der lateralen Ventrikelwand (Fig. 1 D). Die Commissura posterior ist im Hinblick auf die TLR2-Färbung ohne Signal. Periventrikulär zeigen sich reaktive Bereiche: Es treten vereinzelt immunreaktive Perikaryen und Fasern im Bereich des pretectalen Nucleus auf, die z.T. einen typischen Tanyzytenbau darstellen (Fig. 1 B).

---

### Fig. 1 TLR 2-Immunfärbung im SCO

**A** Immunhistochemische Übersichtsfärbung für TLR2 des SCO **B** Vergrößerung aus A, Interferenzkontrastmikroskopische Aufnahme **C** Vergrößerung aus B **D** SCO und caudaler III. Ventrikel; hier ist rechtsseitig der radiäre Bau der tingierten Tanyzyten gut zu erkennen

III = dritter Ventrikel, PC = posteriore Kommissur, SCO = Subcommissuralorgan, E = Ependymzellen, gestrichelte Linien = Grenzen der Ausschnittvergrößerungen im jeweiligen Folgebild, ← = apikale TLR2-Färbung, \* = Perikaryen, ◀ = Tanyzyten  
Maßstabsbalken in den Bildern A, B, D = 100 µm, in dem Bild C = 20 µm



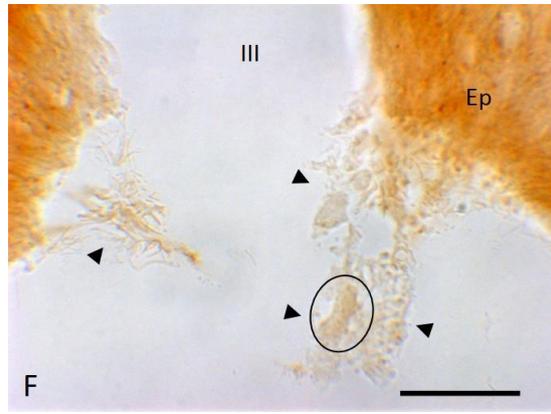
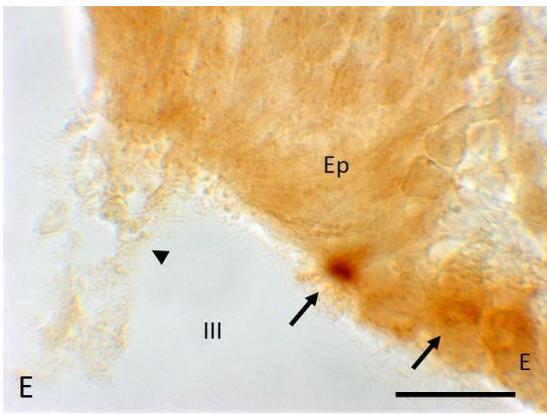
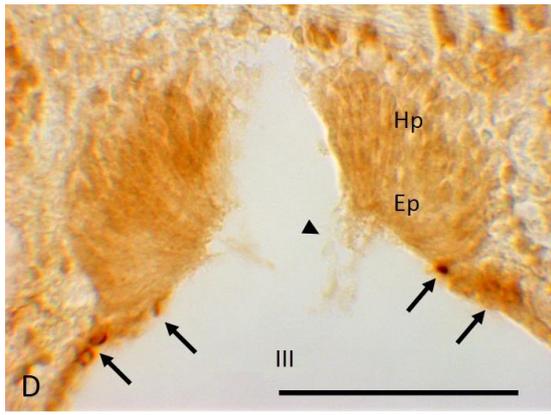
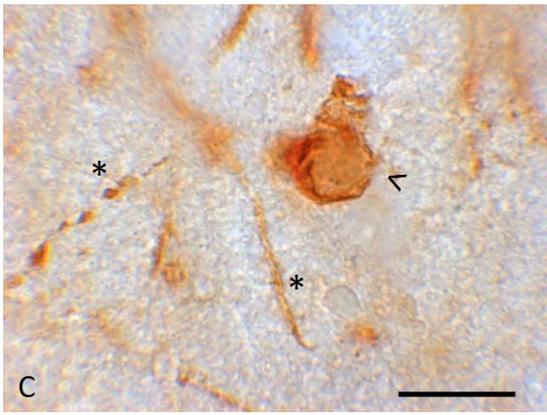
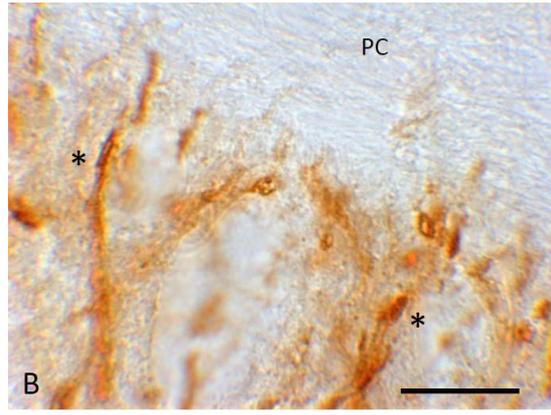
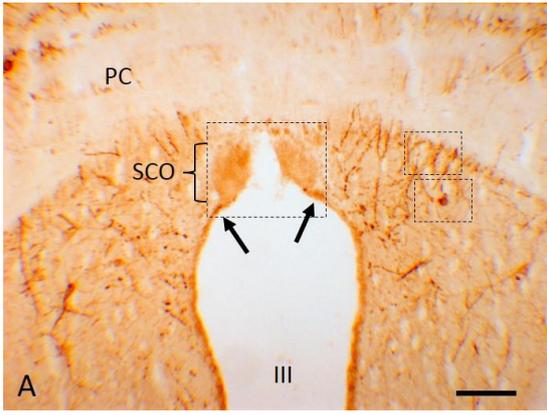
Deutlich zu sehen sind hier die Nervenfasern des pretectalen Nucleus, die sich in der Vergrößerung in Fig. 2 B und C deutlich darstellen. Diese Fasern grenzen sich klar von der ungefärbten posterioren Kommissur ab. Die Fig. 2 D-F zeigen einen interessanten Befund: Am apikalen Bereich des SCO wird Material in den dritten Ventrikel abgegeben, das als Sekret des SCO zu erklären wäre.

---

### **Fig. 2 TLR 2-Immunfärbung im SCO**

**A** Immunhistochemische Übersichtsfärbung für TLR2 des SCO mit Einriss-Artefakt im mittleren Drittel **B** Vergrößerung aus A, Fasern im pretectalen Nucleus am Übergang zur posterioren Kommissur **C** Vergrößerung aus A, Fasern des pretectalen Nucleus mit Zellkörper **D** Vergrößerung aus A **E** Vergrößerung aus D, rechter Anteil des SCO mit sichtbarem Sekret **F** Vergrößerung aus D, sichtbares Sekret aus dem SCO mit Pfeilspitzen markiert

III = dritter Ventrikel, PC = posteriore Kommissur, SCO = Subcommissuralorgan, E = Ependymzellen, Ep = Ependymale SCO-Zellen, Hp = Hypendymale SCO-Zellen, gestrichelte Linien = Grenzen der Ausschnittvergrößerungen in den jeweiligen Folgebildern, ← = apikale TLR2-Färbung, \* = Perikaryen, ◀ = Sekret aus SCO, < = Zellkörper, Kreis = der Kreis symbolisiert den Reissner'schen Faden  
Maßstabsbalken in Bild A, D = 100 µm, in den Bildern B, C, E, F = 20 µm



### 6.1.2 Immunreaktivität gegen TLR4 im SCO

Das Subcommissuralorgan zeichnet sich durch seine Tingierung deutlich vom umgebenden Gewebe ab. Dies wird durch die vollkommen immunnegative posteriore Kommissur besonders betont. Auch lässt sich das SCO vom periventriculären Bereich durch stärkere Färbung abgrenzen.

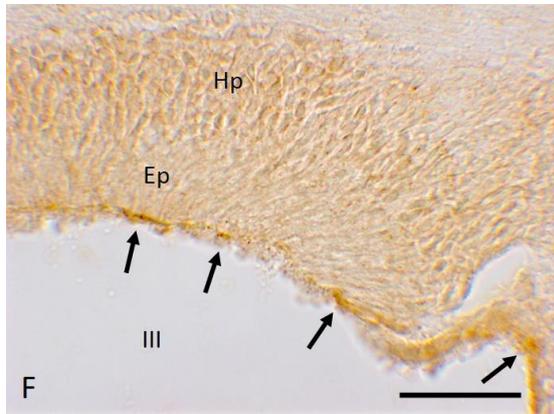
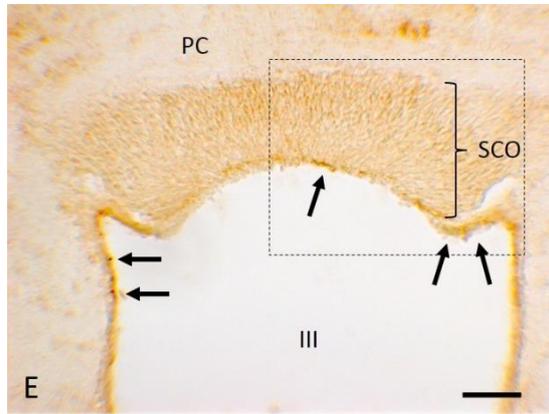
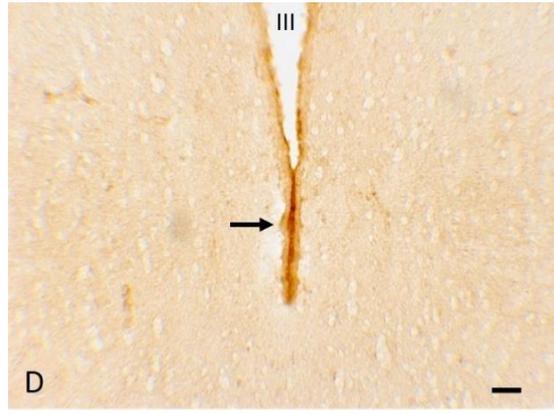
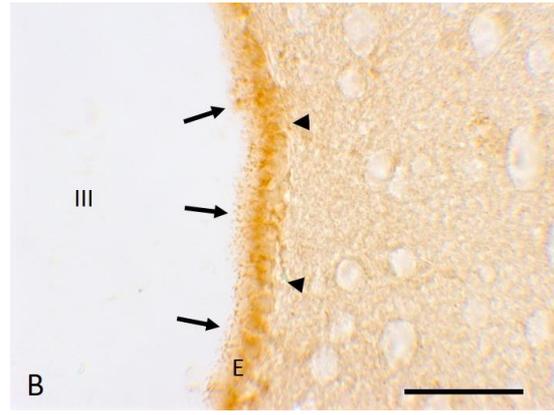
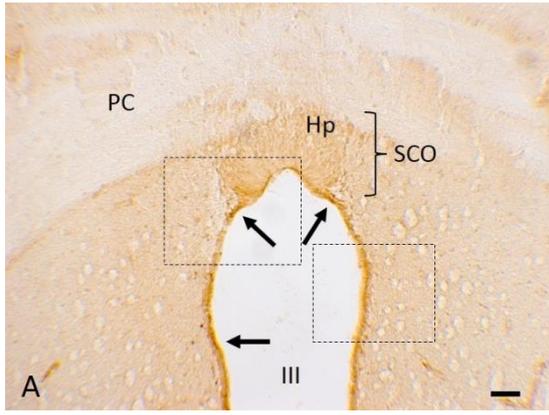
Innerhalb des SCO kann man einen Färbungsgradienten beobachten: In den ependymalen Zellen des SCO sind zahlreiche TLR4-immunreaktive Zellen zu erkennen, während in der hypendymalen Zellschicht schwächer gefärbte Zellen dargestellt sind.

---

### Fig. 3 Immunreaktivität gegen TLR 4 im SCO

**A** Schnitt auf Höhe des mittleren SCO **B** Vergrößerter Ausschnitt der Ventrikelwand des caudalen dritten Ventrikels **C** Vergrößerung aus A, lateraler Bereich des SCO mit Ventrikelwand **D** Vergrößerter posteroventraler Ventrikelabschnitt des dritten Ventrikels **E** Schnitt in Höhe des rostralen SCO **F** Vergrößerter Ausschnitt aus E mit hypendymalen und ependymalen SCO-Zellen

III = dritter Ventrikel, PC = posteriore Kommissur, SCO = Subcommissuralorgan, E = Ependymzellen, Ep= Ependymale SCO-Zellen, Hp = Hypendymale SCO-Zellen, gestrichelte Linien = Grenzen der Ausschnittvergrößerungen im jeweiligen Folgebild, ← = apikale TLR4-Färbung, ◀ = subependymale TLR4-Färbung  
Maßstabsbalken in allen Bildern = 50 µm



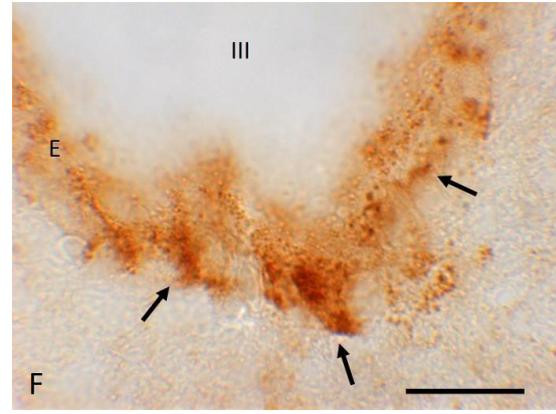
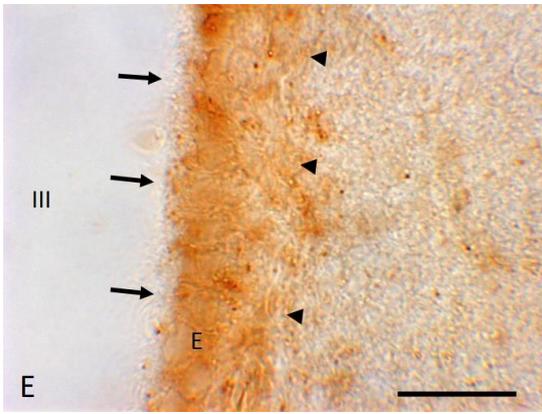
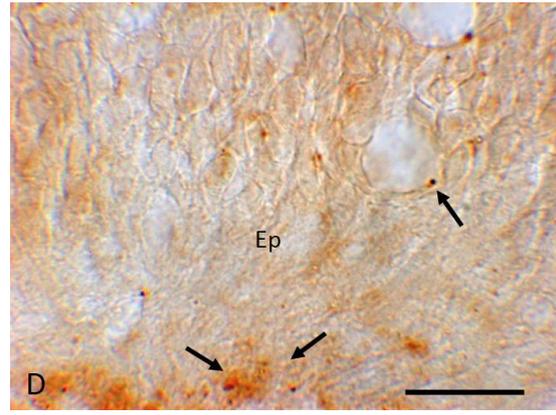
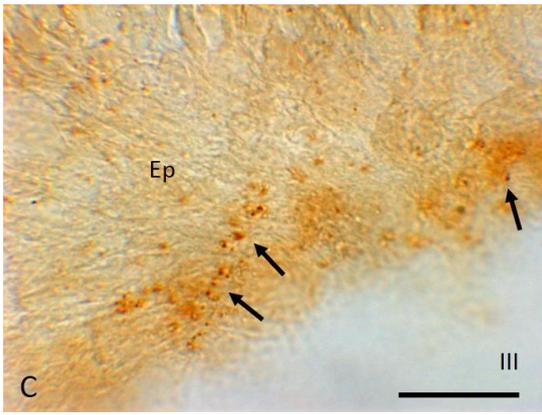
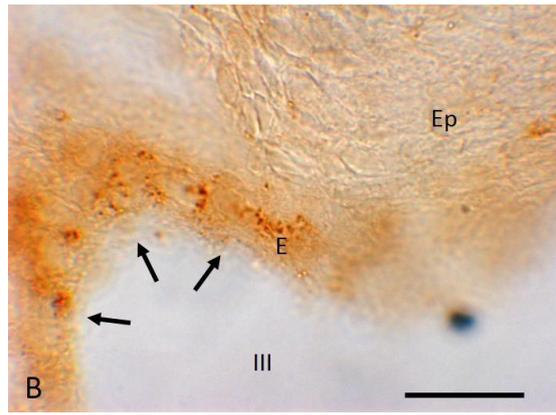
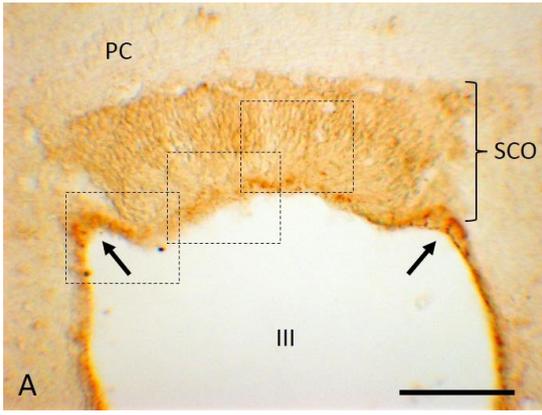
In den Ependymzellen des Ventrikels lassen sich in allen Bereichen viele TLR4-immunreaktive Zellen erkennen (Fig. 4 B-F). Auch hier ist im SCO der Färbungsgradient wie bei Fig. 3 deutlich sichtbar, in Fig. 4 C, D nun mit stärkerer Vergrößerung. Im apikalen Bereich der ependymalen SCO Zellen häufen sich die TLR4-haltigen Zellen.

---

**Fig. 4 Immunreaktivität gegen TLR 4 im SCO**

**A** Schnitt auf Höhe des rostralen SCO **B** Vergrößerter Ausschnitt aus A der paraventrikulären Ependymzellen **C** Vergrößerter Ausschnitt aus A aus dem lateralen Anteil des SCO **D** Vergrößerter Ausschnitt aus A aus dem mittleren Anteil des SCO **E** laterale Ventrikelwand **F** Kaudaler Ventrikelabschnitt

III = dritter Ventrikel, PC = posteriore Kommissur, SCO = Subcommissuralorgan, E = Ependymzellen, Ep= Ependymale SCO-Zellen, Hp = Hypendymale SCO-Zellen, gestrichelte Linien = Grenzen der Ausschnittvergrößerungen im jeweiligen Folgebild, ← = apikale TLR4-Färbung, ◀ = subependymale TLR4-Färbung  
Maßstabsbalken in Bild A = 100 µm, in den Bildern B-F = 20 µm



## 6.2 TLR2- und TLR4-immunreaktive Elemente im Plexus choroideus

### 6.2.1 Immunreaktivität gegen TLR2 im Plexus choroideus

Eine schwache TLR2-Immunreaktivität ist sowohl im Plexus als auch in den Ependymzellen des dritten Ventrikels zu erkennen (Fig. 5A). Der Plexus choroideus erscheint (wie bei TLR4 beschrieben) nur in einzelnen Abschnitten reaktiv, es stellt sich ein ähnlich differenziertes Muster dar, wie für TLR4. Die Ependymzellen des Ventrikels fallen ebenfalls durch ihre Variabilität mit tingierten und nicht tingierten Bereichen auf. Es sind einzelne Granula im Ependymzellverband erkennbar. Subependymal konnte ein TLR2-gefärbtes Neuron beobachtet werden.

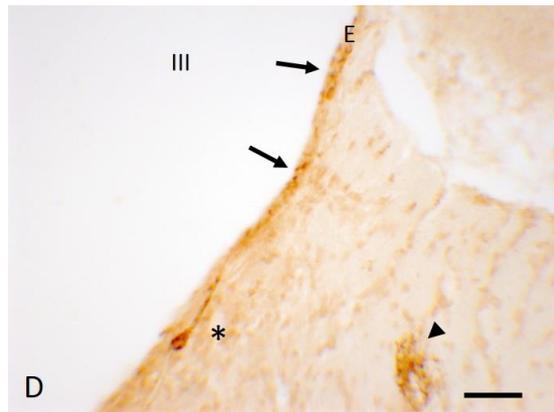
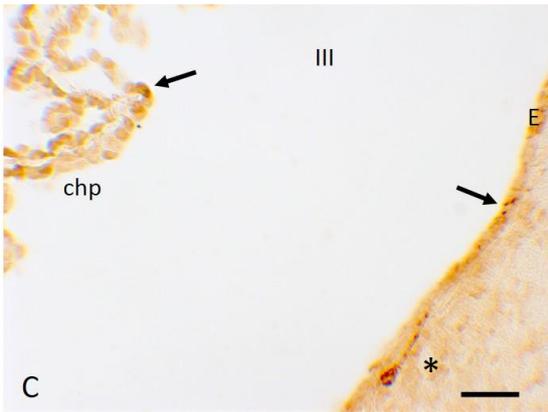
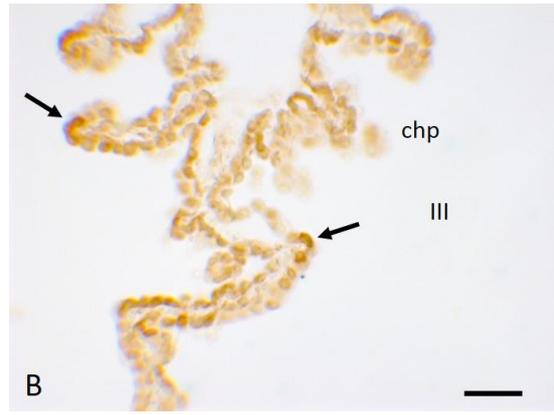
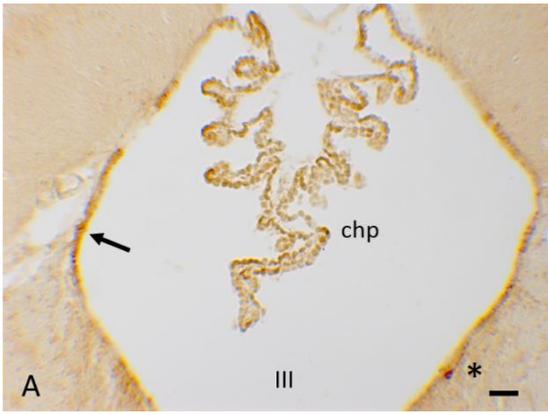
---

### Fig. 5 Immunreaktivität gegen TLR2 im Plexus choroideus

**A** Dritter Ventrikel mit Plexus choroideus **B** Vergrößerung des Plexus choroideus aus A. Deutlich sind die Unterschiede in der Färbintensität zwischen den Plexusepithelzellen **C** Ausschnitt aus A mit Plexus und Ventrikelwand. Auch die Ependymzellen weisen eine differenzierte TLR2-Immunreaktivität auf **D** Ventrikelwand des vierten Ventrikel mit subependymalem TLR2-immunreaktivem Neuron und Blutgefäß

III = dritter Ventrikel, chp = Plexus choroideus, E = Ependymzellen, ← = apikale TLR2-Färbung, \* = Perikaryon, ◀ = TLR2 gefärbtes Gefäß

Maßstabsbalken in allen Bildern = 50 µm



Die Ventrikelpendymzellen des den Plexus umgebenden Bereichs sind stark tingiert. Dies wird in der Vergrößerung Fig. 6 B sehr deutlich. Aber auch die Zellen des Plexus choroideus sind in einigen Bereichen reaktiv wie in der Vergrößerung von Fig. 6 B-E zu sehen ist.

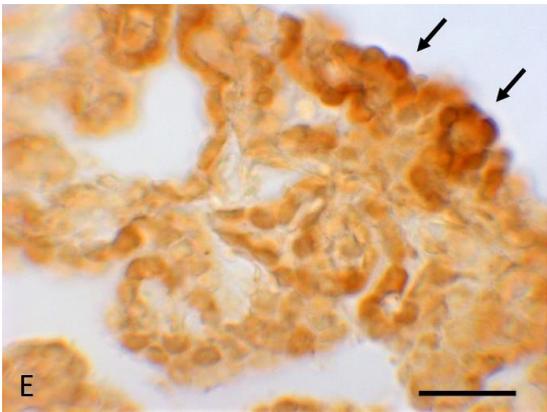
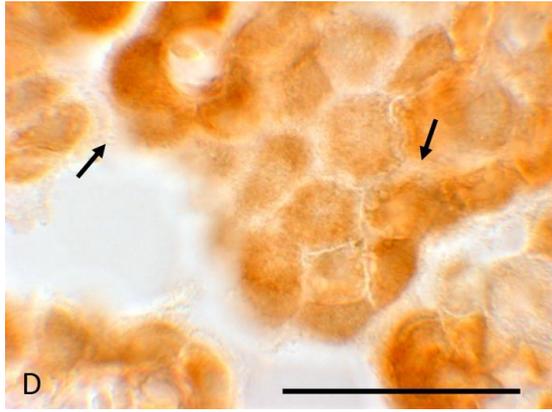
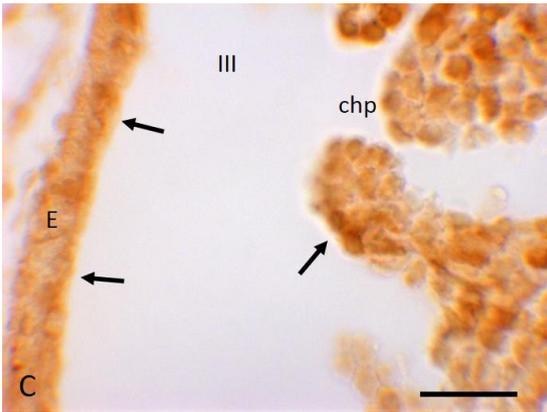
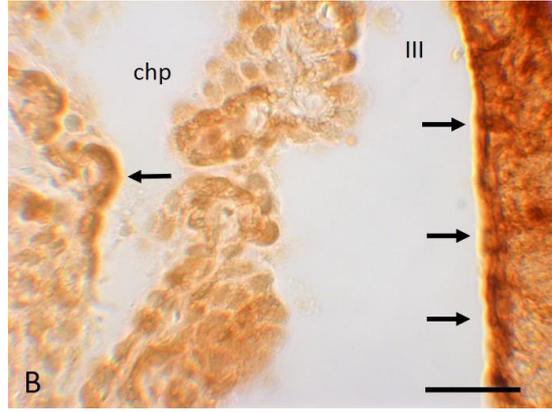
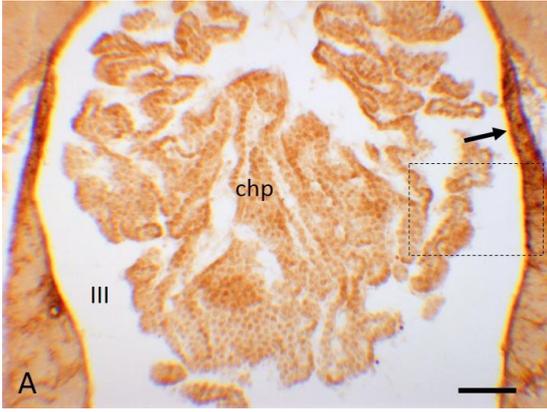
---

**Fig. 6 Immunreaktivität gegen TLR2 im Plexus choroideus**

**A** Dritter Ventrikel mit Plexus choroideus **B** Vergrößerung des Plexus choroideus aus A, Vergleich der Ventrikelwand mit den Plexuszellen **C** Vergrößerung des Plexus choroideus aus einem anderen Abschnitt mit Ventrikelwand **D** Vergrößerung der Plexuszellen **E** Vergrößerung der Plexuszellen

III = dritter Ventrikel, chp = Plexus choroideus, E = Ependymzellen, gestrichelte Linie = Grenze der Ausschnittvergrößerung im Folgebild, ← = apikale TLR2-Färbung

Maßstabsbalken in Bild A = 100 µm, in den Bildern B-E = 40 µm



### 6.2.2 Immunreaktivität gegen TLR4 im Plexus choroideus

Bereits bei Beobachtung mit geringer Vergrößerung (Fig. 7 A, D) erkennt man die markanten Tingierungen des Plexus choroideus. Bei genauerer Analyse fällt auf, dass ein sehr differenziertes Muster der Immunfärbung exprimiert ist. Bestimmte Abschnitte tragen sehr starkes Immunsignal, andere sind wesentlich schwächer gefärbt. Die stärkste TLR4-Immunreaktivität ist in den apikalen, parazellulären und basalen Membranabschnitten der Plexusepithelzellen zu beobachten. Intrazellulär findet sich eine prominente, jedoch geringer ausgeprägte Tingierung (Fig. 7 B, C).

Starke Immunreaktivität konnte darüber hinaus in der Wand der Plexusgefäße beobachtet werden (Fig. 7 C, G). Die bereits erwähnten differenzierten Muster der Immunreaktivität zeigten sich insbesondere bei den Plexusepithelzellen: Stark gefärbte Zellen wechseln mit kaum und wenig gefärbten Zellen entlang der Plexusoberfläche (Fig. 7 C, E, F).

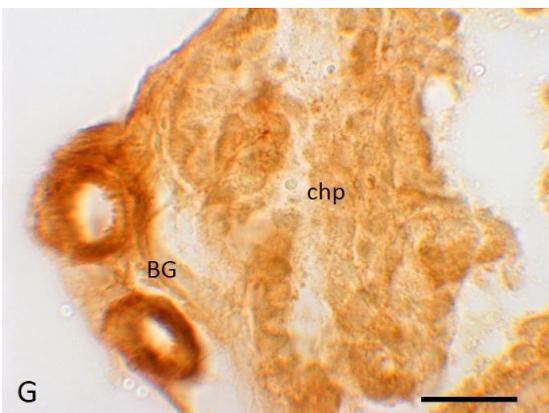
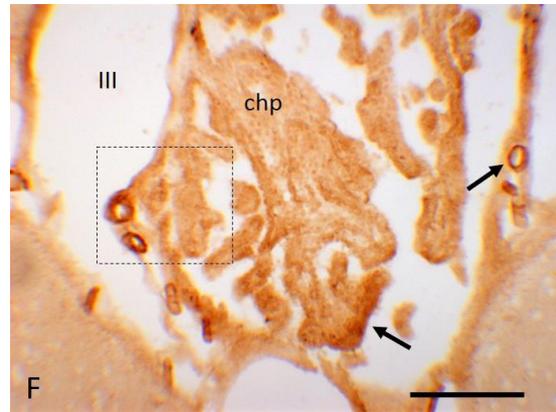
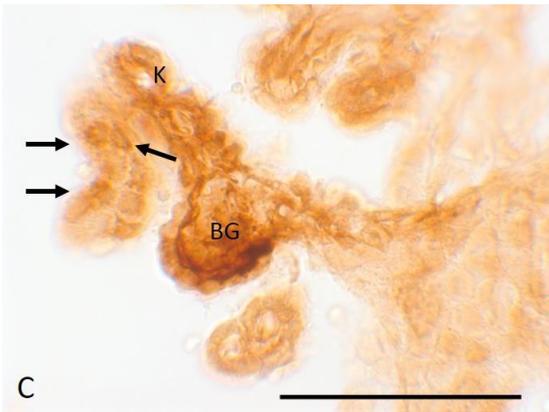
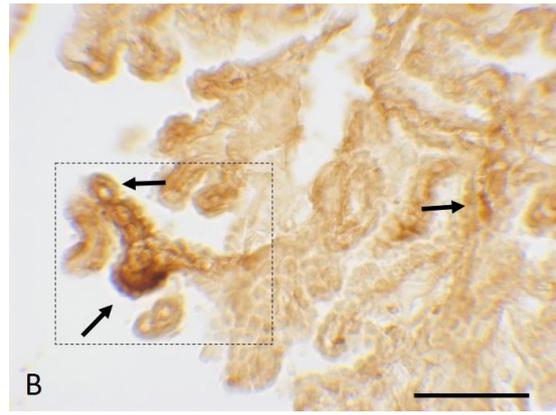
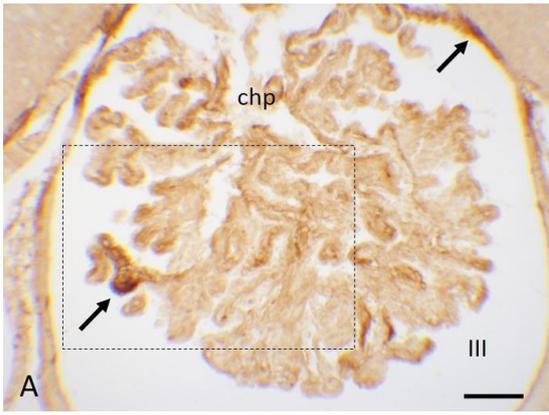
---

#### **Fig. 7 TLR4-Immunreaktivität im Plexus choroideus**

**A** Plexus choroideus des dritten Ventrikels. Zu beachten sind markante Farbeunterschiede in unterschiedlichen Plexusabschnitten. Zu erkennen sind auch immunreaktive Ependymzellen **B** Vergrößerter Ausschnitt aus **A** **C** Vergrößerter Ausschnitt aus **B**. Hier lassen sich die Farbeunterschiede einzelner Plexusepithelzellen gut beobachten (Pfeile) **D** Plexus choroideus des dritten Ventrikels in insgesamt stärkerer Färbung **E** Vergrößerter Ausschnitt aus **D** mit Ependymzellen des Ventrikels **F** Plexus choroideus des dritten Ventrikels mit Gefäßen **G** Vergrößerung aus **F** mit stark tingierten kleinen Blutgefäßen

III = dritter Ventrikel, chp = Plexus choroideus, K= Kapillare, BG= kleines Blutgefäß, gestrichelte Linien = Grenzen der Ausschnittvergrößerungen im jeweiligen Folgebild, ← = TLR4 Färbung der Plexusepithelzellen und der Ependymzellen

Maßstabsbalken in den Bildern A-E = 100 µm, in Bild G = 40 µm



### **6.3 Verteilung der TLR2- und TLR4-immunreaktiven Elemente im Subfornicalorgan**

#### *6.3.1 TLR2-Immunreaktivität im SFO*

In der TLR2-Färbung ist das ependymale Randgewebe kaum gefärbt. Eine klare TLR2-immunreaktive Grenzschicht des Subfornicalorgans zum Umgebungsgewebe ist daher nicht auszumachen. Dennoch sind einige TLR2-reaktive Zellen dargestellt. Diese Zellen weisen die TLR2-Färbung an ihrer Oberfläche auf. Dies spricht für die Membranständigkeit der TLR. Interzellulär waren Ansammlungen von tingierten Granula zu beobachten, die oft in Beziehung zu Kapillarendothelien standen.

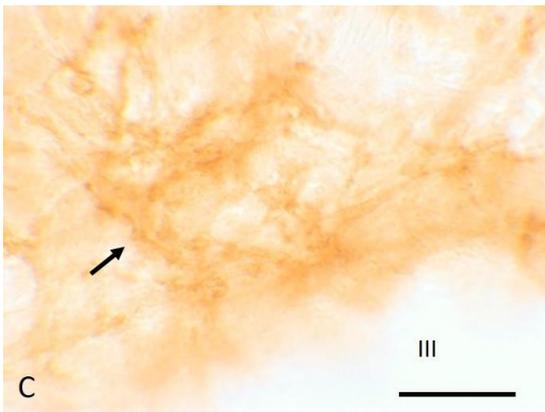
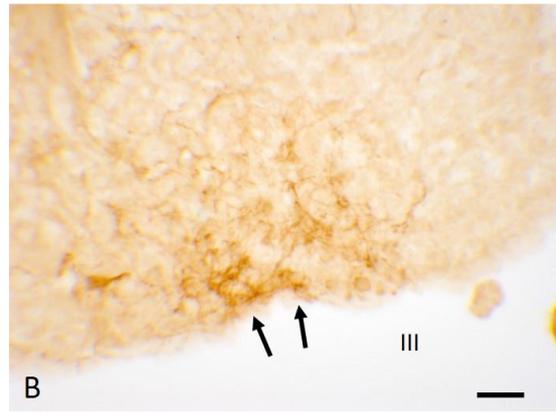
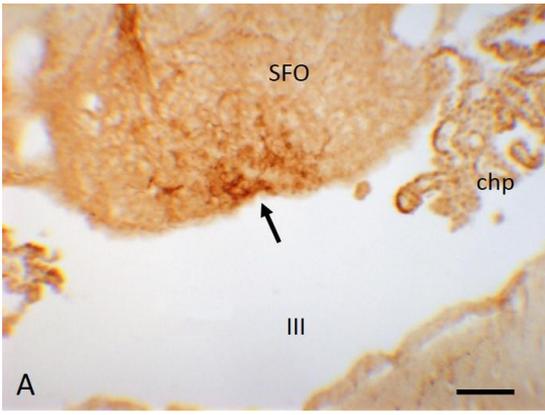
---

#### **Fig. 8 TLR2-Immunfärbung im SFO**

**A** Schnitt auf Höhe des SFO **B** Vergrößerung des SFO aus **A** **C** Vergrößerung des SFO aus **B**

III = dritter Ventrikel, SFO = Subfornicalorgan, chp= Plexus choroideus

Maßstabsbalken in Bild **A** = 100 µm, in Bild **B** = 40 µm, in Bild **C** = 20 µm



### 6.3.2 TLR4-Immunreaktivität im SFO

Das Subfornicalorgan tritt am Dach des dritten Ventrikels im Bereich der Foramina interventriculares als unregelmäßig tingiertes Organ deutlich hervor (Fig. 9 A). Eine kontinuierliche immunhistochemisch gegen TLR-Typen gefärbte Ependymschicht als Abgrenzung des SFO zum Ventrikellumen ist nicht beobachtet worden, sie ist weitestgehend ungefärbt, jedoch vorhanden. Einzelne deutlich TLR4-Immunreaktive Ependymzellen konnten jedoch nachgewiesen werden (Fig. 9 B, C). Bei näherer Betrachtung lässt sich erkennen, dass sich interzelluläre, zumeist perivaskuläre Bereiche deutlich markieren ließen.

Die zahlreichen im Organ lokalisierten arteriellen und venösen Gefäße fallen durch ihre kräftige Endothelfärbung auf (Fig. 9 D, E).

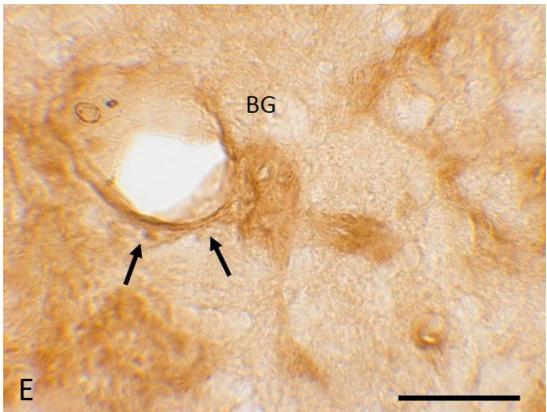
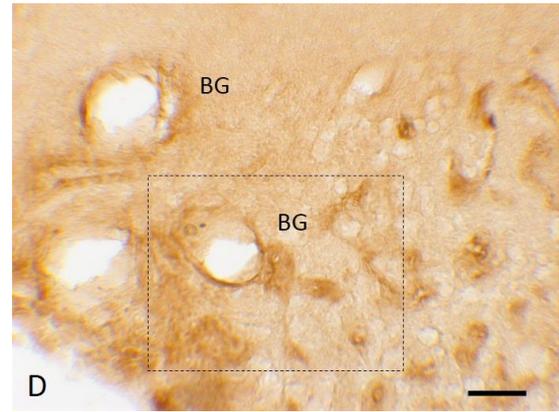
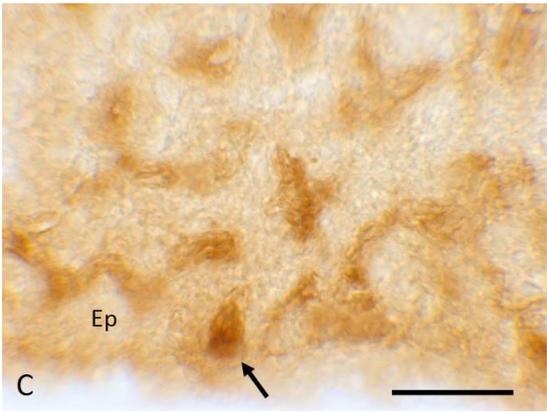
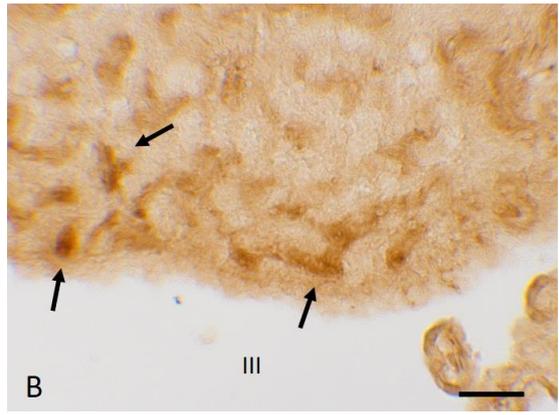
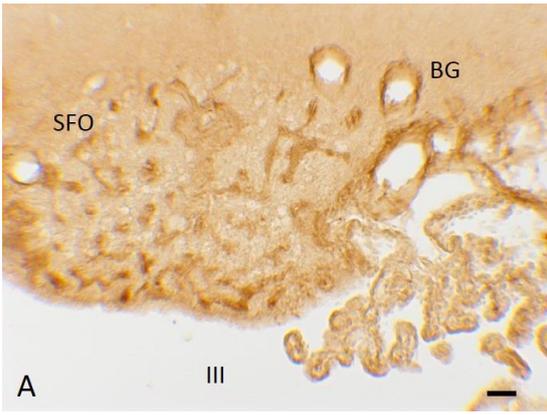
---

#### **Fig. 9 TLR4-Immunreaktivität im SFO**

**A** Übersichtsdarstellung des gesamten SFO im Frontalschnitt **B** Randbereich des SFO mit Ependym und Kapillarnetzen **C** Perivaskuläre Bereiche deutlich sichtbar **D+E** Vergrößerung von Gefäßen in der lateralen Zone im SFO

III = dritter Ventrikel, SFO = Subfornicalorgan, BG = Blutgefäß, EP = Ependymzellen, gestrichelte Linie = Grenze der Ausschnittvergrößerung im Folgebild, ← = TLR4-immunreaktive Zellen

Maßstabsbalken in allen Bildern = 50 µm



## 6.4 Verteilung der TLR2- und TLR4-immunreaktiven Elemente im OVLT

### 6.4.1 TLR2-Immunreaktivität im OVLT

Bei Betrachtung mit geringer Vergrößerung (Fig. 10 A, E, G) hebt sich das Organum vasculosum laminae terminalis durch eine intensivere Tingierung von seiner Umgebung ab. Es verläuft über dem Chiasma opticum. Die ependymalen Zellen des Hirnparenchyms treten kräftig hervor (Fig. 10 D) und gehen dann in das OVLT über, welches keine klare Randbegrenzung aufzuweisen scheint (Fig. 10 A, B, D). Betrachtet man das Innere des Organs, so ist hier ein Färbegradient zu beobachten (Fig. 10 A, C). Der Rand ist stärker, das Innere schwächer gefärbt. Einzelne Granula treten lediglich hervor (Fig. 10 C). Fig. E-H zeigen weiter dorsal gelegene Bereiche des OVLT. Hier befindet sich eine stärkere Färbung um den Recessus supraopticus herum, während die Peripherie schwächer gefärbt erscheint. Die Kapillaren im OVLT treten nur leicht hervor. Die ependymale Begrenzung nach kaudal hebt sich klar ab.

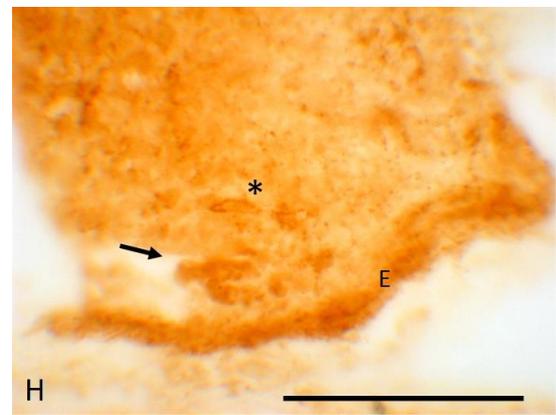
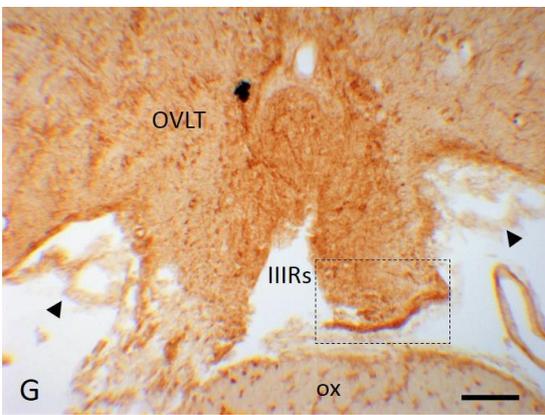
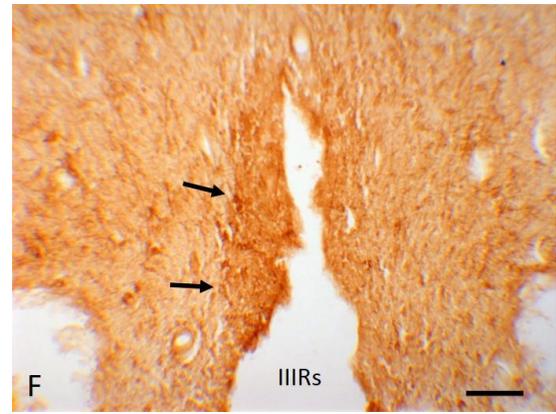
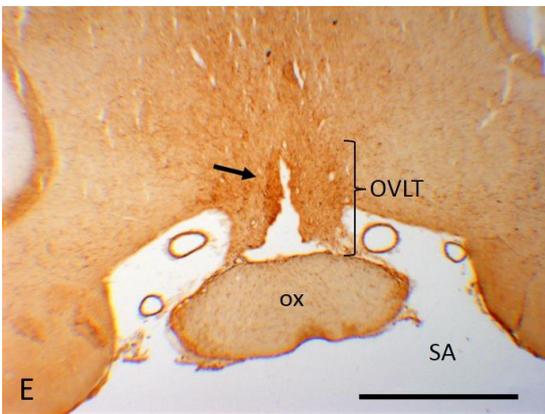
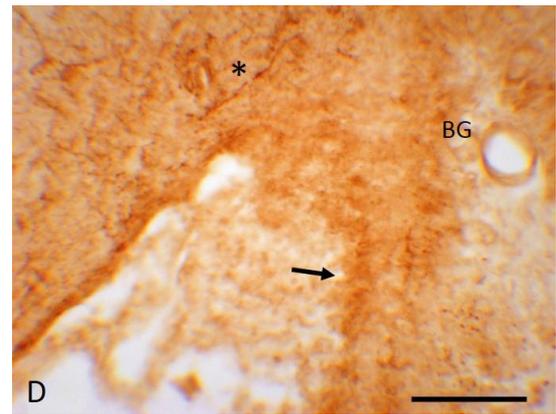
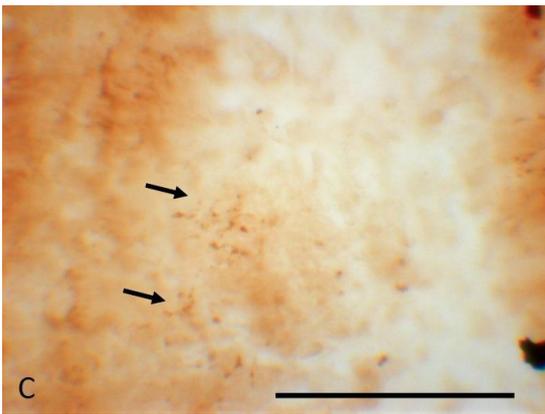
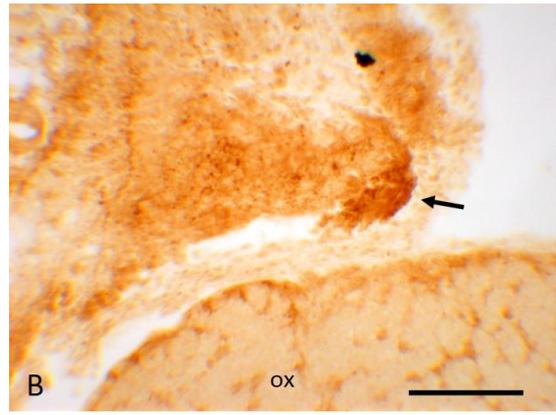
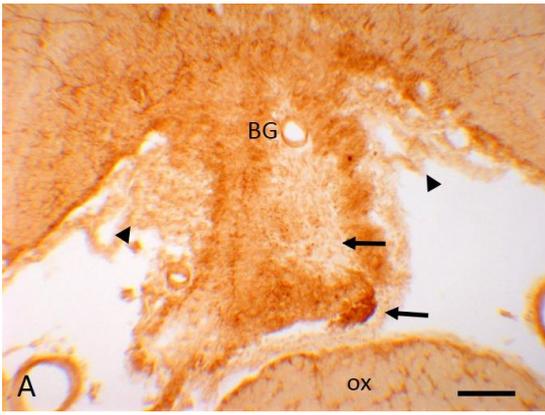
---

### Fig. 10 Immunreaktivität gegen TLR2 im OVLT

**A** Schnitt auf Höhe des OVLT, ventraler Anteil **B** Vergrößerung des OVLT aus **A** **C** Höchste Vergrößerungsstufe in der Mitte des OVLT aus **A** **D** Vergrößerung aus **A** des oberen linken Schenkels mit Übergang zum Hirnparenchym **E** Schnitt auf Höhe des OVLT, weiter dorsal mit Recessus supraopticus **F** Vergrößerung des OVLT aus **E** **G** Schnitt auf Höhe des OVLT mit Recessus supraopticus **H** Vergrößerung des OVLT aus **G** mit der unteren ependymalen Begrenzung

OVLT = Organum vasculosum laminae terminalis, IIRs = Recessus supraopticus, BG = kleines Blutgefäß, E = Ependymzellen, ox = Chiasma opticum, SA = Subarachnoidalraum, gestrichelte Linie = Grenze der Ausschnittvergrößerungen im Folgebild, ← = TLR2-immunreaktive Zellen, \* = Perikaryen, ◀ = Pia mater

Maßstabsbalken in allen Bildern = 100 µm



#### 6.4.2 TLR4-Immunreaktivität im OVLT

Das Organum vasculosum laminae terminalis tritt durch seine exponierte Lage über dem Chiasma opticum und seine verstärkte Immunfärbung im Vergleich zum umliegenden Gewebe deutlich hervor. Bei Vergrößerung (Fig. 11 B-D) fallen die stark TLR4-reaktiven Blutgefäße sowie die kleineren Kapillaren ins Auge. Das OVLT ist in diesem Bereich stark vaskularisiert. Eine eindeutige gliale Abgrenzung zum Subarachnoidalraum ist hier nicht auszumachen. Lediglich eine verstärkte Tingierung in allen Randbereichen lateral des, sowie zum Recessus supraopticus und nach superior sind zu erkennen.

Betrachtet man einige Schnitte weiter dorsal (Fig. 11 E, F), so fällt der größere Recessus supraopticus auf, der eine Ausstülpung des dritten Ventrikel ist. Um diesen Recessus ist die Immunfärbung stärker, während sie in den Randbereichen des Organs kaum vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden ist. Auch hier fällt bei Vergrößerung (Fig. 11 F) auf, dass das Blutgefäß stark reaktiv ist. Ebenso stellen sich vereinzelte Fasern dar.

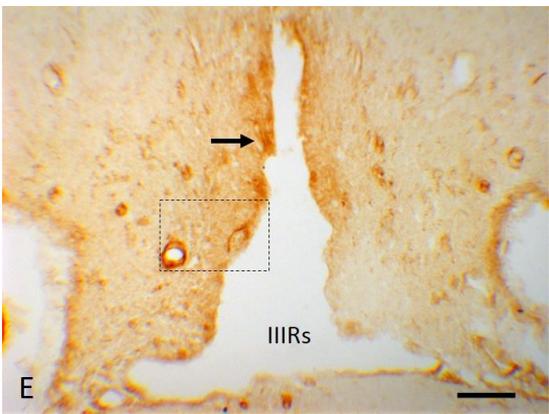
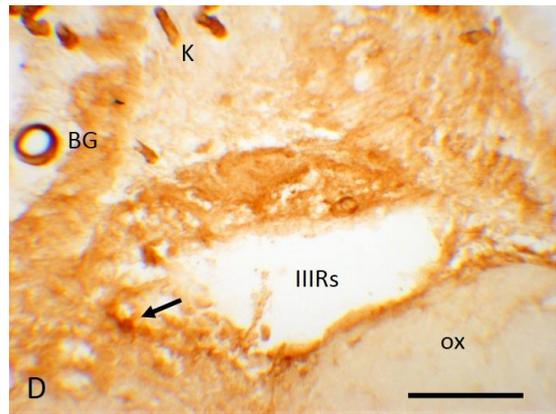
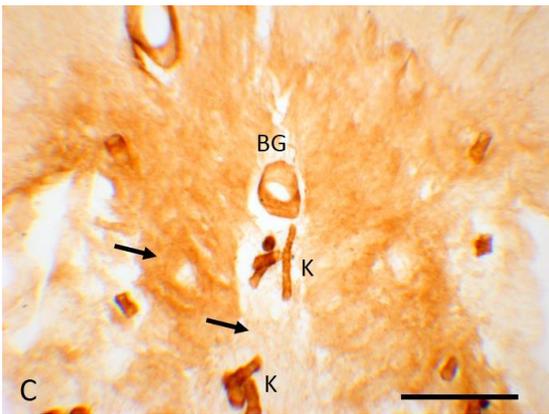
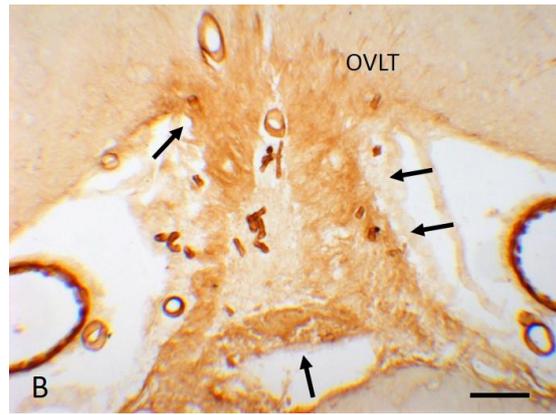
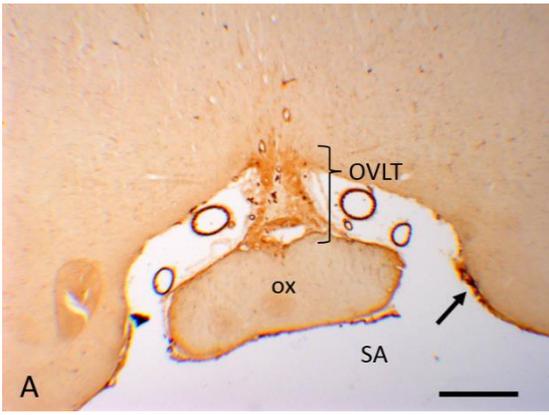
---

#### **Fig. 11 Immunreaktivität gegen TLR4 im OVLT**

**A** Schnitt auf Höhe des OVLT **B** Vergrößerung des OVLT aus **A** **C** Oberer Anteil des OVLT aus **A** **D** Unterer Anteil aus **A** mit Anteil von Recessus supraopticus **E** Schnitt auf Höhe des OVLT, dorsaler Anteil mit Recessus supraopticus **F** Vergrößerung der links-lateralen ependymalen Seite des OVLT mit stark gefärbtem Blutgefäß aus **E**

OVLT = Organum vasculosum laminae terminalis, IIRs = Recessus supraopticus, BG = kleines Blutgefäß, K = Kapillaren, ox = Chiasma opticum, SA = Subarachnoidalraum, gestrichelte Linie = Grenze der Ausschnittvergrößerung im Folgebild, ← = TLR2-immunreaktive Zellen, \* = Faserprofil einer Gliazelle

Maßstabsbalken in Bild **A** = 500 µm, in den Bildern **B-F** = 100 µm



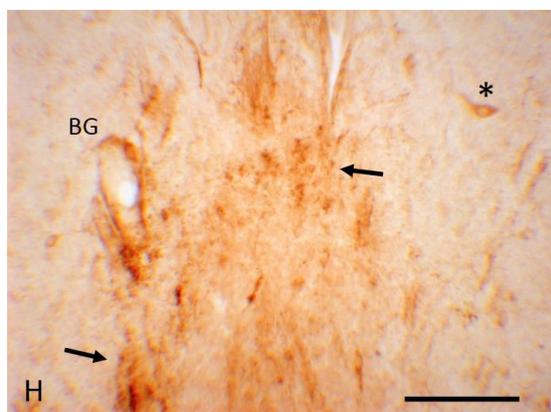
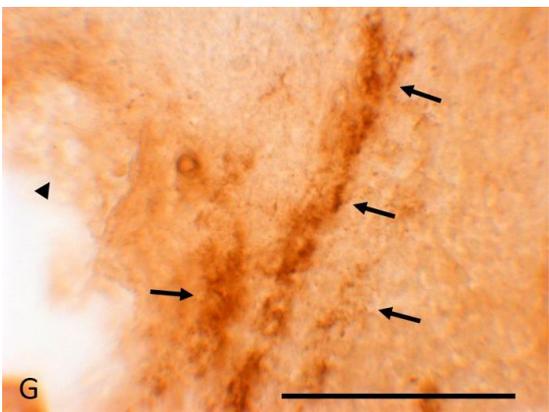
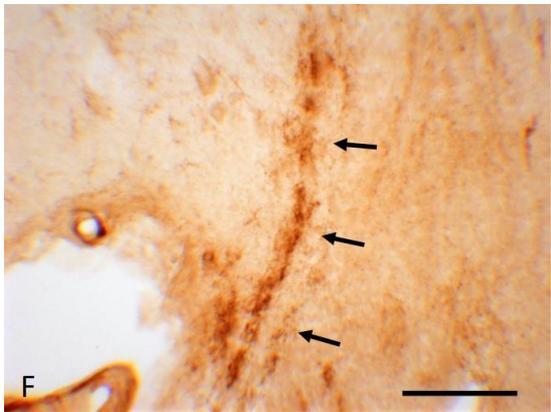
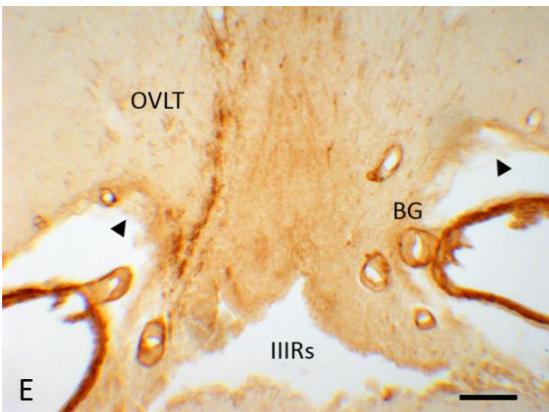
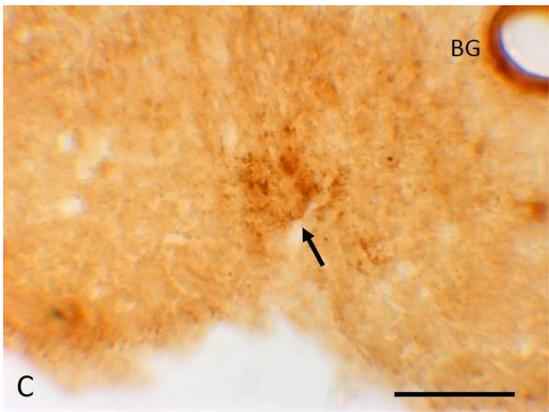
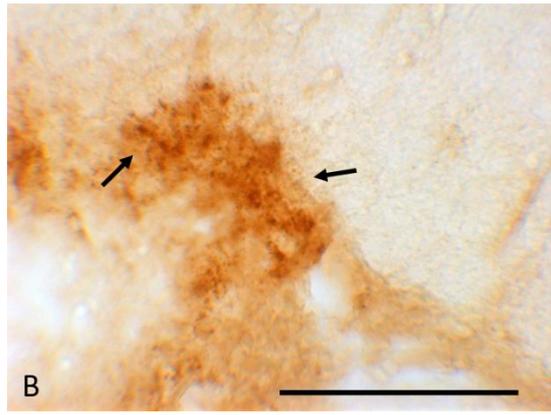
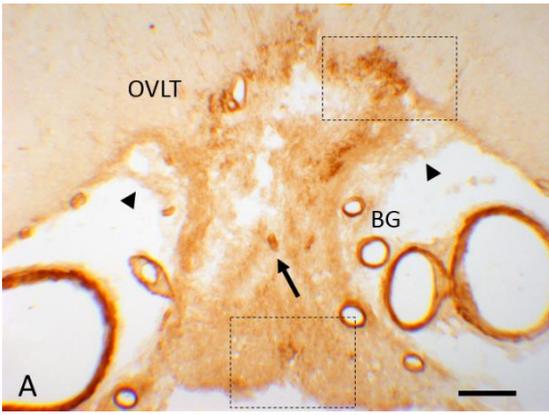
Markant sind die umliegenden und in dem OVLT verlaufenden Blutgefäße und Kapillaren, die deutlich tingiert hervortreten. Vereinzelt zeigt sich eine Anhäufung von stark gefärbten Granula (Fig. 12 B, C, G). Auch hier ist das Innere des OVLT schwach gefärbt, fast leer (Vergleich Fig. 11 B mit Fig. 12 A).

---

**Fig. 12 Immunreaktivität gegen TLR4 im OVLT**

**A** Schnitt auf Höhe des OVLT, anteriorer Bereich **B** Vergrößerung des OVLT aus **A**  
**C** Vergrößerung des OVLT aus **A** **D** Vergrößerung des linken Schenkels mit Übergang zum Hirnparenchym **E** Schnitt auf Höhe des OVLT, weiter dorsal mit Recessus supraopticus auf Höhe des SFO **F** Vergrößerung aus **E** mit deutlich sichtbaren Granula **G** Vergrößerung aus **E**, oberer Anteil des OVLT **H** Vergrößerung aus **E**, oberster Anteil des OVLT mit Perikaryon und Blutgefäß

OVLT = Organum vasculosum laminae terminalis, IIRs = Recessus supraopticus, BG = kleines Blutgefäß, K= Kapillare, EP = Ependymzellen, ox = Chiasma opticum, SA = Subarachnoidalraum, gestrichelte Linien = Grenzen der Ausschnittvergrößerungen im jeweiligen Folgebild, ← = TLR4-immunreaktive Zellen, \* = Perikaryon, ◀ = Pia mater  
Maßstabsbalken in den Bildern A-B, D-H = 100 µm, in dem Bild C = 50 µm



## 7 Diskussion

Mit der vorliegenden Dissertation wird die Verteilung von Toll-like Rezeptoren vom Typ 2 und Typ 4 im Hirn von Ratten, insbesondere entlang des Ventrikelsystems untersucht. Neben dem Subcommissuralorgan, das im Zentrum der Arbeit steht, wurde die Analyse auf das Organum vasculosum laminae terminalis, das Subfornicalorgan sowie der Plexus choroideus ausgewertet. Ebenfalls wurde das Ependym des dritten Ventrikels analysiert. Die Epiphyse und Area postrema konnten nicht untersucht werden, da sie während der Präparation durch ihre periphere Lage nicht erhalten waren und aufgrund ihrer spezifischen Funktion nicht im Focus der Untersuchung standen. Die circumventriculären Organe standen im Zentrum der Studie, da sie aufgrund der offenen Blut-Hirn-Schranke eine mögliche Zugangspforte für Pathogene in das Gehirn darstellen und hier eine effektive antibakterielle/ -virale Aktivität vermutet werden kann.

Durch die offene Blut-Hirn-Schranke besteht eine stete Kommunikation des ZNS mit der Peripherie. Dies bedeutet aber auch, dass ein Eindringen von Pathogenen potentiell möglich ist. Ein breites Spektrum von TLRs ist auf Immunzellen wie Makrophagen, Astrozyten und Mikrogliazellen exprimiert, aber ebenso auf Nicht-Immunzellen wie Epithel- und Endothelzellen, um vielerorts, aber insbesondere in den CVOs auf Krankheitserreger reagieren zu können <sup>101</sup>. In den Immun-Trägerzellen lösen die durch PAMPs aktivierten TLRs eine Signalkaskade aus, die der Infektionsabwehr dient. So wird die NADPH-Oxidase durch TLR-aktivierte Makrophagen, Mikroglia und Granulozyten stimuliert. Die NADPH-Oxidase ist ein Enzym, welches im Phagosom molekularen Sauerstoff zu reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) umwandelt <sup>102</sup>. Diese vermehrte Sauerstoffradikalfreisetzung, die als "respiratory burst" bezeichnet wird, ist zur Abtötung der phagozytierten Pathogene notwendig. Werden ROS extrazellulär freigesetzt, kommt es zum Untergang von Neuronen. Dies wurde in Neuronen-Mikroglia-Cokulturen nachgewiesen, in denen die entzündliche Stimulation von Mikroglia zum Verlust lebensfähiger Neurone durch Phagozytose führt <sup>103</sup>. Auch Stickstoffmonoxid (NO), ein bioaktives Molekül, welches durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) aus L-Arginin synthetisiert wird, ist ein entscheidendes zytotoxisches Molekül. Die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) wird durch proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) reguliert.

Es gibt Hinweise darauf, dass die lokalisierte Aktivierung von TLR4 in BHS-assoziierten Makrophagen und Mikroglia eine "Welle" der Mikroglia-Aktivierung auslösen kann, die sich im Hirnparenchym ausbreiten <sup>104</sup>. Interessant ist, dass in der vorliegenden Studie neben Neurogliaelementen auch TLR-immunreaktive Mikroglia nachgewiesen werden konnten.

Lipopolysaccharide sind die Hauptmasse der gram-negativen bakteriellen Endotoxine, die möglichst vor der Schädigung von Neuronen eliminiert werden sollten. Kommt es zu einer LPS-Exposition und einer TLR4 Aktivierung, so folgt ein Untergang von Oligodendrozyten sowie die Demineralisation und erhöhte Verletzlichkeit von Neuronen, aber auch einer Mikroglia-Aktivierung <sup>105 106</sup>. Eine Exposition von *Gruppe B Streptococcus* (einer der Hauptursachen von bakterieller Meningitis) oder *S. pneumoniae* Serotyp 2 (beide gram-positiv) zeigt über TLR2 Aktivierung eine neuronale Apoptose durch Aktivierung des MyD88-abhängigen Wegs <sup>107 108</sup>. Bekannt ist, dass gerade die Spirochaete *Borrelia burgdorferi* (*Bb*) die mehrzähligen bakteriellen Encephalitiden, die sogenannte Lyme-Borreliose auslöst <sup>76</sup>. Generell sind ZNS-Infektionen durch gram-positive Bakterien signifikant häufiger. Ob dies an einer größeren Dichte von TLR4 liegen könnte, die sich in der vorliegenden Analyse stets andeutete, ist jedoch eher Spekulation. Diese Bakteriengruppen gelangen glücklicherweise ausgesprochen selten in das Milieu des Zentralnervensystems. Gelangen sie dennoch in den Liquor cerebrospinalis oder das Hirngewebe, so sind schwere Meningitiden und Encephalitiden die Folge. Relativ öfter gelangen Viren in das ZNS-Milieu, sie aktivieren jedoch abhängig vom Nucleinsäure-Typ der Viren – TLR3, 7 oder 9.

Eindringende Pathogene können, wie oben beschrieben, schwere neuronale Schädigungen hervorrufen, von denen sich das ZNS nicht erholen kann. Ein frühzeitiges Abfangen dieser Krankheitserreger ist daher von größter Wichtigkeit. Da TLRs auch auf nicht-Immunzellen wie Endothel-/ Epithelzellen sitzen, lässt sich in den CVOs vermuten, dass die TLRs hier die Barrierefunktion regulieren, ohne dass die ausgelöste Signalkaskade zu einem Neuronenverlust führt. Die Epithelzellen „opfern“ sich gewissermaßen zugunsten des Neuronenerhalts. Man könnte TLRs auch als Meßfühler der Eingangspforten von der Peripherie zum ZNS beschreiben.

## 7.1 Das Subcommissuralorgan

Nach den Überlegungen in der Einleitung zu dieser Arbeit, könnte das Subcommissuralorgan unter den circumventriculären Organen ein geeigneter Kandidat sein, TLRs zu exprimieren und gemeinsam mit dem klebrig-adhäsiven Material des Reissner'schen Fadens Bakterien zu binden und zu bekämpfen. Das Vorkommen von TLR2 und TLR4 erhärtet diese Hypothese, wobei die höhere Dichte von TLR4 dafür spricht, dass die Abwehrmechanismen von gram-negativen Bakterien bevorzugt entwickelt sind.

Generell konnten immunhistochemisch TLR2 und TLR4 im Subcommissuralorgan und in seinen angrenzenden Gewebeformationen nachgewiesen werden. Das Reaktivitätsmuster von TLR2 und TLR4 ist im SCO allerdings sehr unterschiedlich. So stellt sich bei der immunhistochemischen Untersuchung die Reaktivität von TLR2 im Vergleich zu TLR4 deutlich abgeschwächt dar. Betrachtet man die TLR2-Immunfärbung (Fig. 1A-C), so sind die ependymalen SCO Zellen nur schwach immunreaktiv. Die Ependymzellen des dritten Ventrikels heben sich jedoch am lateralen Dach des dritten Ventrikels und an dessen Rand deutlich stärker vom SCO und seinem Umgebungsgewebe ab. Es fällt auf, dass die Reaktivität dort am stärksten ist, wo das SCO in Kontakt zu den Ependymzellen des dritten Ventrikels steht (Fig. 1C, 2E). Die TLR4 Immunfärbung (Fig. 3A, C, E-F) ist im SCO stärker ausgeprägt als die TLR2-Färbung. Die ependymalen Zellen des SCO zeigen apikal eine erhöhte Konzentration von TLR4-haltigem Granula und lassen sich so von den basal liegenden hypendymalen Zellen abgrenzen. Zudem prominiert auch hier die Tingierung von Ependymzellen der Ventrikelwand markant hervor (Fig. 3B, 4E). Während TLR2 der Erkennung multipler Bestandteile gram-positiver Bakterien, wie Peptidoglycan und Lipoteichonsäure dient <sup>109</sup>, ist der Hauptligand für TLR4 das Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien <sup>110</sup>.

In beiden Befunden (Fig. 1+2 vs. 3+4) zeigt sich die Commissura posterior ungefärbt, während die Nuclei pretectales, welche von der posterioren Kommissur verbunden werden, durch die Färbung zahlreicher Faserprofile hervortreten. Unter den gefärbten Strukturen fallen insbesondere tanyzytenartige Zellen mit radiär verlaufenden Faserprofilen auf. Jedoch sind auch andere Gliafasern sowie einige Nervenfasern TLR-immunreaktiv. Im Nucleus pretectales erfolgt die Verschaltung optokinetischer Reflexe. Besonders deutlich sind die Fasern der Nuclei in Fig. 2 B und C der TLR2-Färbung.

## 7.2 Der Reissner'sche Faden

Die Fragestellung, ob am Reissner'schen Faden TLR-Typen angeheftet sind, ließ sich nicht positiv beurteilen. Leider waren nicht in allen Präparaten Anschnitte des Reissner'schen Fadens erkennbar. Dies könnte bedeuten, dass aufgrund der relativ geringen Anzahl auswertbarer Anschnitte des Reissner'schen Fadens eine Anhaftung von TLR an den Faden durchaus möglich ist, jedoch nicht detektiert werden konnte. Da jedoch in den vorhandenen Anschnitten absolut keine Tingierung beobachtet werden konnte, spricht alles dafür, dass keine TLR-Typen angeheftet sind.

Bereits 1958 nahm Ragnar Olsson an<sup>111</sup>, dass der Reissner'sche Faden, der hauptsächlich aus negativ geladenen sialinsäurehaltigen Glykoproteinen (Sialoglykoproteinen) besteht, zur Reinigung der Liquorflüssigkeit befähigt ist. In den 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass der RF die Neurotransmitter Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin bindet und im Sinne einer „Entgiftung der Liquorflüssigkeit wirkt“<sup>112 113</sup>. Dies könnte bedeuten, dass die Eigenschaften der Glykoproteine als Adhäsionsmoleküle spezialisiert genug ist, körpereigene „Abfallstoffe“ zu binden und durch einen steten Fluss aus dem Liquor nach kaudalwärts abzutransportieren, wo der Abbau in der Ampulla caudalis erfolgt. Dieser Entsorgungsweg für Pathogene sollte ebenso diskutiert werden. Wird zum Beispiel die Elimination von LPS betrachtet, welches ein Zellbestandteil gram-negativer Bakterien ist, so ist ein Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) nötig, welches das LPS bindet und zu zellulären Rezeptoren transportiert, um das angeborene Immunsystem zu aktivieren. Das LBP gehört zur Gruppe der Glykoproteine<sup>114</sup> und ist ebenso ein Adhäsionsmolekül. Anstatt der in der Körperperipherie üblichen Bindung von LPS an LBP könnte diese Bindungsaufgabe im Liquor cerebrospinalis vom Reissner'schen Faden beziehungsweise dessen Glykoproteinen übernommen werden. Dies bedeutet eine rein mechanische Elimination von Pathogenen aus dem Liquor, ohne eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems auszulösen. Die Vermeidung einer Immunantwort hätte zum Vorteil, dass eine Entzündungsreaktion im ZNS vermieden würde.

Aufgrund der schlechten Regenerationseigenschaft des neuronalen Gewebes führt eine Entzündungsreaktion zu einem irreversiblen Neuronenverlust. Neurone reagieren überaus empfindlich auf Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen, die bei Entzündungsprozessen freigesetzt werden<sup>115</sup>. Zudem ist die Regenerationsfähigkeit des ZNS durch gliale Inhibition von axonalem Wachstum stark eingeschränkt<sup>116,117</sup>. Das ZNS

könnte durch die Eigenschaften des Reissner'schen Fadens also Pathogene eliminieren und eine Immunreaktion vermeiden. Denkbar ist jedoch auch, dass der Reissner'sche Faden die LPS-Moleküle sukzessive an TLRs überträgt und die übliche immunologische Kaskade im vierten Ventrikel oder im Rückenmark abläuft.

All diese Überlegungen beziehen sich jedoch nur auf Wirbeltierarten, nicht aber auf den Menschen, da das SCO und der von ihm gebildete Reissner'sche Faden bei Hominiden nur embryonal und fetal angelegt ist.

### **7.3 Das OVLT**

Das Organum vasculosum laminae terminalis ist eines der vier sensorischen circumventriculären Organe. Die Lamina terminalis ist eine dünne Gewebsplatte zwischen dem Chiasma opticum und der Commissura anterior, und bildet die vordere (telencephale) Wand des dritten Ventrikels. Das OVLT ist, wie der Name gut beschreibt, ein stark vaskularisiertes Organ, das von verschiedenen Kapillarplexus durchzogen ist und gefenestertes Endothel aufweist <sup>118</sup>. Es steht mit dem äußeren und dem inneren Liquorsystem in Verbindung. Dadurch ist es von besonderem Interesse, um die TLR Verteilung genauer zu beleuchten. Sowohl TLR2 als auch TLR4 konnten immunhistochemisch im OVLT nachgewiesen werden. Interessant ist, dass sich das Reaktivitätsmuster stark unterscheidet. Betrachtet man die Figuren 10, 11 und 12 erkennt man die gute Vaskularisierung des OVLTs. Die TLR-Immunfärbung unterscheidet sich jedoch stark auf Gefäßebene. Die TLR2-Färbung zeigt zwar Gefäße, diese heben sich jedoch kaum vom umgebenden Organum ab (Fig. 10 A).

TLR4 zeigt vor allem Immunreaktivität in den Gefäß- und Kapillarendothelien. So treten die Gefäße und Kapillaren deutlich vom Gewebe des OVLT hervor (Fig. 11 B, 12 E). Die TLR4-Reaktivität ist dort am stärksten, wo das OVLT in Verbindung mit dem Blutkreislauf steht. Zu allen Seiten hebt sich das OVLT vom Umgebungsgewebe ab, was vor allem durch starke Färbung entlang einer Linie am oberen Rand des Organs (Fig. 12 B), sowie an dessen seitlichen Rand (Fig. 12 E und F) und am Recessus supraopticus (Fig. 11D) sichtbar wird. Das Parenchym des OVLTs scheint im Inneren fast nicht reaktiv. Die Pathogenabwehr findet also nur an den Endothelien und den Randbereichen des OVLT statt, wo sich offenbar die in das Gehirn vorgelagerte Blut-Hirn-Schranke befindet.

#### **7.4 Das SFO**

Das Subfornicalorgan ist ein weiteres der vier sensorischen circumventriculären Organe und liegt unterhalb des Fornix am Dach des rostralen dritten Ventrikels, dorsal der anterioren Commissur. Es ragt leicht in den dritten Ventrikel hinein und weist einen Kernbereich und eine periphere Außenzone mit unterschiedlichen neuronalen Projektionen und Ligandenbindungsfähigkeiten auf. Das SFO sendet sowohl direkte (monosynaptische) als auch indirekte (polysynaptische) efferente Projektionen an die paraventriculären und supraoptischen Kerne des Hypothalamus.

Auch im SFO war eine Immunreaktivität gegen TLR2 und -4 erkennbar. Während bei TLR4 eher die Blutgefäße des Randbereichs des SFO tingiert sind, sind bei TLR2 Granula tingiert, die in Verbindung mit den kleinen Kapillaren im Inneren des SFO stehen. Eine Notwendigkeit der TLR Präsentation scheint bei beiden Färbungen jedoch nicht im Randbereich des Organs zu liegen, sondern eher im Zentrum. Dies spricht dafür, dass keine Auseinandersetzung von Pathogenen am Randbereich zum Hirnparenchym oder zum Ventrikelsystem notwendig ist. Dies kann auch bedeuten, dass bestimmte sensorische Signale (z.B. Angiotensin II) nur Eingang über die Blutgefäße finden.

#### **7.5 Der Plexus choroideus**

Der Plexus choroideus produziert einen erheblichen Teil des Liquor cerebrospinalis und bildet einen Abschnitt der Blut-Hirn-Schranke. Er liegt im Dach des dritten und vierten Ventrikels sowie in den Seitenventrikeln. Gebildet wird der Plexus aus Einstülpungen der Pia mater, die von Ependymzellen umgeben sind und zahlreiche Blutgefäße enthält.

Die Fig. 5-7 zeigen sehr deutliche Immunreaktivität von TLR2 und TLR4. Auch hier kommt TLR4, wie auch bei dem SFO und dem OVLT, gehäuft an den Endothelwänden vor. Die den Liquorraum umgebenden Ventrikelwände sind allseits stark tingiert, im Sinne einer ependymalen Barriere.

## 7.6 Ausblick

Zusammenfassend konnte die Arbeit zeigen, dass die TLR2 und TLR4 im Sinne einer Barriere an den Oberflächen von Gefäßlumina zu umgebenden perivaskulären Geweben der CVOs sowie anderen Ventrikelendymen und Versiegelungen gegenüber dem umliegenden Neuropil vorkommen.

Hier sind die Toll-like Rezeptoren gut platziert, um entsprechende Substrate und Pathogene im Falle eines Eindringens direkt abzufangen und eine entsprechende Reaktion einzuleiten. Die TLRs vermitteln dabei weniger über die entzündliche Reaktionsachse, sondern über die apoptotische Achse. So fangen vor allem die Epithel- und Endothelzellen, auf denen die TLRs sitzen, Pathogene einem „Burggraben ähnlich“ ab. Werden die Pathogene rechtzeitig eliminiert und ein weiteres Vordringen in neuronales Gewebe gestoppt, stellt dies eine potente neuroprotektive Strategie dar, um so Schädigungen von regenerationsunfähigen Neuronen zu verhindern.

Die nachgewiesenen Expressionen von TLR2 und TLR4 werfen weitere Fragen auf, die in Zukunft untersucht werden sollten: Welche Signalwege der Rezeptoren sind bei Eindringen von Pathogenen involviert? Besitzt der Reissner'sche Faden eine deutlich entscheidendere Rolle bei der Elimination von Pathogenen als bisher angenommen? Welche funktionelle Rolle spielen TLR2 und TLR4 in der neuronalen Entwicklung?

Da Viren relativ öfter im ZNS vorkommen als Bakterien, wäre es interessant die entsprechende TLR-Verteilung in den CVOs in zukünftigen Arbeiten zu untersuchen. Hier wären besonders die Verteilung der TLR3, TLR7/8 und TLR9 von Bedeutung.

Die Frage, welche Erkenntnisse hinsichtlich der Expression von Toll-like Rezeptoren im Gehirn aus dem Rattenmodell auf den Menschen übertragbar sind, muss im Rahmen weiterer Forschungen untersucht werden.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Hofer H. Zur Morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirnes der Säugetiere. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 1958:202-251.
2. Fry M, Ferguson AV. The sensory circumventricular organs: Brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiol Behav.* 2007;91(4):413-423. doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.003.
3. Krisch B, Leonhardt H, Buchheim W. The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res.* 1978;195(3):485-497.
4. Cottrell GT, Ferguson AV. Sensory circumventricular organs: Central roles in integrated autonomic regulation. *Regulatory Peptides.* 2004;117(1):11-23. doi:10.1016/j.regpep.2003.09.004.
5. Gross PM, Weindl A. Peering through the windows of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987;7(6):663-672. doi:10.1038/jcbfm.1987.120.
6. Roth J, Harre E-M, Rummel C, Gerstberger R, Hübschle T. Signaling the brain in systemic inflammation: Role of sensory circumventricular organs. *Frontiers in Bioscience.* 2004;(9):290-300.
7. Ferguson AV, Bains JS. Electrophysiology of the Circumventricular Organs. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 1996;17(4):440-475. doi:10.1006/frne.1996.0012.
8. Ferguson AV, Wall KM. Central actions of angiotensin in cardiovascular control: Multiple roles for a single peptide. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992;70(5):779-785. doi:10.1139/y92-103.
9. Jurzak M, Schmid HA. Vasopressin and sensory circumventricular organs. *Progress in Brain Research.* 1998;119:221-245. doi:10.1016/S0079-6123(08)61572-1.
10. McKinley MJ, Allen AM, Burns P, Colvill LM, Oldfield BJ. Interaction of circulating hormones with the brain: The roles of the subfornical organ and the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 1998;25(S1):61-67. doi:10.1111/j.1440-1681.1998.tb02303.x.
11. McKinley MJ, Allen AM, May CN, et al. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2001;28(12):990-992. doi:10.1046/j.1440-1681.2001.03592.x.
12. Bishop VS, Hay M. Involvement of the Area Postrema in the Regulation of Sympathetic Outflow to the Cardiovascular System. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 1993;14(2):57-75. doi:10.1006/frne.1993.1003.

13. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological Reviews*. 1998;78(3):583-686. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.583.
14. Iovino M, Steardo L. Vasopressin release to central and peripheral angiotensin II in rats with lesions of the subfornical organ. *Brain Res*. 1984;322(2):365-368. doi:10.1016/0006-8993(84)90135-5.
15. Knepel W, Nutto D, Meyer DK. Effect of transection of subfornical organ efferent projections on vasopressin release induced by angiotensin or isoprenaline in the rat. *Brain Res*. 1982;248(1):180-184. doi:10.1016/0006-8993(82)91161-1.
16. Ferguson AV, Day TA, Renaud LP. Subfornical organ efferents influence the excitability of neurohypophyseal and tuberoinfundibular paraventricular nucleus neurons in the rat. *Neuroendocrinology*. 1984;39(5):423-428. doi:10.1159/000124015.
17. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, et al. *Physiologie*. 6., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010. <http://ebooks.thieme.de/9783137960065>.
18. Joly J-S, Osório J, Alunni A, Auger H, Kano S, Rétaux S. Windows of the brain: Towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(4):512-524. doi:10.1016/j.semcdb.2007.06.001.
19. Oksche A. Vergleichende Untersuchungen über die sekretorische Aktivität des Subkommissuralorgans und den Gliacharakter seiner Zellen. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1961;54(5):549-612. doi:10.1007/BF00338913.
20. Rodriguez E, Oksche A, Hein S, Rodriguez S, Yulis R. Comparative immunocytochemical study of the subcommissural organ. *Cell Tissue Res*. 1984;237(3). doi:10.1007/BF00228427.
21. Olsson R. Reissner's Fiber in Ascidian Tadpole Larvae. *Acta Zoologica*. 1972;53(1):17-21. doi:10.1111/j.1463-6395.1972.tb00568.x.
22. Oksche A, Rodriguez EM, Fernandez-Llebrez P. *The subcommissural organ: An ependymal brain gland*. Berlin: Springer Verlag; 1993.
23. Schoebitz K, Garrido O, Heinrichs M, Speer L, Rodriguez EM. Ontogenetical development of the chick and duck subcommissural organ. An immunocytochemical study. *Histochemistry*. 1986;84(1):31-40. doi:10.1007/BF00493417.
24. Duvernoy HM, Risold P-Y. The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev*. 2007;56(1):119-147. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.06.002.
25. Dall'Aglio C, Ceccarelli P, Pascucci L, Brecchia G, Boiti C. Receptors for leptin and estrogen in the subcommissural organ of rabbits are differentially modulated by fasting. *Brain Res*. 2006;1124(1):62-69. doi:10.1016/j.brainres.2006.09.091.

26. Rodríguez EM, Rodríguez S, Hein S. The subcommissural organ. *Microsc Res Tech.* 1998;41(2):98-123. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19980415)41:2<98:AID-JEMT2>3.0.CO;2-M.
27. Møllgard K, Wiklund L. Serotonergic synapses on ependymal and hypendymal cells of the rat subcommissural organ. *J Neurocytol.* 1979;8(4):445-467. doi:10.1007/BF01214802.
28. Meiniel A. The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: Which role in hydrocephalus? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007;39(3):463-468. doi:10.1016/j.biocel.2006.10.021.
29. Meiniel O, Meiniel A. The complex multidomain organization of SCO-spondin protein is highly conserved in mammals. *Brain Res Rev.* 2007;53(2):321-327. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.09.007.
30. Lehmann W, Wagner U, Naumann WW. Multiple forms of glycoproteins in the secretory product of the bovine subcommissural organ - an ancient glial structure. *Acta Histochem.* 2001;103(1):99-112. doi:10.1078/0065-1281-00583.
31. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004;40(12):845-859. doi:10.1016/j.molimm.2003.10.005.
32. Gobron S, Creveaux I, Meiniel R, et al. Subcommissural organ/Reissner's fiber complex: Characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *Glia.* 2000;32(2):177-191. doi:10.1002/1098-1136(200011)32:2<177:AID-GLIA70>3.0.CO;2-V.
33. Lee K, Tan J, Morris MB, et al. Congenital hydrocephalus and abnormal subcommissural organ development in Sox3 transgenic mice. *PLoS ONE.* 2012;7(1):e29041. doi:10.1371/journal.pone.0029041.
34. Bouchaud C. Evidence for a multiple innervation of subcommissural ependymocytes in the rat. *Neuroscience Letters.* 1979;12(2-3):253-258. doi:10.1016/0304-3940(79)96071-3.
35. Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system: Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1964:1-55.
36. Murphy KP, Travers P, Walport M, et al. *Janeway Immunologie.* 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
37. Medzhitov R, Janeway jr. CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology.* 1997;(9):4-9.
38. Scheidegger E. Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Lysozym auf menschen- und tierpathogene Virusarten. *Archives of Virology.* 1940;1(3):394-403.
39. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters.* 2003;85(2):85-95. doi:10.1016/S0165-2478(02)00228-6.

40. Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology*. 2004;112(4):521-530. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01941.x.
41. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
42. Mortaz E, Adcock IM, Tabarsi P, et al. Pattern recognition receptors in immunodeficiency disorders. *Eur J Pharmacol*. 2017;808:49-56. doi:10.1016/j.ejphar.2017.01.014.
43. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway jr. CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-397. doi:10.1038/41131.
44. Medzhitov R, Janeway jr. CA. Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. 2000;173(1):89-97. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x.
45. Medzhitov R, Janeway jr. CA. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *American Association for the Advancement of Science*. 2002;296(5566):298-300.
46. Ott D, Murgott J, Rafalzik S, et al. Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res*. 2010;1363:93-106. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.083.
47. Medzhitov R, Janeway jr. CA. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology*. 2000;8(10):452-456. doi:10.1016/S0966-842X(00)01845-X.
48. Janeway jr. CA. Approaching the Asymptote? Evolution und Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biology*;1989(54):1-13. <http://www.jimmunol.org/content/191/9/4475.citation>.
49. Medzhitov R, Janeway jr. CA. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *American Association for the Advancement of Science*. 2002;296(5566):298-300. <http://www.jstor.org/stable/3076510>.
50. Pedraza ST, Betancur JG, Urcuqui-Inchima S. Viral recognition by the innate immune system: the role of pattern recognition receptors. 2010;41(4):377-387.
51. Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: The Induction of Polarity by the Toll Gene Product. *Cell*. 1985;(42):791-798.
52. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults. *Cell*;1996(86):973-983. <http://www.jimmunol.org/content/188/11/5210.citation>.

53. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-376. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
54. Bowie AG, Haga IR. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol.* 2005;42(8):859-867. doi:10.1016/j.molimm.2004.11.007.
55. Shi Z, Cai Z, Sanchez A, et al. A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem.* 2011;286(6):4517-4524. doi:10.1074/jbc.M110.159590.
56. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009;21(4):317-337. doi:10.1093/intimm/dxp017.
57. Chuang T-H, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001:157-161.
58. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863.
59. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: Gene structure, expression, and evolution. *European Cytokine Network.* 2000;11(3):362-371.
60. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A Family of Human Receptors Structurally Related to Drosophila Toll. *National Academy of Sciences.* 1998;95(2):588-593. <http://www.jstor.org/stable/44152>.
61. Xu Y, Tao X, Shen B, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature.* 2000;(408):111-115.
62. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology.* 2000;67:508-514.
63. Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: The Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:393-416. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.393.
64. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-260. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225.
65. Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2003;91(1):1-12. doi:10.1016/S0165-2427(02)00228-3.
66. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007;19(1):24-32. doi:10.1016/j.smim.2006.12.004.

67. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*. 2002;420(6913):324-329. doi:10.1038/nature01182.
68. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Signal Transduction in Endotoxin-Tolerized Mouse Macrophages: Dysregulation of Cytokine, Chemokine, and Toll-Like Receptor 2 and 4 Gene Expression. *The Journal of Immunology*. 2000;164(11):5564-5574. doi:10.4049/jimmunol.164.11.5564.
69. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(10):971-974. doi:10.1038/ni1004-971.
70. Rahman MM, McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog*. 2006;2(2):e4. doi:10.1371/journal.ppat.0020004.
71. Sun S-C, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NF- $\kappa$ B Controls Expression of Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ : Evidence for an Inducible Autoregulatory Pathway. *Science*. 1993;259(5103):1912-1915.
72. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF- $\kappa$ B. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):759-772. doi:10.1038/sj.cdd.4401838.
73. Kawai T, Akira S. TLR Signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2006;13(5):816-825.
74. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*. 2005;54(8):1182-1193. doi:10.1136/gut.2004.062794.
75. Blasius AL, Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Cell*. 2010;32(3):305-315. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012.
76. Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, et al. Inflammatory Signaling by *Borrelia burgdorferi* Lipoproteins Is Mediated by Toll-Like Receptor 2. *The Journal of Immunology*. 1999;163(5):2382-2386.
77. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like Receptor 2 Functions as a Pattern Recognition Receptor for Diverse Bacterial Products. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(47):33419-33425. doi:10.1074/jbc.274.47.33419.
78. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science*. 1999;285(5428):732-736.
79. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(25):17406-17409. doi:10.1074/jbc.274.25.17406.
80. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, et al. Cutting Edge: Preferentially the R-Stereoisomer of the Mycoplasmal Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells Through a Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent

- Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. 2000;164(2):554-557.  
doi:10.4049/jimmunol.164.2.554.
81. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity*. 1999;11(4):443-451. doi:10.1016/S1074-7613(00)80119-3.
  82. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001;2(4):346-352. doi:10.1038/86354.
  83. Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071-1082. doi:10.1016/j.cell.2007.09.008.
  84. Kang JY, Nan X, Jin MS, et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*. 2009;31(6):873-884. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.018.
  85. Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun*. 2005;73(3):1553-1560. doi:10.1128/IAI.73.3.1553-1560.2005.
  86. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005;433(7025):523-527. doi:10.1038/nature03253.
  87. Li J, Lee DSW, Madrenas J. Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol*. 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00347.
  88. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-2088. <http://www.jstor.org/stable/2897619>.
  89. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The Journal of Immunology*. 1999:3748-3752.
  90. Beutler B, Du X, Poltorak A. Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies. *Journal of Endotoxin Research*. 2001;7(4):277-280.
  91. Beutler B, Poltorak A. The sole gateway to endotoxin response: How LPS was identified as TLR4, and its role in innate immunity. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;29(4):474-478. <http://dmd.aspetjournals.org>.
  92. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999;189(11):1777-1782. doi:10.1084/jem.189.11.1777.

93. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000;1(5):398-401. doi:10.1038/80833.
94. Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, et al. Saccharomyces cerevisiae - and Candida albicans -Derived Mannan Induced Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by Human Monocytes in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. *Microbiology and Immunology.* 2002;46(7):503-512. doi:10.1111/j.1348-0421.2002.tb02727.x.
95. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse Toll-like Receptor 4-MD-2 Complex Mediates Lipopolysaccharide-mimetic Signal Transduction by Taxol. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(4):2251-2254. doi:10.1074/jbc.275.4.2251.
96. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276(13):10229-10233. doi:10.1074/jbc.M100099200.
97. Hsu S-M, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1981;29(11):1349-1353.
98. Naish SJ Dr., ed. *Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden.* 3. überarbeitete Auflage. Carpinteria, Kalifornien, USA: DAKO Corporation; 1997.
99. Giorno R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol.* 1984;2(3):161-166.
100. Graham Jr. RC, Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1966;14(4):291-302.
101. Bailey SL, Carpentier PA, McMahan EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(2):149-188.
102. Minakami R, Sumimoto H. Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family. *Int J Hematol.* 2006;84(3):193-198. doi:10.1532/IJH97.06133.
103. Neher JJ, Neniskyte U, Zhao J-W, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J Immunol.* 2011;186(8):4973-4983. doi:10.4049/jimmunol.1003600.
104. Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 2011;34(5):269-281. doi:10.1016/j.tins.2011.02.005.

105. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci.* 2002;22(7):2478-2486.
106. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(14):8514-8519. doi:10.1073/pnas.1432609100.
107. Hoffmann O, Braun JS, Becker D, et al. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol.* 2007;178(10):6476-6481. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6476.
108. Lehnardt S, Henneke P, Lien E, et al. A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia. *J Immunol.* 2006;177(1):583-592. doi:10.4049/jimmunol.177.1.583.
109. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11(4):443-451. doi:10.1016/S1074-7613(00)80119-3.
110. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999;162(7):3749-3752.
111. Olsson R. Studies in the subcommissural organ. *Acta Zoologica.* 1958;91(1):71-102. doi:10.1111/j.1463-6395.1958.tb00524.x.
112. Ermisch A, Sterba G, Hess J. Untersuchungen zur Klärung der Funktion des Reissnerschen Fadens. In-vitro-Bindung von Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin. *Experientia.* 1970;26(12):1319-1321.
113. Hess J, Sterba G. Studies concerning the function of the complex subcommissural organ-liquor fibre: The binding ability of the liquor fibre to pyrocatechin derivatives and its functional aspects. *Brain Res.* 1973;58(2):303-312.
114. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *The Journal of Experimental Medicine.* 1986;164(3):777-793. doi:10.1084/jem.164.3.777.
115. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *The Journal of Immunology.* 1992;149(8):2736-2741.
116. Goldberg JL, Barres BA. The Relationship between Neuronal Survival and Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 2000;(23):579-612.
117. Björklund A, Lindvall O. Self-repair in the brain. *Nature.* 2000;405(6789):893-895. doi:10.1038/35016175.
118. Sisó S, Jeffrey M, González L. Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2010;120(6):689-705. doi:10.1007/s00401-010-0743-5.

## 9 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Verteilung von TLR 2 und TLR 4 Rezeptoren  
in den circumventriculären Organen der Wistar Ratte  
- Speziell im Subcommissuralorgan –

in dem Institut für Anatomie II unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Frank Nürnberger mit Unterstützung durch Dr. Qian Zhang ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

## **10 Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Nürnberger für seine Unterstützung, die entgegengebrachte Geduld und seine fachlichen Ratschläge. Er hat mir diese Doktorarbeit ermöglicht und dabei viele Stunden investiert, um meine Arbeit zu korrigieren und Hilfestellungen zu geben. Dabei hatte er immer ein offenes Ohr für Fragen und stand mir konstruktiv zur Seite.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Qian Zhang bedanken, der mit Fachwissen meine Arbeit kompetent betreut hat. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen engsten Freunden, die mir stets moralischer Beistand waren. Insbesondere durch deren Unterstützung behielt ich meine Motivation und den Glauben an mich selbst bis zuletzt.

Danke!