

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

DISSERTATION

**Die Expression von Toll-like Rezeptoren bei der Entwicklung des
Mausgehirns**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin
Berlin

von

David Kaul

aus Frankfurt am Main

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. S. Lehnardt
2. Prof. Dr. rer. nat. U. K. Hanisch
3. Prof. Dr. med. R. Nitsch

Datum der Promotion: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einführung	3
2.1	Die Rolle von Toll bei der Entwicklung des Taufliegenembryos	3
2.2	Die Rolle von Toll bei der angeborenen Immunität der Taufliege	4
2.2.1	Die Toll-Signalkaskade bei der Immunantwort der Taufliege	5
2.3	Die Rolle von Toll-like Rezeptoren im Säugetier	5
2.4	Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	6
2.5	Die Struktur von Toll-like Rezeptoren	7
2.6	Toll-like Rezeptoren-assoziierte Signalkaskaden	8
2.7	Die Rolle von Toll-like Rezeptoren im zentralen Nervensystem	8
2.8	Fragestellung	13
3	Materialien und Methoden	15
3.1	Molekularbiologische Methoden	15
3.1.1	RNA-Präparation	15
3.1.1.1	Reagenzien und Geräte	15
3.1.1.2	Protokoll	15
3.1.2	DNase-Verdau	16
3.1.2.1	Reagenzien und Geräte	16
3.1.2.2	Protokoll	16
3.1.3	Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	17
3.1.3.1	Reagenzien und Geräte	17
3.1.3.2	Protokoll	17
3.1.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	17
3.1.4.1	Reagenzien und Geräte	17
3.1.4.2	Protokoll	18
3.1.5	Quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR)	18
3.1.5.1	Reagenzien und Geräte	18
3.1.5.2	Protokoll	19
3.1.6	Statistische Auswertung	20
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	20
3.1.7.1	Reagenzien und Geräte	20
3.1.7.2	Protokoll	20
3.1.8	Midipräparation von Plasmid-DNA	20
3.1.8.1	Reagenzien und Geräte	20
3.1.8.2	Protokoll	21
3.1.9	Transfektion von Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen	21
3.1.9.1	Reagenzien und Geräte	21
3.1.9.2	Protokoll	21
3.1.10	Durchflusszytometrie von primären Neuronen und Mikroglia	22
3.1.10.1	Reagenzien und Geräte	22
3.1.10.2	Protokoll	22
3.2	Histologische Techniken	23
3.2.1	Anfertigung von Kryostatschnitten	23
3.2.1.1	Reagenzien und Geräte	23
3.2.1.2	Protokoll	23
3.2.2	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	23
3.2.2.1	Reagenzien und Geräte	23
3.2.2.2	Protokoll	25

3.2.2.2.1 „Tailing“ von Oligonukleotiden.....	25
3.2.2.2.2 Prähybridisierung	25
3.2.2.2.3 Hybridisierung mit NBT/BCIP	26
3.2.2.2.4 Hybridisierung mit Fast Red	26
3.2.2.2.5 Mikroskopische Auswertung.....	27
3.2.3 Transkardiale Perfusion und Präparation der Gehirne für die Immunhistochemie	27
3.2.3.1 Reagenzien und Geräte.....	27
3.2.3.2 Protokoll.....	27
3.2.4 Anfertigung von Vibratomschnitten	27
3.2.4.1 Reagenzien und Geräte.....	27
3.2.4.2 Protokoll.....	28
3.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen	28
3.2.5.1 Reagenzien und Geräte.....	28
3.2.5.2 Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung an Vibratomschnitten	29
3.2.5.3 Protokoll für die 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung an Vibratomschnitten.....	29
3.2.5.4 Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen.....	29
3.2.5.5 Protokoll für das Immunostaining von Fast Red-gefärbten Kryostatschnitten nach <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	30
3.2.5.6 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	30
3.2.5.6.1 Konfokale Mikroskopie.....	30
3.3 Zellkultur	31
3.3.1 Herstellung primärer Neuronenkulturen.....	31
3.3.1.1 Reagenzien und Geräte.....	31
3.3.1.2 Protokoll.....	31
3.3.2 Herstellung primärer Mikrogliaulturen.....	32
3.3.2.1 Reagenzien und Geräte.....	32
3.3.2.2 Protokoll.....	32
3.3.3 Kultivierung und neurale Induktion der P19 (EC)-Zellreihe.....	33
3.3.3.1 Reagenzien und Geräte.....	33
3.3.3.2 Protokoll.....	33
3.3.4 Kultivierung von Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen.....	33
3.3.4.1 Reagenzien und Geräte.....	33
3.3.4.2 Protokoll.....	34
3.3.5 Stimulation von primären Neuronen mit TLR7-Liganden	34
3.3.5.1 Reagenzien und Geräte.....	34
3.3.5.2 Protokoll.....	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Die Expression von Toll-like Rezeptoren auf mRNA-Ebene im Mausgehirn während der Entwicklung.....	35
4.1.1 Expressionsanalyse mittels Real-Time-PCR	35
4.1.2 Expressionsanalyse mittels <i>In-situ</i> -Hybridisierung	37
4.1.3 Expressionsanalyse mittels <i>In-situ</i> -Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung.....	39
4.2 Expressionsanalyse von TLR7- und TLR9-Protein im Mausgehirn während der Entwicklung.....	41
4.2.1 Spezifität der angewendeten TLR7- und TLR9-Antikörper.....	41
4.2.2 Expressionsanalyse von TLR7-Protein im Mausgehirn während der Entwicklung <i>in vivo</i>	43
4.2.3 Expressionsanalyse von TLR7-Protein in Axon-ähnlichen Strukturen <i>in vivo</i>	45

4.2.4 Expressionsanalyse von TLR9-Protein im Mausgehirn während der Entwicklung <i>in vivo</i>	49
4.3 Expressionsanalyse von TLR7- und TLR9-Protein in kortikalen Neuronen <i>in vitro</i>	51
4.3.1 Analyse mittels Immunfluoreszenzfärbung	51
4.3.2 Analyse mittels Durchflusszytometrie	52
4.4 Expression von TLR7- und TLR9-mRNA im Modell der neuralen Induktion	54
4.5 Der Effekt von synthetischen TLR7-Liganden auf kortikale Neurone <i>in vitro</i>	55
5 Diskussion	57
5.1 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext bisheriger Veröffentlichungen	57
5.1.1 Die Expression der Toll-like Rezeptoren 7 und 9 in Neuronen	58
5.1.2 Expression von TLR7 und TLR9 bei der Entwicklung des Gehirns	59
5.1.3 Toll-like Rezeptoren in der Neurogenese	60
5.1.4 TLR7- und TLR9-defiziente Mäuse	62
5.1.5 Toll-like Rezeptoren im ZNS als Zielstrukturen für die Medikamentenentwicklung	62
5.2 Ausblick	63
6 Zusammenfassung	65
Bibliographie	68
Erklärung an Eides Statt	75
Publikationen und Kongressbeiträge	76
Lebenslauf	77
Danksagung	78

1 Abkürzungsverzeichnis

[Poly(i:c)]	Polyinosin:cytosin
AS	Gegenstrang (=Antisense)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (=complementary Deoxyribonucleic Acid)
CHO	Ovarzellen des chinesischen Hamsters (=Chinese Hamster Ovary)
CpG-ODN	CpG-Oligodesoxynukleotid
DC	Dendritische Zelle (=Dendritic Cell)
DD	Todesdomäne (=Death Domain)
DIG-dUTP	Digoxigenin-2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat
dMyD88	Primäres Antwortgen der myeloiden Differenzierung (88) in <i>Drosophila</i> (= <i>drosophila</i> Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88))
DNA	Desoxyribonukleinsäure (=Deoxyribonucleic Acid)
DNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure (=double stranded Ribonucleic Acid)
DTT	DL-Dithiothreitol
EC	Embryonales Karzinom (=Embryonal Carcinoma)
ECL	Entorhinale Kortexläsion (=Entorhinal Cortex Lesion)
GFAP	Saures gliales Faserprotein (=Glial Fibrillary Acidic Protein)
HEK-293	Menschliche embryonale Nierenzelle (=Human Embryonic Kidney)
HSP60	Hitzeschockprotein 60 (=Heat-Shock-Protein 60)
Iba1	Ionisiertes kalziumbindendes Molekül 1 (=Ionized Calcium binding adaptor Molecule 1)
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
iNOS	Induzierbare NO-Synthase (=inducible Nitric Oxide Synthase)
IRAK	Interleukin-1-rezeptor-assoziierte Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucinreiche Wiederholungsdomäne (=Leucine-Rich Repeat)
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2

MAP-Kinase	Mitogen aktiviertes Protein-Kinase
M-MLV RT	Moloney Murines Leukämie Virus-Reverse Transkriptase
MyD88	Primäres Antwortgen der myeloiden Differenzierung (88) (=Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88))
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NGS	Normales Ziegenserum (=Normal Goat Serum)
NO	Stickstoffmonoxid (=Nitric Oxide)
ODN	Oligodeoxynukleotid
P19NIM	P19-neurales Induktionsmedium
P19WM	P19-Wachstumsmedium
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (=Pathogen-Associated Molecular Pattern)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (=Phosphate Buffered Saline)
PGN	Peptidoglykan
PRR	Mustererkennungsrezeptor (=Pattern-Recognition Receptor)
QPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (=Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RH	Zufällig angeordnete Hexamer Primer (=Random Hexamer Primer)
RNA	Ribonukleinsäure (=Ribonucleic Acid)
SPE	Spätzle-prozessierendes Enzym
ssRNA	Einsträngige Ribonukleinsäure (=single stranded Ribonucleic Acid)
TIRAP	Toll-Interleukin 1 Rezeptor Domäne tragendes Adapterprotein (=Toll-Interleukin 1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein)
TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAM	TRIF-verwandtes Adaptermolekül (=TRIF-Related Adaptor Molecule)
TRIF	TIR-Domänen-beinhaltender Interferon- β induzierender Adapter (=TIR-Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon- β)

2 Einführung

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) während der Entwicklung des Mausgehirns untersucht. Im folgenden Kapitel wird zunächst das originäre Toll-Protein vorgestellt. Hierbei wird auf die Rolle dieses Proteins bei der embryonalen Entwicklung und bei der Immunantwort der Taufliege eingegangen. Im anschließenden Teil der Einleitung werden die einzelnen Toll-like Rezeptoren genauer charakterisiert. Ihre Struktur, ihre Signalwege und ihre Funktion bei der angeborenen Immunität werden aufgezeigt. Im Anschluss daran wird das bisher erarbeitete Forschungsfeld der Toll-like Rezeptoren im Gehirn näher beleuchtet, indem wichtige Kernarbeiten vorgestellt werden. Hierbei wird insbesondere auf die Frage eingegangen, welche Toll-like Rezeptoren in welchen Zellen des Gehirns exprimiert werden.

2.1 Die Rolle von Toll bei der Entwicklung des Taufliegenembryos

1995 erhielt Christiane Nüsslein-Volhard zusammen mit Eric F. Wieschaus und Edward B. Lewis den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Nüsslein-Volhard und Wieschaus erforschten die Gene, die im Ei der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) die Anlage des Körperplans und der Segmente steuern. Bei der von ihnen entwickelten Gradiententheorie wird davon ausgegangen, dass Stoffgradienten in der Eizelle und dem Embryo die Genexpression steuern. Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich des Proteins Toll und seiner Rolle bei der Embryonalentwicklung der Taufliege werden im Folgenden kurz umrissen.

Der Transkriptionsfaktor Dorsal bildet entlang der dorsoventralen Achse des *Drosophila*-Embryos einen Konzentrationsgradienten. Die unterschiedlichen Konzentrationen von Dorsal entlang des Gradienten determinieren die Entwicklung verschiedener Zellarten. Die Aufnahme von Dorsal in den Zellkern hängt von einer komplexen Signalkaskade ab, die in zwei Abschnitte eingeteilt werden kann: in eine extrazelluläre proteolytische Kaskade, die einen Konzentrationsgradienten aus dem aktivierten Faktor Spätzle erzeugt, sowie in eine von Toll ausgelöste intrazelluläre Kaskade, die schließlich zur Bildung von Mesoderm, Neuroektoderm und nichtneuronalem (dorsalem) Ektoderm führt. Die Entwicklung der ventralen Anteile des Embryos ist von 17 Genen abhängig, die im Rahmen verschiedener epigenetischer Untersuchungen identifiziert wurden (Mohler JD 1977; Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M et al. 1980; Anderson KV und Nusslein-Volhard C 1984; Schupbach T und Wieschaus E 1989; Luders F, Segawa H et al. 2003; Luschnig S, Moussian B et al. 2004). Die gesamte Kaskade

nimmt ihren Ausgang von den mütterlichen Follikelzellen, die die Oozyte und ihre Ammenzellen umgeben. Zu den bisher identifizierten, von den Follikelzellen produzierten intrazellulären Proteinen gehören Pipe, Slalom und Windbeutel sowie die sezernierte Protease Nudel. Diese Faktoren werden benötigt, um eine Gruppe von Proteasen zu aktivieren, die von der Oozyte bzw. dem frühen Embryo als inaktive Vorstufen sezerniert werden: Gastrulation defective, Snake und Easter. Diese Kaskade ähnelt in ihrem Ablauf jenem des Komplementsystems und der Blutgerinnung und kulminiert schließlich in der Aktivierung des Faktors Spätzle, der an das Toll-Protein bindet, welches sich in der Zellmembran der Oozyte befindet (Krem MM und Di Cera E 2002). Das Signal wird nun intrazellulär über die Adapterproteine Krapfen und *drosophila* Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88) (dMyD88) weitergegeben und führt dann über den Faktor Tube und die Kinase Pelle zur Degradation des I κ B-Homologs Kaktus. Dies führt zur Enthemmung des Transkriptionsfaktors Dorsal, der daraufhin in den Kern eindringen und genetische Programme aktivieren kann, die zur Entwicklung der dorsoventralen Achse führen.

Die Frage, ob das originäre *toll*-Gen auch eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielt, ist ungeklärt. Die einzige bisher publizierte Arbeit zu dem Thema stammt aus dem Jahre 1997 (Rose D, Zhu X et al. 1997). Hierin wurde gezeigt, dass auswachsende Motoneurone aus dem spinalen Nucleus bulbocavernosus solche Muskelzellen zur Synapsenbildung bevorzugen, die das Toll-Protein nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren.

2.2 Die Rolle von Toll bei der angeborenen Immunität der Taufliege

Die Rolle des *toll*-Gens bei der angeborenen Immunantwort wurde erstmals 1996 beschrieben. Lemaitre und Mitarbeiter zeigten, dass adulte Taufliegen mit defektem Toll-Signalweg sehr empfänglich für Pilzinfektionen sind (Lemaitre B, Nicolas E et al. 1996). Die Taufliege verfügt anders als Säugetiere nur über ein angeborenes und nicht über ein adaptives Immunsystem. Dieses angeborene Immunsystem lässt sich in einen humoralen und einen zellulären Anteil aufteilen. Der zelluläre Anteil wird durch makrophagenähnliche Fresszellen gebildet. Zur humoralen Antwort gehört in erster Linie die Bildung von sieben antimikrobiellen Peptiden im Fettkörper. Der Fettkörper entspricht beim Insekt etwa der menschlichen Leber. Die Bildung dieser kleinen, gegen Pathogene gerichteten, kationischen Moleküle wird durch zwei Signalkaskaden reguliert: die Toll-Kaskade und die Immundefizienz-Kaskade. Grampositive Bakterien aktivieren vor allem die Toll-Kaskade, während Pilze zunächst die Immundefizienz-Kaskade aktivieren. Beide Kaskaden kulminieren schließlich in der nukleären Translokation des

NF- κ B (Nukleärer Faktor kappa B)-homologen Faktors der Fliege (Leclerc V und Reichhart JM 2004; Naitza S und Ligoxygakis P 2004; Kaneko T und Silverman N 2005; Tanji T und Ip YT 2005).

2.2.1 Die Toll-Signalkaskade bei der Immunantwort der Taufliege

Das Toll-Protein der Taufliege erkennt die proteolytisch gespaltene Form des Faktors Spätzle, die im Blut als inaktives Präprotein zirkuliert. Bei der Immunreaktion wird das Präprotein als letzter Schritt einer Serin-Proteasen-Kaskade gespalten (Weber AN, Tauszig-Delamasure S et al. 2003). Toll ist ein membranständiges Protein, das sich ständig in einem Gleichgewicht zwischen dimerem und monomerem Zustand befindet. Nach Bindung des aktivierten Faktors Spätzle kommt es zu einer Konformationsänderung des Toll-Proteins, das nun vornehmlich den dimeren Zustand einnimmt. Nachdem zwei Toll-Proteine mit ihren Liganden einen Dimer gebildet haben, kommt es zur Interaktion der beiden Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domänen der Proteine, die ihrerseits den Faktor dMyD88 aktivieren. In der Folge transloziert schließlich der Faktor Dif in den Kern und induziert die Transkription immunreaktiver Gene, die die Bildung antimikrobieller Peptide auslösen.

2.3 Die Rolle von Toll-like Rezeptoren im Säugetier

Grundsätzlich kann in höheren Lebewesen zwischen einem angeborenen, erregerspezifischen und einem erworbenen, erregerspezifischen Immunsystem unterschieden werden. Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen Krankheitserregern aus. Im Rahmen einer Anpassungsreaktion sind die Zellen der erworbenen Immunabwehr in der Lage, spezifische Antigene auf Pathogenen zu erkennen und dann gezielt zelluläre Abwehrmechanismen einzuleiten und spezifische molekulare Antikörper zu bilden. Das erworbene Immunsystem wird in erster Linie von antigenpräsentierenden Zellen wie Dendritischen Zellen (Dendritic Cell, DC) sowie T- und B-Lymphozyten gebildet. Zum angeborenen, unspezifischen Immunsystem zählen anatomische Barrieren wie Epithelien ebenso wie die zellvermittelte Abwehr durch Phagozytose und das Komplementsystem. Das angeborene Immunsystem ist evolutionär stark konserviert und steht in der Reihe der Immunreaktionen auf pathogene Mikroorganismen zeitlich vor der erworbenen Immunität (Akira S, Uematsu S et al. 2006). In Insekten und Säugetieren erfolgt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die Erkennung sogenannter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (Pathogen-

Associated Molecular Pattern, PAMP): molekulare Strukturen, die in Pathogenen, nicht jedoch in Zellen höherer Lebewesen gefunden werden können. Rezeptoren, die solche PAMP erkennen, werden als Mustererkennungsrezeptoren (Pattern-Recognition Receptor, PRR) bezeichnet. Zu der Gruppe der PRR gehören auch die Toll-like Rezeptoren. Hierbei handelt es sich um Homologe des originären *toll*-Gens der Taufliege in höheren Lebewesen. Heute sind uns 13 Toll-like Rezeptoren in Säugetieren bekannt (im Menschen wurden bisher nur die Toll-like Rezeptoren 1-11 identifiziert), die alle unterschiedliche PAMP auf Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen erkennen.

2.4 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Toll-like Rezeptoren werden auf diversen Immunzellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Zellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Darüber hinaus finden sich Toll-like Rezeptoren auch in Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten, Keratinozyten und Epithelzellen (Kawai T und Akira S 2007).

TLR1 erkennt gemeinsam mit TLR2 triacetylierte Lipoproteine; diese finden sich als Bestandteil der Zellwand verschiedener Bakterien, so z. B. *Borrelia burgdorferi*.

Für TLR2 sind bisher die meisten Liganden identifiziert worden: Lipoproteine und Peptidoglykane (Bestandteile der Zellwand von Bakterien), Lipoteichonsäure (aus der Zellwand grampositiver Bakterien) sowie Zymosan, das in der Zellwand von Hefen gefunden wird.

TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), die während der Replikation von RNA-Viren in der Wirtszelle gebildet wird.

TLR4 vermittelt die Immunreaktion auf Lipopolysaccharide (LPS) aus der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien.

TLR5 erkennt Flagellin, einen Bestandteil der Flagellen begeißelter Bakterien.

TLR6 bildet einen Heterodimer mit TLR2, welcher diacetylierte Lipoproteine aus Mykobakterien erkennt.

TLR7 und TLR8 binden virale, GU-reiche einsträngige RNA (ssRNA) (Diebold SS, Kaisho T et al. 2004).

TLR9 erkennt virale und bakterielle DNA, die reich an unmethylierten CpG-Motiven ist (Takeda K, Kaisho T et al. 2003).

Für TLR10 sind keine Liganden bekannt.

TLR11 bindet Bakterien, die üblicherweise Harnwegsinfektionen verursachen, so z. B. *Escherichia coli*.

Toll-like Rezeptoren erkennen jedoch nicht nur körperfremde, sondern auch wirtseigene Moleküle. So kann TLR4 Fibrinogen, Beta Defensin 2 und Hitzeschockprotein 60 (HSP60) binden (Smiley ST, King JA et al. 2001; Biragyn A, Ruffini PA et al. 2002). Anscheinend erkennen auch die beiden Toll-like Rezeptoren 7 und 9 nicht nur körperfremde, sondern auch körpereigene RNA bzw. DNA, was möglicherweise eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes spielt (Marshak-Rothstein A 2006).

2.5 Die Struktur von Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind transmembranäre Typ-I Proteine mit extrazellulären Leucinreichen Wiederholungsdomänen (Leucin-Rich Repeat, LRR) und einer intrazellulären TIR-Domäne. LRR sind evolutionär hochkonservierte Strukturen und können in den Proteinen von Viren, Bakterien, Pflanzen und Tieren nachgewiesen werden. LRR sind 22 bis 29 Aminosäuren lang und durch eine typische Anordnung der hydrophoben Aminosäure Leucin charakterisiert, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Buchanan SG und Gay NJ 1996). Aus der Röntgenkristallographie ist bekannt, dass diese LRR in vielen Proteinen eine sogenannte Hufeisen-Faltung aufweisen. Nachgewiesen wurde dies für die Rezeptoren Toll (Weber AN, Tauszig-Delamasure S et al. 2003), TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 (Mizel SB, West AP et al. 2003; Andersen-Nissen E, Smith KD et al. 2007; Jin MS, Kim SE et al. 2007), TLR3 (Bell JK, Botos I et al. 2005; Choe J, Kelker MS et al. 2005) und TLR9 (Cornelie S, Hoebeke J et al. 2004; Rutz M, Metzger J et al. 2004).

Die Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4, 5, 6, 10 und 11 finden sich auf der Zelloberfläche, während die Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 in zytoplasmatischen Kompartimenten zu finden sind, und zwar in erster Linie in Membranen von Endosomen und Lysosomen (Saitoh S und Miyake K 2009). Die LRR der Toll-like Rezeptoren können mit Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren interagieren. Die LRR der Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4, 5, 6, 10 und 11 sind an der Außenseite der Membran lokalisiert, die LRR der Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 weisen in den Innenraum des entsprechenden Membrankompartimentes.

Der signalvermittelnde Teil der Toll-like Rezeptoren ist die sogenannte TIR-Domäne, die ebenfalls in vielen Spezies evolutionär hochkonserviert ist. Proteine mit TIR-Domänen kommen in Pflanzen, Bakterien und Viren vor, wobei davon auszugehen ist, dass die Akquisition der TIR-Domäne durch Viren und Bakterien erst in jüngerer Zeit als eine Form der Anpassungsreaktion der Pathogene an die Immunantwort des Wirtes stattgefunden hat. Hierbei produziert das

Bakterium bzw. das Virus TIR-domänenhaltige Proteine, um die Immunantwort zu beeinflussen. Dies ist beispielsweise für das Pockenvirus beschrieben (Stack J, Haga IR et al. 2005).

2.6 Toll-like Rezeptoren-assoziierte Signalkaskaden

Nachdem Toll-like Rezeptoren ihre entsprechenden PAMP-Liganden gebunden haben, werden intrazelluläre Signalproteine aktiviert, die ihrerseits auch eine TIR-Domäne tragen. Die Aktivierung findet hier durch die homophile Wechselwirkung der TIR-Domäne des Toll-like Rezeptors mit der TIR-Domäne des Adapterproteins statt. Die folgende Signalkaskade endet schließlich in der Aktivierung von NF- κ B. Daraufhin sezernieren die Immunzellen Zytokine und Chemokine. Außerdem werden kostimulatorische Moleküle auf DC hochreguliert, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielen.

Die TIR-Domänen tragenden Adapterproteine, über die die TLR-Signalkaskaden ablaufen, schließen MyD88 (Medzhitov R, Preston-Hurlburt P et al. 1998), TIRAP (Yamamoto M, Sato S et al. 2002), TRAM und TRIF ein (Yamamoto M, Sato S et al. 2003). Folgende Toll-like Rezeptoren können nach Bindung ihres Liganden die MyD88-Signalkaskade aktivieren: TLR1, -2, -4, -5, -6, -7 und -9. TRIF spielt bei der Kaskade der Toll-like Rezeptoren 3 und 4 eine Rolle. TIRAP bindet TLR2 und TLR4 und TRAM TLR4.

Das Protein MyD88 enthält eine sogenannte Todesdomäne (Death Domain, DD), mithilfe derer es die Interleukin-1-rezeptorassoziierten Kinasen (IRAK) 1 und 4 aktivieren kann, die ebenfalls Todesdomänen tragen. Die Signalkaskade führt schließlich zur Translokation von NF- κ B und des Aktivator-Proteins-1 in den Kern. Außer dieser Signalkaskade gibt es noch eine direkte Interaktion von MyD88 mit dem Transkriptionsfaktor IRF-5, die zur Induktion proinflammatorischer Zytokine führt. Das Protein TRIF hingegen initiiert einen RIP1-abhängigen Signalweg, der nach TLR3-Aktivierung MyD88-unabhängig und nach TLR4-Aktivierung MyD88-abhängig verläuft. Über TRAF3 werden die Kinasen TBK1 und IKK-i aktiviert und führen ihrerseits zur Aktivierung von NF- κ B (Fitzgerald KA, McWhirter SM et al. 2003).

2.7 Die Rolle von Toll-like Rezeptoren im zentralen Nervensystem

Toll-like Rezeptoren werden in erster Linie auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert. Die Aktivierung von TLR-Kaskaden führt hier zur Produktion kostimulatorischer, T-Zellen-aktivierender Faktoren (Medzhitov R 2001). In letzter Zeit wurden Toll-like Rezeptoren

jedoch zunehmend auch auf diversen Zellen beschrieben, die nicht dem Immunsystem zugehörig sind, so z. B. auf Enterozyten (Leaphart CL, Cavallo J et al. 2007), Zellen der Niere oder des Ovars (Fleer A und Krediet TG 2007). Welche Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) Toll-like Rezeptoren exprimieren, ist Gegenstand intensiver Forschung. Vor wenigen Jahren ging man noch davon aus, dass das Gehirn ein immunprivilegiertes Organ sei. Es zeichnet sich jedoch zunehmend ab, dass das Gehirn ein Organ ist, in dem durchaus immunologische Reaktionen stattfinden (Hickey WF 1999). Diese Immunreaktionen werden durch lokale oder generalisierte Infektionen induziert (Nguyen MD, Julien JP et al. 2002).

Die Zellen, die das angeborene Immunsystem im ZNS hauptsächlich repräsentieren, sind die Mikroglia, die Fresszellen des ZNS. Sie spielen eine Rolle bei der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, bei Prozessen der Zytotoxizität sowie bei der Aktivierung von T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation und Kostimulation (Aloisi F 2001). Mikroglia bilden so die erste Verteidigungsinstanz gegen Pathogene, bevor es zu einer Leukozyteninfiltration des Gehirns kommt. Des Weiteren sind Astrozyten an der Immunreaktion im Gehirn beteiligt, obwohl diese Zellen bisher vor allem mit der Regulation des Kaliumhaushaltes oder der Blut-Hirn-Schranke in Verbindung gebracht wurden. Sie scheinen jedoch auch bei der Rekrutierung peripherer Immunzellen in das Gehirn eine Rolle zu spielen. Astrozyten und Mikroglia exprimieren diverse Toll-like Rezeptoren (Dong Y und Benveniste EN 2001). Anscheinend übernehmen diese hier auch nicht-immunologische Funktionen. Auch gibt es mittlerweile Hinweise, dass Neurone selbst bestimmte Toll-like Rezeptoren exprimieren (s.u.).

Im Folgenden werden die einzelnen Toll-like Rezeptoren und ihre exprimierenden Zellen im ZNS aufgeführt. Es wird zunächst auf Arbeiten eingegangen, in denen die Expression von Toll-like Rezeptoren in der Zellkultur untersucht wurde. Im Anschluss werden Arbeiten vorgestellt, die die Expression von Toll-like Rezeptoren *in vivo* zum Schwerpunkt haben.

Sowohl TLR1 als auch TLR6 wurden *in vitro* in Mikroglia und Astrozyten identifiziert (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002; Bowman CC, Rasley A et al. 2003; Carpentier PA, Begolka WS et al. 2005). Funktionelle Studien zur Aktivierung von Mikroglia oder Astrozyten gibt es bisher noch nicht.

Stimulation von TLR2 auf Mausmikroglia mit Streptokokken der Serogruppe B führt unter Mitwirkung von Caspase 8 zu Apoptose (Lehnardt S, Wennekamp J et al. 2007). Es wurde weiterhin in verschiedenen Studien darauf hingewiesen, dass Mausastrozyten TLR2 exprimieren. Wie auf Mausmikroglia kann auch auf Mausastrozyten die TLR2-Expression nach Stimulation mit verschiedenen TLR2-Liganden hochreguliert werden (Bowman CC, Rasley A et al. 2003). Bei menschlichen Astrozyten ist die Datenlage weniger eindeutig. Bsibsi et al. beschrieben 2002

eine Expression von TLR2, wohingegen Farina et al. 2005 diese nicht nachweisen konnten (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002; Farina C, Krumbholz M et al. 2005). Des Weiteren konnte in primären Mausoligodendrozyten TLR2 nachgewiesen werden (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002).

In Studien wird TLR3 üblicherweise mit dem synthetischen Liganden Polyinosin:cytosin [Poly(i:c)] stimuliert. Es ist bekannt, dass Mikroglia TLR3 exprimieren. Auf Stimulation mit Poly(i:c) reagieren Mikroglia mit der Sekretion der Zytokine Interferon- β , Interleukin-1 β sowie Interleukin-6 (Olson JK und Miller SD 2004). Zudem wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass auch Astrozyten TLR3 exprimieren (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002; Carpentier PA, Begolka WS et al. 2005; Farina C, Krumbholz M et al. 2005). Auch Oligodendrozyten exprimieren TLR3 (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002). Außerdem existiert eine Arbeit, in der TLR3-Expression in Neuronen nachgewiesen wurde (Prehaud C, Megret F et al. 2005).

Die ersten TLR4-Expressionsstudien wurden an transfizierten HEK-293- und Chinese-Hamster Ovary-Zellen (CHO) durchgeführt. Nach diesen ersten Arbeiten wurde zunächst angenommen, dass sowohl TLR4 als auch TLR2 LPS erkennen (Yang RB, Mark MR et al. 1998). Später stellte sich heraus, dass kommerziell zu erwerbende LPS-Produkte mit Lipoproteinen kontaminiert waren und TLR2 nicht an der Erkennung von LPS beteiligt ist (Hirschfeld M, Ma Y et al. 2000). Mit der Erkenntnis, dass TLR4 für die frühe LPS-Immunreaktion verantwortlich ist, konnte auch die verminderte Immunantwort von C3H/HeJ- und 10ScCr-Mausstämmen auf LPS Stimulation aufgeklärt werden: Beide tragen eine Punktmutation im TLR4-Gen (Hoshino K, Takeuchi O et al. 1999). LPS bindet im Wirt zunächst an das Molekül MD-2. Der gebildete MD-2/LPS-Komplex bindet dann an TLR4. Mikroglia exprimieren TLR4 (Lehnardt S, Lachance C et al. 2002). In niedrigen Konzentrationen kommt es nach LPS-Stimulation in TLR4-defizienten Mäusen nicht zur Mikroglia-Aktivierung. In höheren Dosierungen ($> 1\mu\text{g/ml}$) findet eine TLR4-unabhängige Stimulation statt. Hierbei bindet LPS anscheinend an einen Rezeptor mit geringerer LPS-Affinität (Kitamura Y, Kakimura J et al. 2001). In Makrophagen hängt die Aktivierung durch LPS nicht allein von TLR4, sondern auch von dem Oberflächenmolekül CD14 ab (Dobrovolskaia MA und Vogel SN 2002). TLR4 kann Apoptose in Mikroglia vermitteln. Längere LPS-Stimulation führt hier zu Caspase 3- und Caspase 11-abhängiger Apoptose (Jung DY, Lee H et al. 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass LPS-abhängige Aktivierung von Mikroglia zur Sekretion von Zytokinen und Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide, NO) führt, was den Zelltod in Neuronen- und Oligodendrozyten-Kulturen induziert (Lehnardt S, Lachance C et al. 2002; Lehnardt S, Massillon L et al. 2003). TLR4 erkennt außerdem Hitzeschockproteine als endogene Liganden (Ohashi K, Burkart V et al. 2000). Nach nekrotischem oder apoptotischem Zelltod wird das zellinterne Chaperon HSP60 im ZNS frei und

bindet und aktiviert Mikroglia über TLR4. Es kommt zur Sekretion von neurotoxischem NO (Lehnardt S, Schott E et al. 2008). Im Gegensatz zu Mikroglia ist die Datenlage für Astrozyten und TLR4 eher widersprüchlich. So konnten verschiedene Gruppen keine TLR4-Expression in Astrozyten nachweisen (Laflamme N und Rivest S 2001; Lehnardt S, Lachance C et al. 2002; Lehnardt S, Massillon L et al. 2003; Farina C, Krumbholz M et al. 2005). Andere Veröffentlichungen zeigen geringe konstitutive Expressionslevel, die sich nach Stimulation mit LPS erhöhen (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002; Bowman CC, Rasley A et al. 2003; Carpentier PA, Begolka WS et al. 2005).

TLR5 konnte in Mikroglia und Astrozyten nachgewiesen werden (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002). Es existiert nur eine Arbeit, in der die funktionelle Reaktion von Astrozyten nach TLR5-Stimulation untersucht wird. Stimuliert wurde mit Flagellin aus *Salmonella typhimurium*. Es folgte eine Hochregulation von TLR2, TLR4 und TLR5. Außerdem kam es zur Sekretion von Interleukin-6 (Bowman CC, Rasley A et al. 2003). Die Rolle von TLR5 in Mikroglia war bisher noch nicht Thema größerer Studien.

TLR7 und TLR8 sind zu großen Teilen sequenzhomolog. Sie erkennen ssRNA und synthetische Imidazolin-Derivate wie Imiquimod und Resiquimod, die als Virostatika Verwendung finden, sowie Guanosin-Derivate (Hemmi H, Kaisho T et al. 2002; Diebold SS, Kaisho T et al. 2004; Heil F, Hemmi H et al. 2004). Zunächst wurden Resiquimod und Imiquimod als TLR7/8-Liganden identifiziert. Die strukturelle Ähnlichkeit zu ssRNA führte dann zur Identifikation dieser einsträngigen Ribonukleinsäuren als weitere Liganden (Diebold SS, Kaisho T et al. 2004; Heil F, Hemmi H et al. 2004). TLR7 und 8 werden in Mikroglia und Astrozyten exprimiert (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002; Olson JK und Miller SD 2004; Carpentier PA, Begolka WS et al. 2005). Die Stimulation kortikaler Neurone mit dem TLR7/8-Agonisten Resiquimod vermindert das Wachstum von Dendriten und induziert Apoptose (Ma Y, Li J et al. 2006).

TLR9 erkennt bakterielle und virale DNA, die reich an CpG-Motiven ist (Takeda K, Kaisho T et al. 2003). CpG-Motive kommen zwar auch beim Säuger vor, sind hier jedoch typischerweise methyliert, so dass sie keine TLR9-induzierte Immunreaktion auslösen. In der Forschung werden üblicherweise synthetische, unmethylierte Oligodeoxynukleotide (ODN) zur TLR9-Stimulation benutzt. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Mikroglia TLR9 exprimieren und auf TLR9-Stimulation mit der Sekretion von Zytokinen antworten (Takeshita S, Takeshita F et al. 2001; Dalpke AH, Schafer MK et al. 2002). In Kokulturen aus Mikroglia und Neuronen induziert die Stimulation der Mikroglia mit CpG-ODN neuronalen Zelltod (Iliev AI, Stringaris AK et al. 2003). Astrozyten exprimieren ebenfalls TLR9, und Stimulation mit CpG-ODN führt zur Aktivierung der Astrozyten (Takeshita S, Takeshita F et al. 2001; Bowman CC, Rasley A et

al. 2003). Stimulation mit CpG-ODN hat die Induktion von p38-MAP-Kinase sowie der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zur Folge. Anscheinend ist die Induktion dieser Enzyme MyD88-abhängig, denn sie kann in MyD88-KO-Tieren nicht beobachtet werden (Hosoi T, Suzuki S et al. 2004).

Die Expression von TLR10 scheint auf B-Zellen und Dendritische Zellen beschränkt zu sein (Hasan U, Chaffois C et al. 2005). Expression im Gehirn konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

TLR11 ist im Menschen aufgrund eines Stopp-Codons nicht funktional (Yarovinsky F, Zhang D et al. 2005). Eine Expression dieses Rezeptors im Gehirn wurde bisher nicht nachgewiesen.

Auch die Studien *in vivo*, die bisher zur Expression von Toll-like Rezeptoren veröffentlicht wurden, ergeben ein komplexes Bild. Die ersten Veröffentlichungen stammen aus dem Jahr 2001 und beschäftigen sich mit TLR2 und TLR4 (Laflamme N und Rivest S 2001; Laflamme N, Soucy G et al. 2001). Mittels *In-situ*-Hybridisierung konnten im nativen, unstimulierten Zustand TLR2 und TLR4 vor allem in denjenigen Bereichen des ZNS gefunden werden, die eine durchlässige Blut-Hirn-Schranke besitzen, wie z. B. die zirkumventrikulären Organen und der Plexus choroideus. Eine andere Studie aus dem Jahr 2005 zeigt eine viel breitere konstitutive Expression von TLR4, nämlich in den Mikroglia des gesamten Hirnparenchyms, im Bereich der fenestrierten Kapillaren sowie in den Meningen (Chakravarty S und Herkenham M 2005). Übereinstimmend zeigen die Arbeiten jedoch eine verstärkte Expression in Bereichen, in denen die Blut-Hirn-Schranke durchlässig ist. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass systemische Infektionen an diesen Stellen am ehesten auf das ZNS übergreifen können, so dass hier eine Art Frühwarnsystem eingebaut ist, an dem die Toll-like Rezeptoren beteiligt sind (Nguyen MD, Julien JP et al. 2002). Nach systemischer Stimulation mit LPS kommt es zu verstärkter TLR2-Expression sowie zu verminderter TLR4-Expression. Die verstärkte TLR2-Expression beginnt im Bereich des Plexus choroideus sowie der zirkumventrikulären Organe und breitet sich dann in das umgebende Hirnparenchym aus (Laflamme N und Rivest S 2001; Laflamme N, Soucy G et al. 2001). Die Frage, warum TLR2 vermehrt exprimiert wird, obwohl mit einem typischen TLR4-Liganden stimuliert wurde, bleibt ungeklärt. Nach LPS-Stimulation sezernieren Mikroglia vermehrt Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Wird jedoch LPS gemeinsam mit Peptidoglykan (PGN), einem TLR2-Liganden, administriert, kommt es zu einer Reduktion der TNF- α -Sekretion. In TLR2-KO-Tieren führt PGN nicht zu einer Reduktion der TNF- α -Sekretion. Der Mechanismus, über den diese Hemmung funktioniert, ist noch unverstanden (Laflamme N, Echchannaoui H et al. 2003). Aus Kokultur-Versuchen (s.o.) ist bekannt, dass LPS-aktivierte Mikroglia neuronalen sowie oligodendrozytären Zelltod vermitteln. 2003 wurde

im Mausmodell gezeigt, dass ein hypoxämischer Stimulus *in vivo*, der normalerweise nicht zu neuronalem Zelltod führt, nach zusätzlicher systemischer LPS-Stimulation axonale Degeneration und neuronalen Zelltod vermittelt. Dieser Effekt war TLR4-abhängig (Lehnardt S, Massillon L et al. 2003). Im Mausmodell der Alzheimerschen Krankheit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Mikroglia mit TLR2- und TLR4-Liganden zur vermehrten Phagozytose der Beta-Amyloid-Plaques führt (Chen K, Iribarren P et al. 2006; Walter S, Letiembre M et al. 2007).

Das Einbringen des TLR7-Agonisten Imiquimod in die Hirnventrikel von Mäusen führt zur Aktivierung von Astrozyten und zur vermehrten Expression von Zytokinen (Butchi NB, Pourciau S et al. 2008). In den Gehirnen zwei Wochen alter Mäuse wurde TLR8 via Immunhistochemie in den Somata neuronaler Zellen nachgewiesen (Ma Y, Li J et al. 2006).

Auch zu Toll-like Rezeptor 9 existieren einige Daten *in vivo*. Bakterien enthalten unmethylierte CpG-DNA, während in Eukaryonten diese CpG-Motive methyliert sind. Injektion von CpG-ODN in das ZNS führt zur Aktivierung von Mikroglia und zum Bild der Meningitis (Deng GM, Liu ZQ et al. 2001; Dalpke AH, Schafer MK et al. 2002). Die Administration von niedrigen Dosen CpG-ODN gemeinsam mit niedrigen, sonst unwirksamen Dosen von LPS und PGN hat eine synergistische Wirkung und führt ebenfalls zu Meningitis (Deng GM, Liu ZQ et al. 2001). Ebenfalls synergistisch wirkt die gemeinsame Administration mit dem *Theilervirus*, welche zu einem schwereren Krankheitsverlauf führt als die alleinige Injektion des Virus (Tsunoda I, Tolley ND et al. 1999). In einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), provoziert die zentrale Administration von CPG-ODN einen Krankheitsschub (Segal BM, Chang JT et al. 2000). TLR9-KO-Tiere zeigen demgegenüber eine geringere Krankheitsaktivität im EAE-Modell (Prinz M, Garbe F et al. 2006).

2.8 Fragestellung

Die Gruppe der Toll-like Rezeptoren im Säuger ist verwandt mit dem Toll-Protein in *Drosophila melanogaster*. Dieses originäre Toll-Protein hat eine Doppelfunktion im Organismus der Fliege. Zum einen reguliert es die Entwicklung der dorsoventralen Achse der Fliegenlarve, zum anderen spielt es eine Rolle bei der Immunantwort der adulten Fliege auf Pilzinfektionen. Obwohl das originäre Toll-Protein einen Regulator der Entwicklung darstellt, existieren bisher kaum Daten über Toll-like Rezeptoren im sich entwickelnden Gehirn. Toll-like Rezeptoren könnten an neurotoxischen oder neurodegenerativen Prozessen im sich entwickelnden Gehirn beteiligt sein

oder die Hirnentwicklung regulatorisch beeinflussen; sie könnten eine Rolle bei der Ausrichtung der Achse des ZNS spielen, die Migration neuronaler Vorläuferzellen beeinflussen oder an der Ausbildung bestimmter Hirnregionen beteiligt sein. In dieser Arbeit sollten daher folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1) Es sollten die Expressionslevel der biologisch relevanten Toll-like Rezeptoren 1-9 und des Adapterproteins MyD88 im sich entwickelnden Gehirn auf mRNA-Ebene, beginnend mit der Hirnentwicklung der Maus im 13 Tage alten Embryo bis hin zum adulten fünf Monate alten Gehirn, bestimmt werden. Die Messung sollte mithilfe der Quantitativen Real-Time-PCR (QPCR) an Homogenaten von Großhirnen von Mäusen durchgeführt werden.
- 2) Nach Identifikation der mRNA-Expressionsveränderungen sollten diese mithilfe von *In-situ*-Hybridisierung an Maushirnschnitten verschiedener Altersstufen untersucht werden, um das anatomische Korrelat bzw. den exprimierenden Zelltyp zu identifizieren.
- 3) In einem dritten Abschnitt sollte die Expression von Toll-like Rezeptoren während der Hirnentwicklung auf Proteinebene untersucht werden. Hierzu sollten immunhistochemische Studien an Mausgehirnen unterschiedlicher Altersstufen erfolgen. Mithilfe von Ko-Immunfärbungen sollte der das jeweilige Protein exprimierende Zelltyp identifiziert werden.

Weitere funktionelle Experimente, die sich im Verlauf der Arbeit ergaben, werden am Ende des Ergebnisteils dargestellt und diskutiert.

3 Materialien und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA-Präparation

3.1.1.1 Reagenzien und Geräte

RNaseZap®	Ambion
TRIzol® Reagent	Invitrogen
T 18 basic ULTRA-TURRAX®	IKA
Chloroform	Carl Roth
Isopropanol reinst	Carl Roth
Ethanol reinst	Carl Roth
Eppendorf 5415C Zentrifuge	Eppendorf
Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf
RNase freies Wasser	Carl Roth
Neurobasal Medium®	Gibco

3.1.1.2 Protokoll

Sämtliche Arbeiten mit RNA wurden mit sterilen, autoklavierten Einmalgeräten bzw. hitzesterilisierten Glaswaren durchgeführt. Alternativ wurden Geräte und Flächen vor Gebrauch mit RNaseZap® behandelt. Während des Arbeitens wurden Handschuhe getragen. C57BL/6J-Mäuse der Altersstufen P0, P4, P8, P12 und P5m (fünf Monate postnatal) sowie schwangere Mäuse (E13-E19) wurden per Genickbruch getötet. Die schwangeren Mäuse wurden nach Lokaldesinfektion medianlaparotomiert und die Embryos freipräpariert. Die Embryos wurden mit einer Schere dekapitiert und die Köpfe in Neurobasal Medium® in eine Petrischale auf Eis überführt. Mithilfe eines Binokulars wurden die Großhirnhemisphären freipräpariert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei nichtembryonalen Mäusen wurde das Großhirn freipräpariert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Gesamt-RNA-Isolierung aus dem Gewebe erfolgte mittels der Trizol-Methode, modifiziert nach Chomczynski (Chomczynski P 1993).

Die Hemisphären wurden in 1 ml TRIzol® gegeben und mit einem ULTRA-TURRAX® homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde das Homogenat 15 Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere farblose Phase, in der sich die Gesamt-RNA befand, in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, um die RNA zu fällen. Nach kurzem Vortexen wurde das Gemisch zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde erneut zehn Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abdekantiert und die RNA mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen: Hierzu wurde 1 ml 75% Ethanol auf die RNA gegeben und diese dann erneut fünf Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Ethanol wurde abdekantiert und das die RNA enthaltende Röhrchen offen zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde dann in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

3.1.2 DNase-Verdau

3.1.2.1 Reagenzien und Geräte

RQ1 RNase-Free DNase Kit	Promega
UltraPure® Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1)	Invitrogen
Ammoniumacetat 98%	Sigma-Aldrich

3.1.2.2 Protokoll

Nach der RNA-Isolierung erfolgte ein DNA-Verdau mit DNase I, wodurch Verunreinigungen mit DNA eliminiert wurden. Folgender Ansatz wurde für 20 Minuten bei 37°C inkubiert:

20 µl RNA
3,5 µl DNase I 10x Reaktionspuffer
3 µl RNase-freie DNase I
5 µl Nuklease-freies Wasser
3,5 µl RNase-Inhibitor

Nach der Inkubation wurden 165 µl RNase-freies Wasser und 200 µl UltraPure® Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1) hinzugegeben. Es folgte die Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und 12.000 g. Der die RNA enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Tube überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und gevortext. Es folgte eine

Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und 12.000 g. Der die RNA enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Tube überführt und mit 6 µl Ammoniumacetat und 550 µl 96% Ethanol versetzt. Nach intensivem Vortexen wurde das Gemisch für eine Stunde bei -80°C inkubiert. Es folgte die Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 12.000 g. Das Ethanol wurde vorsichtig abdekantiert und das Präzipitat für zehn Minuten im offenen Röhrchen bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat wurde dann in 20 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

3.1.3.1 Reagenzien und Geräte

Ultrospec 2100 pro

Amersham

3.1.3.2 Protokoll

Das Spektralphotometer misst die Lichtabsorption von Proben bei einem gegebenen Längenwellenbereich. Gelöste RNA hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260$ nm. Die RNA-Konzentration kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden. Nach der RNA-Aufreinigung wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Dabei gibt der Quotient von OD260/OD280 den Reinheitsgrad der Präparation an. Eine saubere RNA-Präparation weist einen Wert von 2,0 auf.

3.1.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

3.1.4.1 Reagenzien und Geräte

Random Hexamer Primer (RH)

Roche Applied Science

Desoxynukleosidtriphosphat (DNTP)

Roche Applied Science

DL-Dithiothreitol (DTT)

Promega

RNasin® Ribonuclease Inhibitor

Promega

Moloney Murines Leukämie Virus-Reverse
Transkriptase (M-MLV RT)

Promega

5 x Moloney Murines Leukämie Virus-Reverse
Transkriptase Puffer

Promega

3.1.4.2 Protokoll

Die gereinigte RNA wurde mithilfe eines Oligo(dT)-Primers und einer reversen Transkriptase des Moloney Leukämie Virus in cDNA umgeschrieben. Der folgende Ansatz wurde 60 Minuten lang bei 37°C in einem Heizblock inkubiert:

4 µg RNA in 15 µl RNase-freiem Wasser
 1,5 µl Random Hexamer Primer
 1,5 µl Desoxynukleosidtriphosphat
 0,5 µl DL-Dithiothreitol
 0,5 µl RNasin® Ribonuclease Inhibitor
 1,5 µl Moloney Murines Leukämie Virus-Reverse Transkriptase

Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt. Die cDNA wurde dann bei -80°C gelagert.

3.1.5 Quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR)

3.1.5.1 Reagenzien und Geräte

RT2 Real-Time-PCR Master Mix SYBR Green	Biomol
ABI Prism 7500 Sequence Detection System	ABI
7500 Fast Software	ABI

Primer:

Gen	Länge des Amplikons	Firma
Toll-like Rezeptor 1	200 bp	Biomol
Toll-like Rezeptor 2	109 bp	Biomol
Toll-like Rezeptor 3	171 bp	Biomol
Toll-like Rezeptor 4	180 bp	Biomol
Toll-like Rezeptor 5	177 bp	Biomol
Toll-like Rezeptor 6	189 bp	Biomol

Toll-like Rezeptor 7	202 bp	Biomol
Toll-like Rezeptor 8	150 bp	Biomol
Toll-like Rezeptor 9	160 bp	Biomol
MyD88	205 bp	Biomol
GAPDH	128 bp	Biomol

3.1.5.2 Protokoll

Die Expressionsmessungen wurden in einem ABI Prism 7500-Automaten durchgeführt. Zur Anwendung kam das SYBR-Green-Mastermix-Kit von Applied Biosystems. Das Mastermix enthält sowohl den SYBR-Green-Farbstoff, welcher nach Bindung doppelsträngiger DNA zu fluoreszieren beginnt, als auch eine Taq-Polymerase. Ebenfalls enthalten sind Puffer und DNTP. Angesetzt wurde folgendes Reaktionsgemisch:

12,5 µl Mastermix

10,5 µl Nuklease-freies Wasser

1 µl cDNA

1 µl Primer

Folgendes Programm wurde auf dem ABI Prism 7500-System programmiert:

1 Zyklus 15 Minuten bei 95°C

40 Zyklen 15 Sekunden bei 95°C

1 Minute bei 60°C

Außerdem wurde ein finaler Dissoziationszyklus programmiert, bei dem die Temperatur sukzessive auf 95°C erhöht wurde. Der Grund hierfür ist, dass SYBR-Green sequenzunabhängig mit dsDNA interkaliert und folglich unspezifische PCR-Produkte sowie Primerdimere ein Fluoreszenzsignal auslösen. Die Schmelzkurve beschreibt die Veränderung der Fluoreszenz während des langsamen Erwärmens. Jedes Amplikon hat abhängig von Länge und GC-Gehalt eine charakteristische Schmelztemperatur. Das Amplikon jedes Primers wurde außerdem in der Gelelektrophorese (s.u.) auf korrekte Länge überprüft, so dass bei identischer Schmelzkurve davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um das richtige Amplikon handelte. Als

Housekeeping-Gen wurde GAPDH gewählt. Die analysierten Gene wurden mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Formel ausgewertet.

3.1.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Unterschiede hinsichtlich der TLR-Expression in Maushirnen unterschiedlicher Altersstufen erfolgte aufgrund ungleicher Varianzen mittels des Kruskal-Wallis-Tests, gefolgt von einem Dunnett-T3 als Post-Hoc-Test (GraphPad Prism 5.00, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA). Signifikante Unterschiede (*) wurden bei $p \leq 0,05$ gekennzeichnet.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

3.1.7.1 Reagenzien und Geräte

Rotiphorese® 10x TAE-Puffer	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Roti®garose	Carl Roth

3.1.7.2 Protokoll

Die Größe der QPCR-Produkte wurde mithilfe einer Gelelektrophorese analysiert. 1,5% Agarosegel wurde folgendermaßen hergestellt: 49,25 ml TAE-Puffer wurden auf 100°C erhitzt und mit 0,75 g Agarose versetzt. Unter stetigem Rühren kühlte die Lösung auf 50°C ab. Dann wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und in eine Kammer gegossen. Ein Probenkamm wurde eingesetzt. Das abgekühlte Gel wurde in eine Kammer mit Laufpuffer (0,5x TAE) überführt und die QPCR-Produkte wurden zusammen mit einem Farbmaler in die Laufkammerchen des Gels pipettiert. Des Weiteren wurde eine DNA-Leiter in ein Laufkammerchen pipettiert. Dann wurde eine Spannung von 65 Volt für ca. 45 Minuten angelegt. Schließlich wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

3.1.8 Midipräparation von Plasmid-DNA

3.1.8.1 Reagenzien und Geräte

PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega
------------------------------------	---------

3.1.8.2 Protokoll

Für die präparative Aufreinigung wurden die Plasmide aus Kulturvolumina von 50-100 ml über den Midikit der Firma Promega nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.1.9 Transfektion von Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen

3.1.9.1 Reagenzien und Geräte

Lipofectamin 2000

Invitrogen

DMEM supplementiert:

DMEM (Invitrogen), 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 u/ml Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech)

Vektoren:

pcDNA3.1-mTLR9

Ruslan Medzhitov

pCAG-DsRed

Gregory Wulczyn

pCAG-mTLR7-HA

Thorsten Trimbruch

pCAG-IRES-EGFP

Thorsten Trimbruch

3.1.9.2 Protokoll

Das Plasmid pcDNA3.1-mTLR9 wurde freundlicherweise von Dr. Ruslan Medzhitov, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pCAG-mTLR7-HA und pCAG-IRES-EGFP erhielten wir von Dr. Thorsten Trimbruch, Neurocure – Cluster of Excellence, Charité-Universitätsmedizin, Berlin. Der DsRed-Vektor wurde freundlicherweise überlassen von Dr. Gregory Wulczyn, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charite Universitätsmedizin, Berlin. Die transiente Transfektion von HEK-293-Zellen erfolgte mit Lipofectamin 2000. 24-Well-Platten wurden mit 12 mm-Deckgläschen bestückt, welche mit Poly-D-Lysin beschichtet waren. Anschließend wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Transfektion erfolgte dann nach den Angaben des Herstellers. Das Plasmid pcDNA3.1-mTLR9 wurde mit pCAG-DsRed kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente pCAG-DsRed. Als Negativkontrolle für das Plasmid pCAG-mTLR7-HA diente pCAG-IRES-EGFP.

3.1.10 Durchflusszytometrie von primären Neuronen und Mikroglia

3.1.10.1 Reagenzien und Geräte

Waschpuffer:

PBS mit 2% Bovinem Serum Albumin

Permeabilisationspuffer:

PBS mit 0,15% Saponin (Carl Roth), 0,1% Triton X 100 (Carl Roth) und 1% Bovinem Serum Albumin

Antikörper (alle monoklonal):

Name	Spezies	Isotyp/Farbstoff	Hersteller	Verdünnung
Anti-TLR7	Maus	IgG1, Alexa-fluor®488	Dendritics	1/50
IgG1 Isotyp	Maus	IgG1, Alexa-fluor®488	EBioscience	1/50
Anti-TLR9	Ratte	IgG2a, FITC	EBioscience	1/50
IgG2a Isotyp	Ratte	IgG2a, FITC	EBioscience	1/50
Anti-Beta-III	Maus	IgG2a, Alexa-fluor®647	BD Bioscience	1/10
IgG2a Isotyp	Maus	IgG2a, Alexa-fluor®647	BD Bioscience	1/10
CD11b	Ratte	IgG2b, APC-Cy7	BD Pharmingen	1/10
IgG2b Isotyp	Ratte	IgG2b, APC-Cy7	BD Pharmingen	1/10

weitere:

BD FacsCanto II BD Bioscience

BD FcBlock™ BD Bioscience

3.1.10.2 Protokoll

Kultivierte primäre Neurone wurden mithilfe der Durchflusszytometrie auf die Expression von TLR7 und TLR9 überprüft. Als Positivkontrolle dienten Mikroglia, die sowohl TLR7 als auch TLR9 exprimieren. Pro Probe wurden ca. 100.000 Zellen analysiert. Zunächst wurden die Zellen für 20 Minuten bei 4°C in PBS und dann für 15 Minuten in 0,75% Trypsin inkubiert. Das Trypsin wurde mithilfe von fetalem bovinem Serum deaktiviert. Es wurde nun zweimal mit Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation bei 1200 g bei 4°C für fünf Minuten). Die Zellen wurden resuspendiert und je 500 µl in ein FACS-Röhrchen überführt. Es wurden weiter 500 µl 4% PFA hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nun wurde erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in jedem Röhrchen in 500 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Nun wurde wiederum fünf Minuten lang bei 4°C und 1200 g zentrifugiert und die Zellen anschließend in

50 µl Permeabilisierungspuffer mit 0,5 µl BD FcBlock™ aufgenommen und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die entsprechenden Antikörper wurden gemäß den oben genannten Verdünnungen in 75 µl Permeabilisierungspuffer gelöst und zu den gelösten Zellen gegeben. Immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-TLR7-Antikörper wurden 30 Minuten lang inkubiert. Immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-TLR9-Antikörper wurden zwölf Stunden lang inkubiert. Es wurde nun zweimal mit Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation bei 1200 g bei 4°C für fünf Minuten). Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Waschpuffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten wurden mithilfe der Software Flowjo (TreeStar, San Carlos, CA) ausgewertet.

3.2 Histologische Techniken

3.2.1 Anfertigung von Kryostatschnitten

3.2.1.1 Reagenzien und Geräte

Leica CM1900	Leicastat
Tissue-Tek	Sakura Finetek
Superfrost Objektträger	R. Langenbrinck

3.2.1.2 Protokoll

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden freipräparierte Hirne in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Tissue-Tek eingebettet. An einem Kryostaten wurden anschließend 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf einen Objektträger überführt und bei -80°C gelagert.

3.2.2 *In-situ*-Hybridisierung

3.2.2.1 Reagenzien und Geräte

Sonden:

Sonde	Sequenz	Firma
LNA Sonde TLR7	taatcacatccacttttcatc	Exiqon
LNA Sonde MyD88	atagtctgtctgttctagttgccg	Exiqon
LNA Sonde Scramble-miR	ttcacaatgcgttatcggatgt	Exiqon

Waschlösung:

PBS mit 0,05% Tween 20.

Acetylierungslösung:

0,1 M Triethanolamin-hydrochlorid (Sigma), pH 8,0 (mit NaOH), 0,25% Essigsäureanhydrid.

PK-Puffer:

100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0 (autoklavieren), vor Gebrauch 0,05% Tween 20 zugeben.

Hybridisierungslösung:

100 mg/ml Dextransulfat, 0,3 M NaCl, 0,02 M Tris, 5 mM EDTA, 1x Denhardts-Lösung (50x), 0,5 mg/ml t-RNA, 50% Formamid (deionisiert).

SSC-Waschpuffer I:

5x SSC, 0,05% Tween 20.

SSC-Waschpuffer II:

0,1x SSC, 0,05% Tween 20.

Formamid I-Waschpuffer:

50% Formamid (deionisiert), 2x SSC, 0,05% Tween 20.

Formamid II-Waschpuffer:

50% Formamid (deionisiert, Carl Roth), 1x SSC, 0,05% Tween 20. 10x TN-Puffer:
1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, für 1x Gebrauchslösung
0,05% Tween 20 zugeben.

10x Maleatpuffer:

1 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl, pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren, für 1x
Gebrauchslösung 0,05% Tween 20 zugeben.

AP Substratpuffer:

0,2 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 10,2 g/l MgCl₂.

NBT/BCIP-Färbelösung:

1% NBT/BCIP (Roche) in AP Substratpuffer, 0,1% 1 M Levamisol (Sigma).

Fast Red-Färbelösung:

1 Fast Red-Tablette (Roche) in 2 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,2.

weitere:

DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation	Roche
NBT/BCIP Stock Solution	Roche
Magnafire Software	Optronics

3.2.2.2 Protokoll

Die *In-situ*-Hybridisierung erlaubt den optischen Nachweis von Nucleinsäuren (DNA oder RNA) am Gewebeschnitt mittels markierter Sonden. Der Nachweis der gewünschten Nucleinsäuresequenzen erfolgt mithilfe sogenannter Antisense-Sonden (AS), welche die gegenläufige Basensequenz der spezifischen Nucleinsäure besitzen. Diese Sonden sind außerdem mit einem Molekül markiert, das immunologisch mit einem Antikörper detektiert werden kann. Dieser Antikörper wird an seinem Fc-Teil entweder mit einer Peroxidase oder mit einem Fluorochrom gekoppelt. Im ersten Fall erfolgt die Sichtbarmachung mittels einer präzipitierenden Farbreaktion, im letzteren Fall mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Verbrauchsmaterialien und Reaktionsgefäße müssen stets RNase-frei sein.

3.2.2.2.1 „Tailing“ von Oligonukleotiden

Beim sogenannten Tailing wird mithilfe einer Terminalen Transferase ein Digoxigenin-2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat-Rest (DIG-dUTP) an das 3'-Ende der LNA-Sonde angehängt. Hierfür wurde folgende Reaktion angesetzt:

100 pM der Sonde in 9 µl RNase-freiem Wasser
4 µl Reaktionspuffer
4 µl CoCl₂
1 µl DIG-dUTP Lösung
1 µl dATP Lösung
1 µl Terminale Transferase

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugation erfolgte die Synthese des DIG-Schwanzes bei 37°C in einer fünfzehnminütigen Reaktion. Die Reaktion wurde auf Eis abgekühlt und mit 2 µl 0.2 M EDTA gestoppt.

3.2.2.2.2 Prähybridisierung

Da die zu untersuchende Ziel-mRNA im Zytoplasma oder in zytoplasmatischen Zellkompartimenten der Zellen zu erwarten ist, wurden diese durch Prähybridisierung zunächst mit Detergenzien und Proteinasen permeabilisiert. Hierfür wurden die Kryostatschnitte für 20 Minuten mit 4% PFA fixiert. Es folgte dreimaliges Waschen in Waschpuffer für fünf Minuten

und eine zehnminütige Inkubation in Acetylierungslösung. Nach erneutem Waschen (dreimal fünf Minuten in Waschpuffer) begann die fünfminütige Vorinkubation in PK-Puffer, gefolgt von einer zwanzigminütigen Inkubation in Proteinase K (2 µg/ml in PK-Puffer) bei Raumtemperatur. Nachdem die Schnitte erneut gewaschen worden waren (dreimal fünf Minuten in Waschpuffer), erfolgte die eigentliche Vorhybridisierung mit 100 µl Hybridisierungspuffer unter Parafilm für eine Stunde bei 64°C in einer feuchten Kammer.

3.2.2.2.3 Hybridisierung mit NBT/BCIP

Die DIG-markierte LNA (200 ng/ml) wurde für fünf Minuten bei 80°C denaturiert. 100 µl dieser Lösung wurden auf die Gewebeschnitte pipettiert und über Nacht unter Parafilm in einer feuchten Kammer bei 64°C inkubiert. Es folgte eine Serie von Waschschritten:

- dreimal fünf Minuten mit SSC-Waschpuffer I bei 64°C
- fünfmal zehn Minuten mit Formamid I bei 64°C
- fünfmal zehn Minuten mit Formamid II bei 64°C
- dreimal fünf Minuten mit SSC-Waschpuffer II bei 64°C
- dreimal fünf Minuten mit SSC-Waschpuffer II bei Raumtemperatur
- dreimal fünf Minuten in 1x TN-Puffer bei Raumtemperatur

Es folgte die Inkubation mit 4% Ziegen Serum (NGS) in 1x TN-Puffer bei 4°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte mit Anti-DIG-Fab-AP-Antikörperlösung (1:2000 in 1x TN-Puffer mit 4% NGS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen in Maleatpuffer für 15 Minuten. Nun wurden die Schnitte fünf Minuten mit AP-Substratpuffer (pH 9,5) inkubiert. Abschließend wurde die Färbelösung auf den Schnitt pipettiert und die Farbreaktion bei Raumtemperatur halbstündlich kontrolliert. Nach ausreichender Färbung wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten in PBS und zweimal zwei Minuten in Aqua dest. gewaschen, getrocknet und mit Immumount eingedeckelt.

3.2.2.2.4 Hybridisierung mit Fast Red

Sollten die Hirnschnitte noch einer immunhistochemischen Färbung zugeführt werden, so erfolgte die Entwicklung anstatt mit NBT/BCIP-Färbelösung für 30 Minuten mit Fast Red-Färbelösung.

3.2.2.2.5 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte am Olympus BX51-Mikroskop. Fotografien wurden mit der Software Magnafire (Optronics) angefertigt.

3.2.3 Transkardiale Perfusion und Präparation der Gehirne für die Immunhistochemie

3.2.3.1 Reagenzien und Geräte

Betäubungsmittel:

10 ml Ketanest (Parke-Davis), 4 ml Rompun (Bayer), 36 ml 0,9% NaCl (Braun)

Fixativflüssigkeit:

40g Paraformaldehyd (Merck), 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer (Merck), 500 ml Aqua bidest (Carl Roth)

0,1 M PB-Puffer, pH 7,4:

80,2 ml 1 M K_2HPO_4 , 19,8 ml 1 M KH_2PO_4

3.2.3.2 Protokoll

Den Tieren wurden ca. 0,5-1 ml/25g Körpergewicht des ketaminhaltigen Anästhetikums intraperitoneal injiziert. Sie wurden thorakotomiert, und in die linke Herzkammer wurde ein Perfusionssystem installiert. Der rechte Herzvorhof wurde eröffnet, um ein Abfließen der Perfusionsflüssigkeit zu gewährleisten. Jedes Tier wurde mit ca. 10 ml/25g Körpergewicht isotoner Kochsalzlösung vorperfundiert. Nach Entfärbung der Leber wurde mit ca. 20 ml/25g der Fixativflüssigkeit fixiert. Die Gehirne wurden freipräpariert und für 24 Stunden in 4% Paraformaldehydlösung nachfixiert.

3.2.4 Anfertigung von Vibratomschnitten

3.2.4.1 Reagenzien und Geräte

0,1 M PB-Puffer, pH 7,4:

80,2 ml 1 M K_2HPO_4 , 19,8 ml 1 M KH_2PO_4

weitere:

Microm HM650V

Thermo Scientific

3.2.4.2 Protokoll

Ein perfundiertes und nachfixiertes Gehirn wurde in 4% Agaroselösung (in 0,1 PB-Puffer) eingebettet. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Gehirn in einem Block ausgeschnitten und mittels eines Vibratoms in 50 µm dicke Scheiben geschnitten (Frequenz (f) der Klinge: 60 Hz, Geschwindigkeit (v) der Klinge: 1 mm/s).

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen

3.2.5.1 Reagenzien und Geräte

Primäre Antikörper:

Name	Herkunft Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-GFAP	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-Iba1	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-NeuN	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-Neurofilament	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-RIP	Maus, monoklonal	Chemicon	1:1000
Anti-Toll-like Rezeptor 7	Kaninchen, polyklonal	Biomol	1:500
Anti-Toll-like Rezeptor 9	Kaninchen, polyklonal	Imgenex	1:200

Sekundäre Antikörper:

Name	Herkunft Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen-Alexa 488	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Kaninchen-Alexa 568	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Maus-Alexa 488	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Maus-Alexa 568	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Kaninchen, biotinyliert	Ziege	Vector Laboratories	1:250

10x PBS, pH 7,4:

2g KCl, 2g KH₂PO₄, 80g NaCl, 14,4g Na₂HPO₄·2H₂O, 1l H₂O

0,1 M PB-Puffer, pH 7,4:

80,2 ml 1 M K₂HPO₄, 19,8 ml 1 M KH₂PO₄

Weitere:

NGS (Normales Ziegenserum)

Vector Laboratories

Triton X-100	Carl Roth
VECTASTAIN Elite ABC Kit (Standard)	Vector Laboratories
Immumount	Thermo Shandon
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories

3.2.5.2 Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung an Vibratomschnitten

Die Vibratomschnitte wurden zunächst für 60 Minuten mit normalem Ziegenerum (NGS, 10% in 0,1 M PB-Puffer) behandelt, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Nachfolgend wurden die Schnitte bei 4°C in einer Lösung aus den Primärantikörpern, NGS (5%) und Triton X-100 (0,1%) in 0,1 M PB-Puffer entwickelt. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PB-Puffer wurden die Schnitte bei 4°C in einer Lösung aus gegen die Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpern in NGS (5%) und Triton X-100 (0,1%) in 0,1 M PB inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für fünf Minuten in 0,1 M PB folgten eine Färbung mit DAPI (1:10.000) über eine Minute und erneutes dreimaliges und fünfminütiges Waschen in 0,1 M PB-Puffer. Hiernach wurden die Schnitte auf Objektträger aufgebracht und mit Immumount eingedeckelt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt in Pappmappen bei 4°C.

3.2.5.3 Protokoll für die 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung an Vibratomschnitten

Für die DAB-Färbung wurde nach der Inkubation mit dem Primärantikörper dreimal mit 0,1 M PB gewaschen und dann für 60 Minuten mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde eine DAB-Färbung mithilfe des VECTASTAIN Elite ABC Kit gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Zum Abschluss wurden die Zellen erneut dreimalig mit 0,1 M PB-Puffer gewaschen und mit Vectashield eingedeckelt.

3.2.5.4 Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen

Adhärenente Zellen wurden auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Glasplättchen in 24-Well-Platten kultiviert. Diese wurden dreimal mit PBS gewaschen und für zehn Minuten mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und dann für 30 Minuten mit 1% Triton X-100 in 1,5% NGS in PBS lysiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 0,1% Triton X-100 in 0,5% NGS in PBS. Daraufhin wurde erneut dreimal

mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der ebenfalls in 0,1% Triton X-100 in 0,5% NGS in PBS gelöst wurde. Zum Abschluss wurden die Zellen erneut dreimalig mit PBS gewaschen und mit Vectashield eingedeckelt.

3.2.5.5 Protokoll für das Immunostaining von Fast Red-gefärbten Kryostatschnitten nach *In-situ*-Hybridisierung

Zum Teil wurden Kryostatschnitte, die zuvor mit einer Fast Red-*In-situ*-Hybridisierung behandelt worden waren, zum Zwecke einer Kolokalisation noch einer Immunfluoreszenzfärbung zugeführt. Hierzu wurden die Schnitte nach der Inkubation mit Fast Red-Färbelösung nicht eingedeckelt. Stattdessen wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten mit PB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden diese in 5% NGS (in 0,1 M PB-Puffer mit 0,1% Triton X-100) geblockt. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper in 1% NGS (in 0,1 M PB-Puffer mit 0,1% Triton X-100) inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für fünf Minuten in 0,1 M PB-Puffer. Nun wurde der Sekundärantikörper ebenfalls in 1% NGS (in 0,1 M PB-Puffer mit 0,1% Triton X-100) auf die Schnitte pipettiert und im Dunkeln inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für jeweils fünf Minuten in 0,1 M PB-Puffer. Anschließend wurde 0,0001% DAPI auf die Schnitte pipettiert. Nach fünf Minuten folgte dreimaliges Waschen für fünf Minuten in 0,1 M PB-Puffer. Die Schnitte wurden lichtgeschützt getrocknet, mit Immumount eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

3.2.5.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfärbungen wurden entweder mittels des konfokalen Laserscanning Mikroskops SL von Leica mit den Anregungswellenlängen (488, 543 nm Laser) der an die Sekundärantikörper gekoppelten Farbstoffe untersucht und fotografisch aufgenommen oder am Olympus BX51 Mikroskop mit der Software Magnafire (Optronics, CA, USA) fotografiert.

3.2.5.6.1 Konfokale Mikroskopie

Ein Konfokalmikroskop ist ein Mikroskop, bei dem im Gegensatz zur normalen Lichtmikroskopie nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern zu jedem Zeitpunkt nur ein bestimmter Punkt davon. Mit einem Laser wird das Präparat Punkt für Punkt abgerastert. Im Mikroskop entsteht also zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild. Die Lichtintensitäten emittierten Lichtes werden nacheinander an allen Orten des Präparats gemessen, so dass eine

anschließende Konstruktion des Bildes möglich ist. Die Besonderheit des Konfokalmikroskops besteht darin, dass im Strahlengang des detektierten Lichts eine Lochblende angebracht ist, die Licht, welches von außerhalb der Schärfenebene kommt, blockieren kann. Hierdurch steigt die Auflösung entlang der optischen Achse.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Herstellung primärer Neuronenkulturen

3.3.1.1 Reagenzien und Geräte

Poly-D-Lysin	Gibco
Aqua dest.	Carl Roth
HBSS (+Ca/Mg)	Gibco
Trypsin	Gibco
Neurobasal Medium plus B27	Gibco

3.3.1.2 Protokoll

Zur Beschichtung der Deckgläschen wurde 1 mg/ml Poly-D-Lysin im Verhältnis 1:49 mit Aqua dest. verdünnt und die Deckgläschen hiermit über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor der Präparation wurde das überschüssige Poly-D-Lysin von den Plättchen abgezogen und diese zweimal mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurden sie unter der Sterilbank luftgetrocknet. Für die Präparation primärer Neuronen wurde eine E17-Maus per Genickbruch getötet. Nach Desinfektion des Bauchfells mit 70% Ethanol folgte die mediane Laparotomie und Entnahme der Embryonen. Diese wurden in 4°C kaltes HBSS (+Ca/Mg) überführt. Der Embryo wurde freigelegt, der Kopf abgeschnitten und in einer Petrischale unter das Binokular gelegt. Mit einer Feinschere wurden die Haut und die Kalotte aufgebrochen und das Gehirn entnommen. Das Kleinhirn und der Hypothalamus wurden entfernt. Die Hirnhälften wurden getrennt und die Meningen mit einer Pipette abgezogen. Insgesamt wurden sechs Kortexhälften in einem Falcon-Röhrchen mit HBSS (+Ca/Mg) gesammelt und anschließend dreimal mit 5 ml HBSS (+Ca/Mg) gespült. Bei der letzten Spülung wurden 3,5 ml HBSS (+Ca/Mg) im Röhrchen belassen und mit 500 µl Trypsin (2,5%) aufgefüllt. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation im Wasserbad. Danach erfolgte eine Neutralisation des Trypsins mit 2 ml fetalem Kälberserum (FKS). Der Überstand wurde abgesaugt und die Hirne dreimal mit HBSS (+Ca/Mg) gespült. Anschließend wurden 100 µl DNase dazugegeben und unter leichtem Schwenken zehn Sekunden inkubiert.

Nun wurde dreimal mit Neurobasal Medium gewaschen. Beim dritten Mal wurden 2 ml Medium belassen und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. Nun wurden erneut 10 ml Neurobasal Medium hinzugegeben und auf- und abpipettiert, so dass ein Homogenat entstand. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 rpm und 4°C. Der Überstand wurde nun in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 1200 rpm und 4°C. Das Pellet wurde in 10 ml Neurobasal Medium aufgenommen. 50 µl der Suspension wurden zusammen mit 50 µl Trypanblau gemischt und in einer Zellkammer gezählt.

Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl in mit Poly-D-Lysin beschichteten Flaschen ausplattiert (Immunzytochemie: ca. 40.000 Zellen/cm², RNA-Isolierung: ca. 100.000 Zellen/cm²). Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einer 5% CO₂-Atmosphäre. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Mediums gewechselt. Nach einer Woche wurde das Medium komplett ausgetauscht.

3.3.2 Herstellung primärer Mikrogliaulturen

3.3.2.1 Reagenzien und Geräte

10x PBS, pH 7,4:

2g KCl, 2g KH₂PO₄, 80g NaCl, 14,4g Na₂HPO₄x2H₂O, 1l H₂O

DMEM supplementiert:

10% FKS, 5% Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech)

weitere:

0.25% Trypsin/EDTA-Lösung

Gibco

3.3.2.2 Protokoll

Für die Herstellung der primären Mikrogliaulturen wurden die Gehirne von neugeborenen C57BL/6J-Mäusen (P0-P3) verwendet. Zunächst wurde das Großhirn vorsichtig von Blutgefäßen und Meningen befreit und anschließend für zwei Minuten mit 0,25% Trypsin in PBS behandelt. Danach wurde es mit einer abgeflamten Pipette dissoziiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die so erhaltenen Zellen wurden dann in DMEM mit 10% fetalem Kälberserum und 5% Penicillin/Streptomycin überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter

Standardbedingungen (37°C, 10% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Nach fünf bis sieben Tagen hatte sich auf den Böden der Zellkulturflaschen eine konfluente Zellschicht gebildet. Die Mikroglia wurden nun für 30 Minuten bei 180 rpm abgeschüttelt und in DMEM mit 10% FKS kultiviert.

3.3.3 Kultivierung und neurale Induktion der P19 (EC)-Zellreihe

3.3.3.1 Reagenzien und Geräte

P19-Wachstumsmedium (P19WM):

Eagle's minimal essential medium (α MEM, Sigma), 10% fetales Kälberserum (FKS, Gibco), 2 mM L-Glutamin, 50 u/ml Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech)

P19-neurales Induktionsmedium (P19NIM):

Eagle's minimal essential medium (α MEM, Sigma), 10% fetales Kälberserum (FKS, Gibco), 2 mM L-Glutamin, 50 u/ml Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech), 500 nM all-trans Retinsäure

weitere:

0.25% Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco
Neurobasal Medium plus B27	Gibco

3.3.3.2 Protokoll

P19 EC-Zellen sind pluripotente Stammzellen eines Teratokarzinoms aus C3H/He-Mäusen. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in P19-Wachstumsmedium kultiviert. Zur neuralen Induktion wurden 1.000.000 Zellen in P19NIM inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Zellen mit 0.25% Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und in P19WM ausplattiert. Nach zwei Tagen wurde das Medium gegen Neurobasal Medium plus B27 ausgetauscht.

3.3.4 Kultivierung von Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen

3.3.4.1 Reagenzien und Geräte

DMEM supplementiert

10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 u/ml Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech)

weitere:

Binder C150-Inkubator	Binder
-----------------------	--------

3.3.4.2 Protokoll

Die Kultivierung der HEK-293-Zellen erfolgte in supplementiertem DMEM in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Zweimal pro Woche wurden die Zellen in DMEM gewaschen und abzentrifugiert (fünf Minuten, 1200 g, 4°C). Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 in neues supplementiertes Medium umgesetzt.

3.3.5 Stimulation von primären Neuronen mit TLR7-Liganden

3.3.5.1 Reagenzien und Geräte

Imiquimod	Sigma Aldrich
ssRNA40	Invivogen

3.3.5.2 Protokoll

Primäre Neuronen (40.000 Zellen/cm²) wurden mit den TLR7-Liganden Imiquimod und ssRNA40 stimuliert (beide 10µg/ml in Neurobasal Medium). Eine Negativkontrolle mit 0,1 M PB-Puffer in Neurobasal Medium wurde mitgeführt. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI und einem Anti-NeuN-Antikörper (s.o.) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Expression von Toll-like Rezeptoren auf mRNA-Ebene im Mausgehirn während der Entwicklung

4.1.1 Expressionsanalyse mittels Real-Time-PCR

Das Protein Toll der Taufliege hat sowohl eine Funktion bei der Immunantwort als auch bei der Entwicklung der dorsoventralen Achse der Fliegenlarve. In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Toll-like Rezeptoren in Säugetieren möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung des ZNS spielen. Im ersten Schritt wurde die Expression der mRNA der Toll-like Rezeptoren 1-9 sowie des Adapterproteins MyD88 während der Entwicklung des murinen Gehirns mithilfe der Real-Time-PCR untersucht. Zunächst wurden die entsprechenden Primer ausgewählt und die PCR-Bedingungen festgelegt. Die Länge der Amplikons der Primer wurde in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Größe aller elf Amplikons stimmte hierbei mit der vom Hersteller der Primer angegebenen Größe überein (Abb. 1). Mithilfe der Schmelzkurven konnte in späteren Versuchen, bei denen keine Gelelektrophorese mehr durchgeführt wurde, die korrekte Größe der Amplikons überprüft werden.

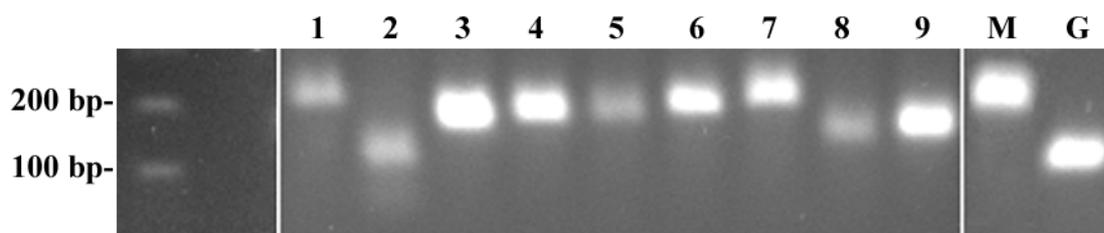


Abbildung 1: Die Amplikongrößen der Primer entsprechen den Angaben des Herstellers.

1: Toll-like Rezeptor 1: 200 bp	2: Toll-like Rezeptor 2: 109 bp	3: Toll-like Rezeptor 3: 171 bp
4: Toll-like Rezeptor 4: 180 bp	5: Toll-like Rezeptor 5: 177 bp	6: Toll-like Rezeptor 6: 189 bp
7: Toll-like Rezeptor 7: 202 bp	8: Toll-like Rezeptor 8: 150 bp	9: Toll-like Rezeptor 9: 160 bp
M: MyD88: 205 bp	G: GAPDH: 128 bp	

Es wurde die Genexpression in Großhirnhomogenaten der Altersstufen E13-E19, P0, P4, P8, P12 und P5m gemessen (Nach gängiger Konvention wird das Alter eines Mäusembryos mit E(x) abgekürzt, wobei x das Alter in Tagen angibt. P(x) bezeichnet das Alter einer Maus in Tagen und P(x)m das Alter in Monaten). In jeder Alterstufe wurden drei Tiere untersucht. Die Großhirne der Mäuse wurden präpariert und homogenisiert. Anschließend erfolgte die Präparation der mRNA, die dann in cDNA umgeschrieben wurde. Diese wurde schließlich mithilfe der spezifischen Primer in der QPCR gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode auf das Housekeeping-Gen GAPDH bezogen. Die Expressionsintensitäten der einzelnen Altersstufen wurden dann mit

der Intensität der Altersstufe E13 verglichen. Die Auswertung der QPCR-Versuche ergab keine signifikante Veränderung der Expression von mRNA der Toll-like Rezeptoren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und MyD88 im Verlauf der Entwicklung (Abb. 2a und 2b).

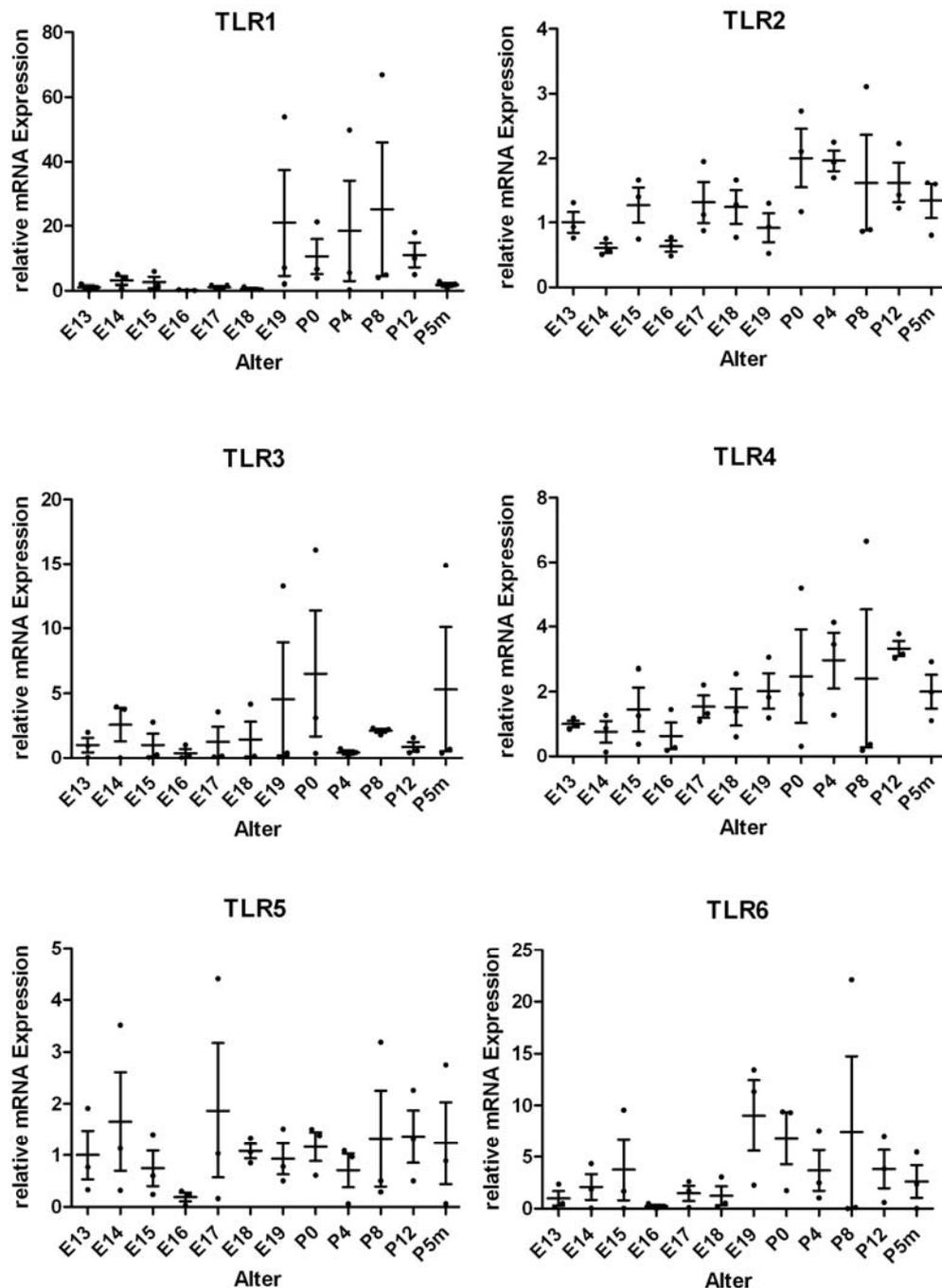


Abbildung 2a: Die Expression der Toll-like Rezeptoren 1-6 im Mausgehirn unterliegt keiner signifikanten Regulation während der Entwicklung. Die Expression der TLR-mRNA in Großhirnen von C57BL/6J-Mäusen verschiedener Altersstufen wurde mithilfe der Real-Time-PCR gemessen. Auf der x-Achse ist das Alter der Tiere aufgetragen, auf der y-Achse das Verhältnis der entsprechenden $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte zum arithmetischen Mittel der drei E13-Werte (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Auffällige Expressionsmuster ergaben sich jedoch für TLR7 und TLR9 (Abb. 2b). Die Expression von TLR7 steigt kurz vor der Geburt an und erreicht ihren Höhepunkt um P4 mit einer ca. 40-fachen Expression im Vergleich zu E13. Im weiteren Verlauf sinkt sie wieder ab. Nach fünf Monaten postnatal ist sie im Vergleich zu E13 noch ca. 8-fach erhöht. Die Expression von TLR9 hingegen steigt über die gesamte Entwicklung konstant an. Zum Zeitpunkt P5m ist sie 13-fach erhöht im Vergleich zu E13. Die Expression der Toll-like Rezeptoren 7 und 9 zeigt damit ein spezifisches Muster im Verlauf der Entwicklung.

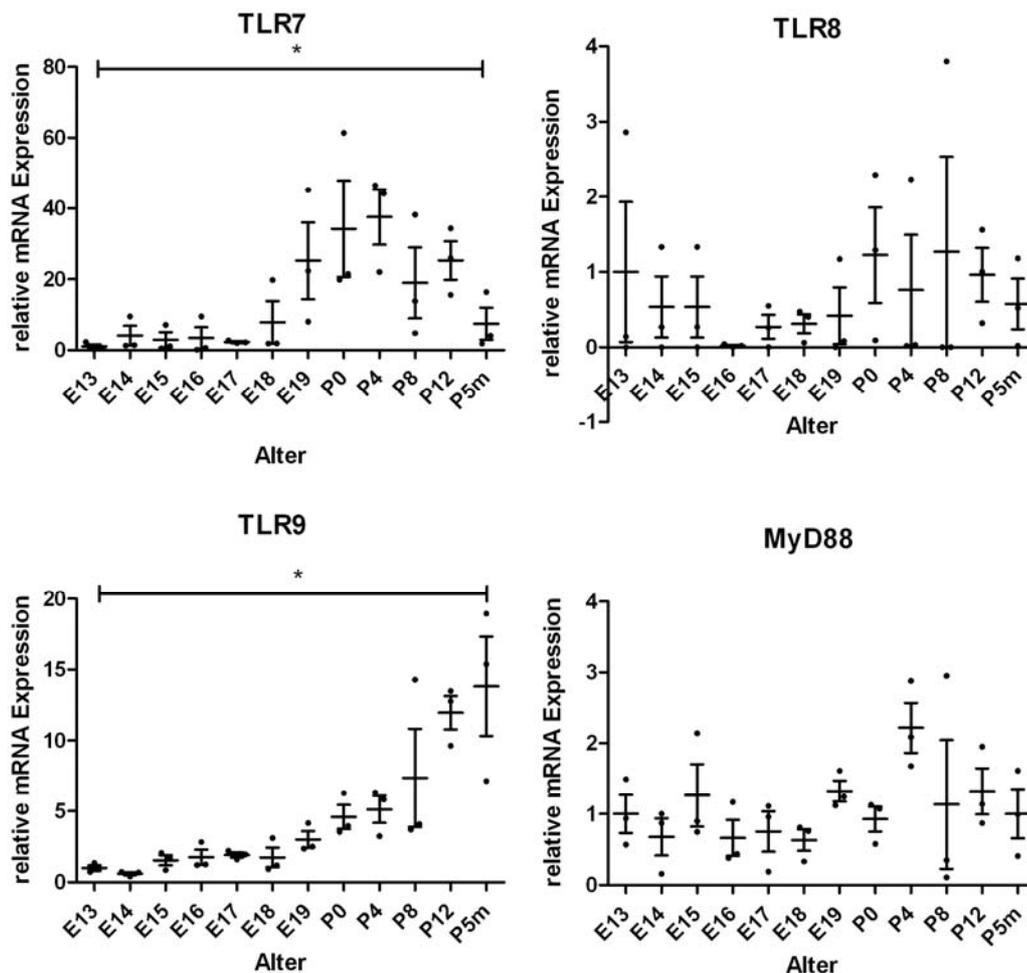


Abbildung 2b: Die Expression der Toll-like Rezeptoren 7 und 9 im Mausgehirn von C57BL/6J-Mäusen zeigt eine signifikante Regulation im Verlauf der Entwicklung; die Expression von TLR8 und MyD88 wird nicht reguliert. Die Expression der TLR-mRNA in Großhirnen von C57BL/6J-Mäusen verschiedener Altersstufen wurde mithilfe der Real-Time-PCR gemessen. Auf der x-Achse ist das Alter der Tiere aufgetragen, auf der y-Achse das Verhältnis der entsprechenden $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte zum arithmetischen Mittel der drei E13-Werte ($n=3$). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. (*) entspricht einem $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test.

4.1.2 Expressionsanalyse mittels *In-situ*-Hybridisierung

Mithilfe der Real-Time-PCR kann die relative Expression von mRNA in Geweben gemessen werden. Die Methode gibt jedoch in der angewandten Form keine Auskunft darüber, in welchen

Zellen des ZNS die entsprechende mRNA exprimiert wird. Des Weiteren können auch keine Aussagen über die anatomische Lokalisation der entsprechenden Zellen getroffen werden. Aus diesem Grund wurde die Verteilung der TLR7-mRNA mithilfe der *In-situ*-Hybridisierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden Kryostatschnitte von C57BL/6J-Mausgehirnen ausgewählter Altersstufen angefertigt (E16, P0, P12, P5m) und mithilfe einer TLR7-spezifischen Sonde untersucht (Abb. 3). Die Hirnschnitte wurden mit einer Digoxigenin-markierten Sonde inkubiert und anschließend mit NBT/BCIP entwickelt. Es wurde eine sogenannte Scramble Sonde und eine Negativkontrolle ohne Sonde mitgeführt. Eine Scramble Sonde wird als Kontrollsonde benutzt; sie hat keinerlei Sequenzhomologie zu bekannter RNA und bindet nicht an sich selbst.

Die Auswertung der Schnitte ergab kein Signal in der Altersstufe E16, jedoch ein deutliches Signal für TLR7-mRNA in den Altern P0, P12 und P5m. Dieses Signal zeigte sich in kortikalen und hippocampalen Zellen, die morphologisch und anatomisch als Neurone eingeordnet wurden. Auffallend war, dass der Expressionsverlauf von TLR7 in der *In-situ*-Hybridisierung dem in der Real-Time-PCR gemessenen Verlauf entsprach: Ein Expressionsminimum zeigte sich in den embryonalen Altersstufen, während eine stärkere Expression in postnatalen Altersstufen zu finden war.

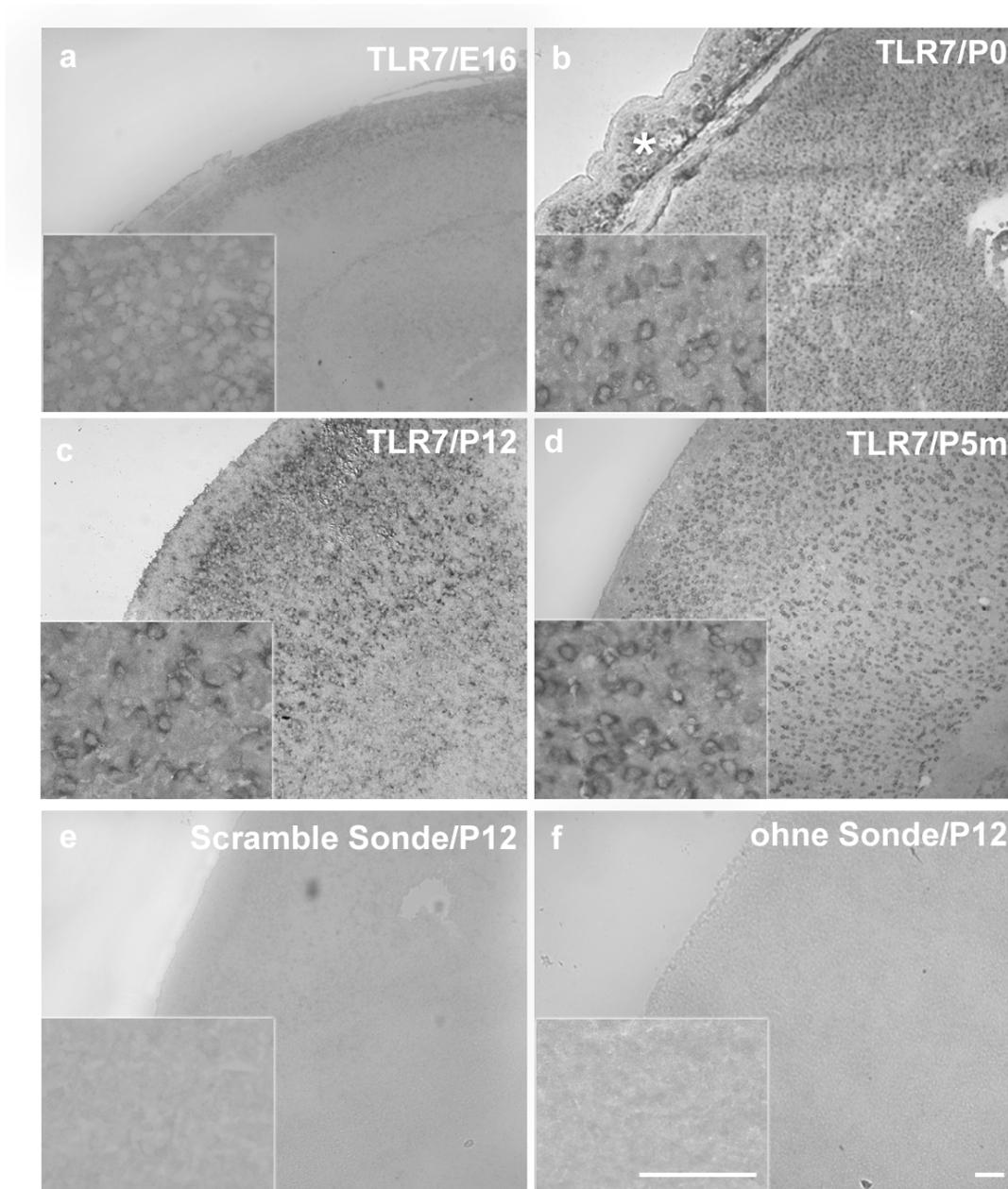


Abbildung 3: Toll-like Rezeptor 7-mRNA wird in Zellen exprimiert, die das Verteilungsmuster von Neuronen zeigen. *In-situ*-Hybridisierung mit einer TLR7-spezifischen LNA-Sonde in C57BL/6J-Mausgehirnen der Altersstufen E16, P0, P12 und P5m. Die Färbung erfolgte mit NBT/BCIP. Als Negativkontrollen diente eine Wasserprobe („ohne Sonde“) und eine sogenannte Scramble Sonde, die keinerlei Sequenzhomologien zu bekannter RNA zeigt und nicht an sich selbst bindet. (*) in b) kennzeichnet die Schädelkalotte. Maßstab = 50 µm.

4.1.3 Expressionsanalyse mittels *In-situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob es sich bei den oben genannten TLR7-positiven Zellen tatsächlich um Neurone handelt. Aus diesem Grund wurde erneut eine *In-situ*-Hybridisierung mit der TLR7-spezifischen Sonde durchgeführt, wobei als Detektionssystem Fast Red anstatt NBT/BCIP benutzt wurde. Fast Red ist ein Detektionssystem, das im Gegensatz zu

NBT/BCIP auch Kofärbungen mit Immunfluoreszenz erlaubt. Nach der *In-situ*-Hybridisierung wurden die Kryostatschnitte mit einem Antikörper gegen das Neuronale Kernprotein (NeuN) und anschließend mit einem Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert (Abb. 4). Die Inkubation mit der TLR7-Sonde und Fast Red ergab das aus der NBT/BCIP-Färbung bekannte Muster einer zytosolischen Färbung von Zellpopulationen in Kortex und Hippocampus. Die Inkubation mit dem Anti-NeuN-Antikörper ergab eine neuronale Kernfärbung. Die Auswertung erfolgte in der konfokalen Mikroskopie. In der Zusammensicht beider Färbungen ergab sich eine neuronale Kernfärbung umgeben von der zytosolischen TLR7-Färbung. Folglich konnten die TLR7-positiven Zellen im Kortex als Neurone identifiziert werden.

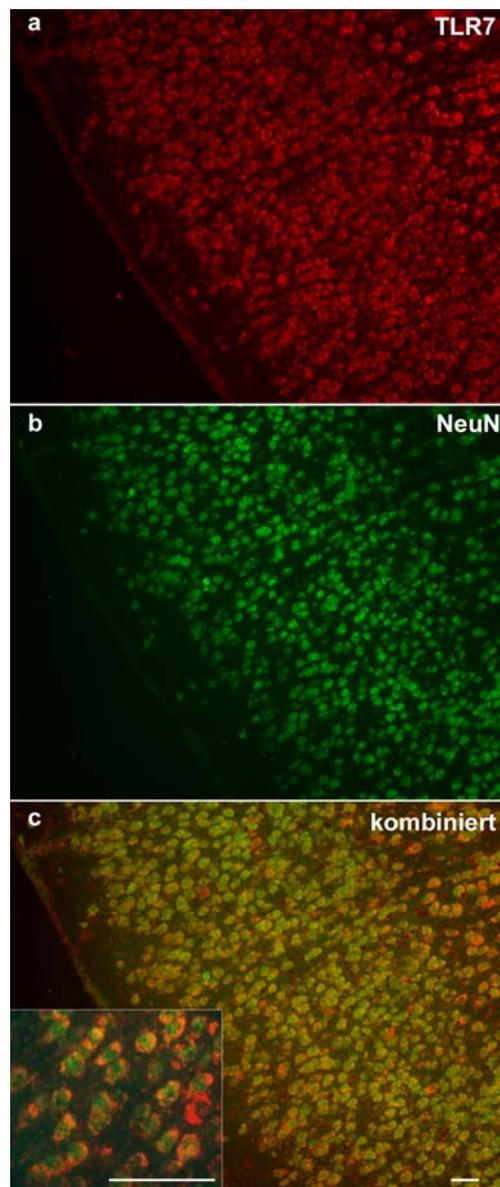


Abbildung 4: Neurone exprimieren TLR7-mRNA. *In-situ*-Hybridisierung mit einer TLR7-spezifischen LNA-Sonde in einem C57BL/6J-Maushirn der Altersstufe P12, gefolgt von einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-NeuN-Antikörper. Maßstab in c) = 100 μm , Maßstab in Ausschnittsvergrößerung von c) = 50 μm .

4.2 Expressionsanalyse von TLR7- und TLR9-Protein im Mausgehirn während der Entwicklung

Aufgrund posttranskriptionaler Regulationsmechanismen kann von der vorhandenen Menge mRNA in einer Zelle nicht automatisch auf die Proteinmenge geschlossen werden. Auch kann auf mRNA-Ebene keine Aussage über die zelluläre Lokalisation des zugehörigen Proteins gemacht werden. Daher wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit die Proteinexpression der Toll-like Rezeptoren 7 und 9 mithilfe spezifischer Antikörper immunfluoreszenzhistochemisch untersucht.

4.2.1 Spezifität der angewendeten TLR7- und TLR9-Antikörper

Zunächst sollte die Spezifität der kommerziell erhältlichen Anti-TLR7- und Anti-TLR9-Antikörper geprüft werden, denn obwohl in den letzten Jahren viele Antikörper gegen Toll-like Rezeptoren entwickelt wurden, sind diese leider nicht immer spezifisch.

Hierfür wurden die HEK-293-Zellen zum einen mit einem Green Fluorescent Protein (GFP)-gekoppelten TLR7-Vektor und zum anderen mit einem DsRED- und einem TLR9-Vektor kotransfiziert. In beiden Fällen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt: zum einen eine Transfektion mit einem GFP-gekoppelten Leervektor allein, zum anderen eine Transfektion mit einem DsRed-Vektor allein.

Die transfizierten HEK-293-Zellen wurden anschließend mit dem Anti-TLR7- bzw. Anti-TLR9-Antikörper per Immunfluoreszenzhistochemie gefärbt. Die mit TLR7 transfizierten Zellen konnten spezifisch mit einem Anti-TLR7-Antikörper angefärbt werden, die mit TLR9 transfizierten Zellen zeigten eine spezifische Färbung mit einem Anti-TLR9-Antikörper. Nichttransfizierte Zellen wurden von den Antikörpern nicht eingefärbt. Somit wurde die Spezifität der Antikörper nachgewiesen (Abb. 5 und 6).

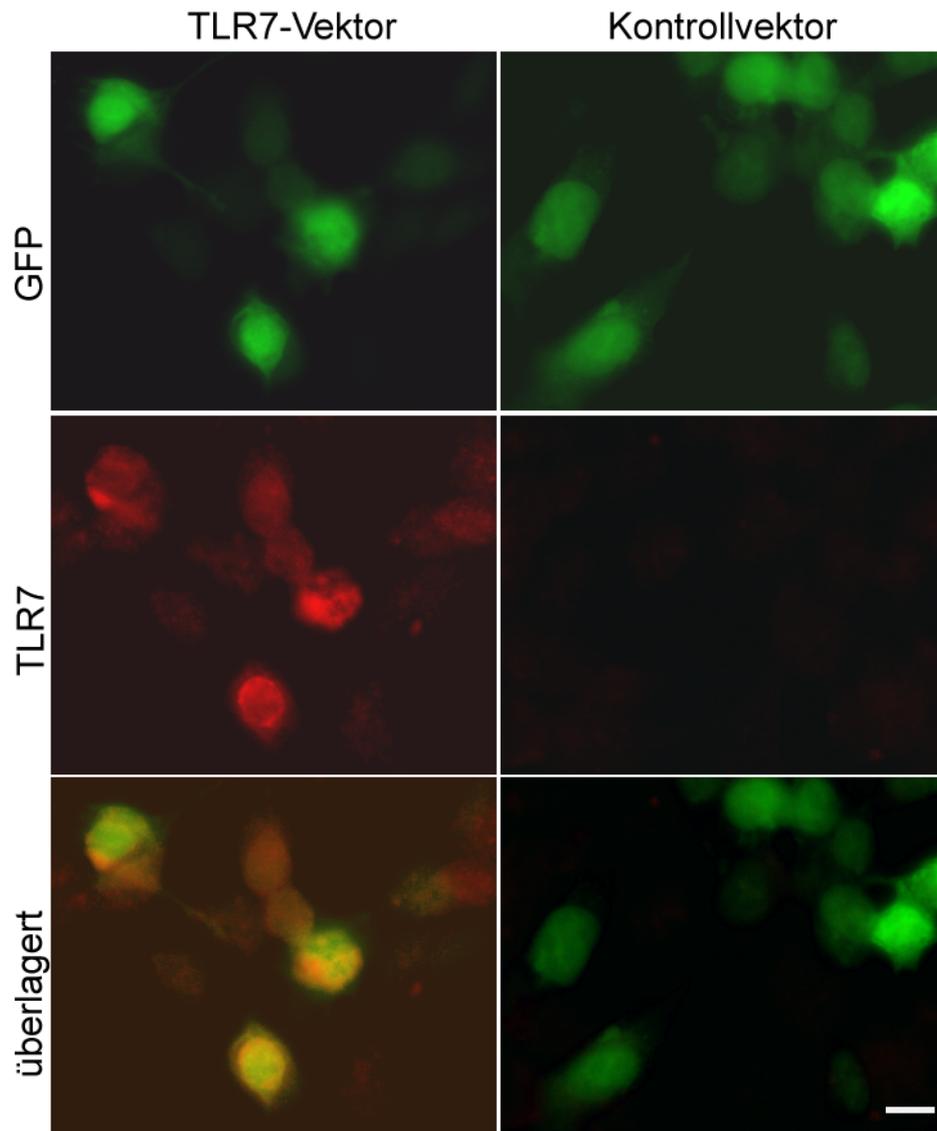


Abbildung 5: Der TLR7-Antikörper färbt spezifisch mit TLR7 transfizierte HEK-293-Zellen an. HEK-293-Zellen wurden mit einem GFP-gekoppelten TLR7-Vektor und einem GFP-gekoppelten Leervektor transfiziert und anschließend mit dem Anti-TLR7-Antikörper inkubiert. Maßstab = 10 μ m.

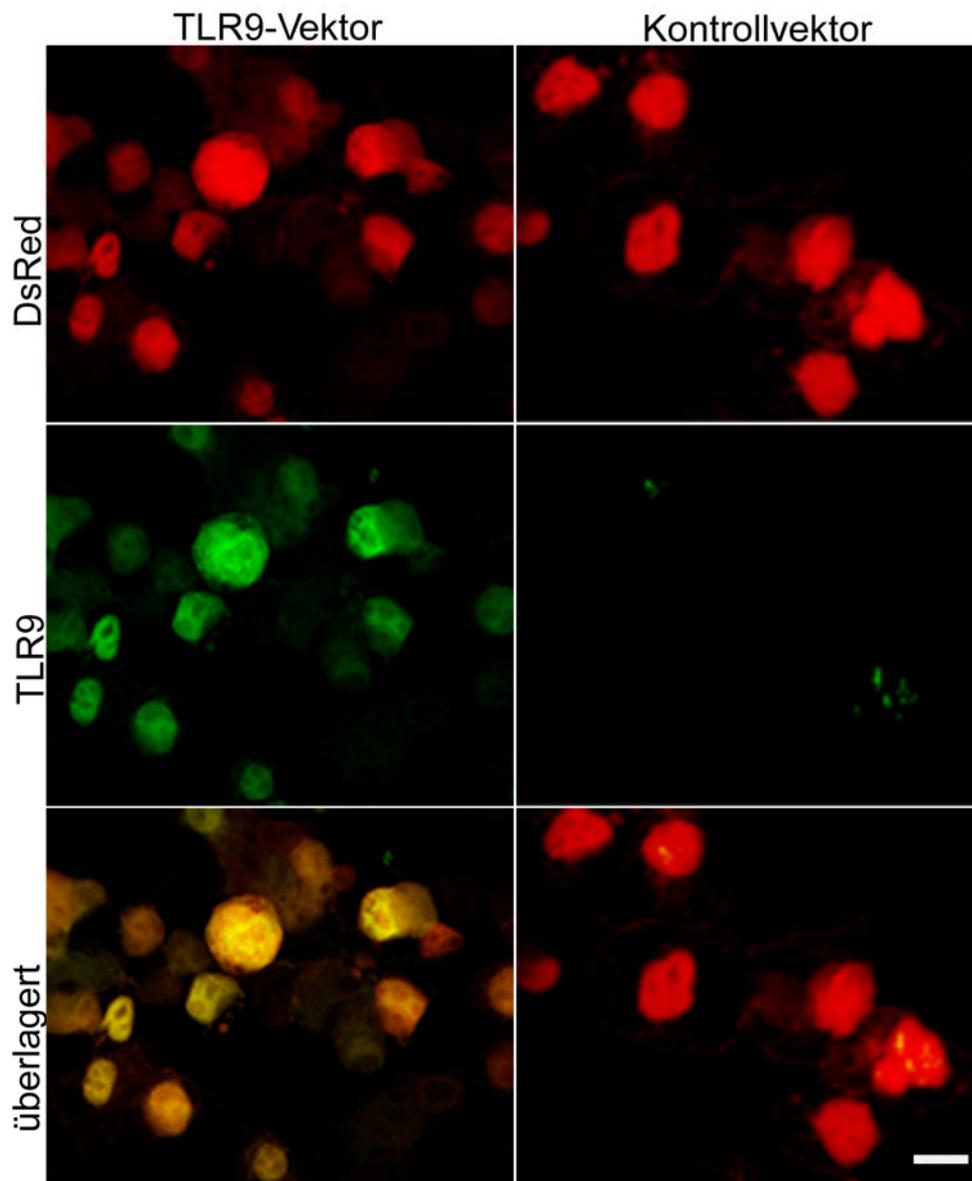


Abbildung 6: Der TLR9-Antikörper färbt spezifisch mit TLR9 transizierte HEK-293-Zellen an. HEK-293-Zellen wurden mit einem TLR9- und einem DsRed-Vektor kotransfiziert; als Negativkontrolle diente eine Transfektion mit DsRed. Die transfizierten Zellen wurden dann mit einem Anti-TLR9-Antikörper gefärbt. Maßstab = 10 μ m.

4.2.2 Expressionsanalyse von TLR7-Protein im Mausgehirn während der Entwicklung *in vivo*

Als Nächstes wurden Vibratom-Hirnschnitte von Mäusen der Altersstufen E16, P0, P12 und P5m mit dem Anti-TLR7-Antikörper per Immunfluoreszenz gefärbt. Die Färbung ergab zunächst ein ähnliches Verteilungsmuster wie die *In-situ*-Hybridisierung und zwar insofern, als ebenfalls Zellkörper mit neuronalem Verteilungsmuster im Kortex angefärbt wurden. Während eine Färbung in der Altersstufe E16 nicht nachweisbar war, ergab sich in den Altersstufen P0, P12 und P5m ein kräftiges zytosolisches Signal.

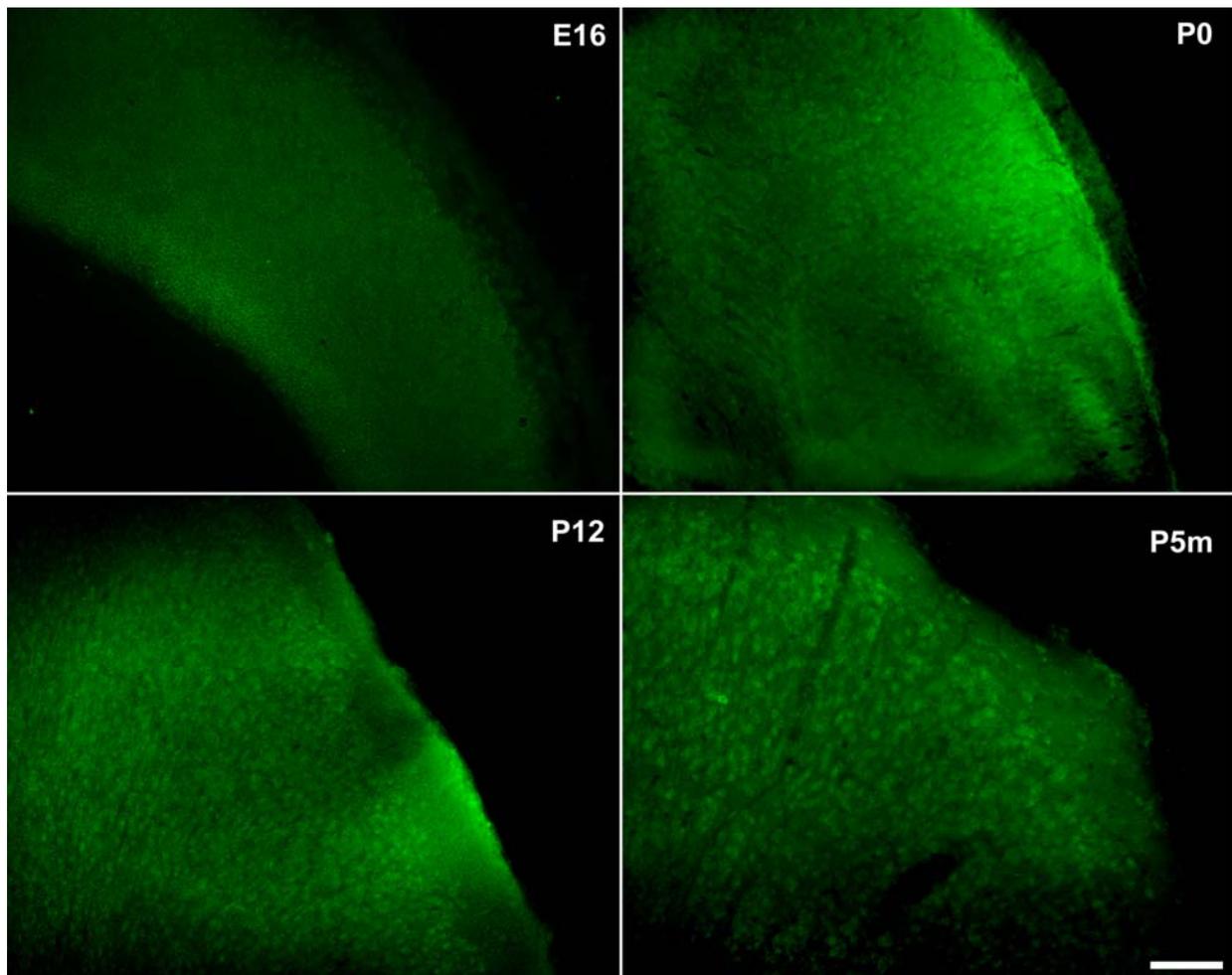


Abbildung 7: In den Altersstufen P0, P12 und P5m wird TLR7-Protein in Zellen mit neuronalem Verteilungsmuster exprimiert. Es wurden Hirnschnitte von C57BL/6J-Mäusen der Altersstufen E16, P0, P12, P5m mit einem Anti-TLR7-Antikörper gefärbt. Maßstab = 100 μ m.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Zellpopulation tatsächlich um Neurone handelt, wurde eine Kofärbung mit einem Anti-NeuN-Antikörper durchgeführt und in der konfokalen Mikroskopie ausgewertet (Abb. 8). Die Färbung mit dem NeuN-Antikörper ergab wiederum die bekannte Färbung neuronaler Zellkerne, welche von der eher zytosolisch anmutenden TLR7-Färbung umgeben war. Auf diese Weise konnten die Zellen als Neurone identifiziert werden.

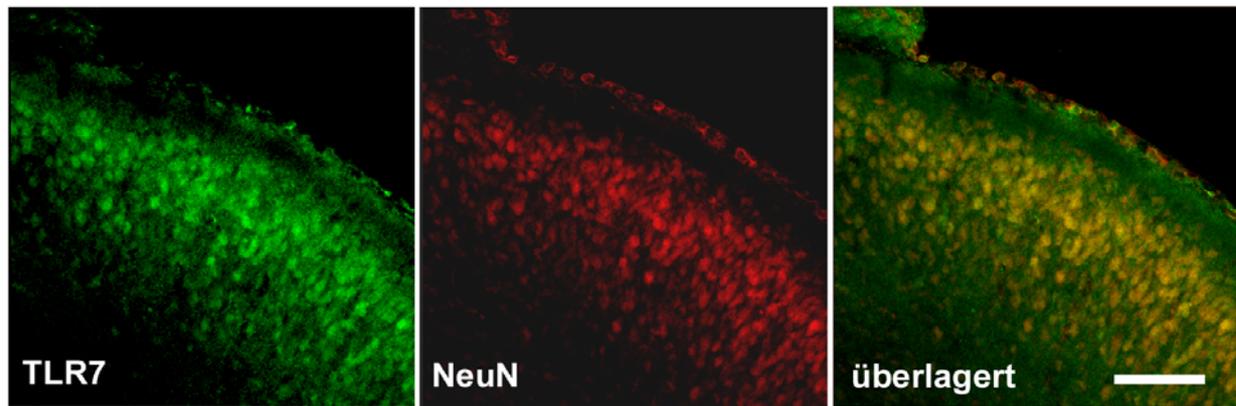


Abbildung 8: Neurone exprimieren TLR7-Protein. Es wurden Hirnschnitte einer C57BL/6J-Maus mit einem Anti-TLR7-Antikörper und einem Anti-NeuN-Antikörper gefärbt. Konfokale Mikroskopie. Alter = P12. Maßstab = 50 μm .

4.2.3 Expressionsanalyse von TLR7-Protein in Axon-ähnlichen Strukturen *in vivo*

Abgesehen von neuronalen Zellkörpern fielen in der Färbung mit dem TLR7-Antikörper jedoch auch faserartige Strukturen auf, die ein axonales Verteilungsmuster zeigten. Diese Fasern waren in der Altersstufe P12 am zahlreichsten, wohingegen in der Altersstufe P5m nur einzelne Fasern gefunden wurden. In den Altersstufen E16 und P0 konnten keine Fasern identifiziert werden. Die Fasertrakte wurden vor allem im Striatum, in der Umgebung der Nuclei septi laterales, des Corpus callosum und der hippocampalen Fimbrie nachgewiesen (Abb. 9).

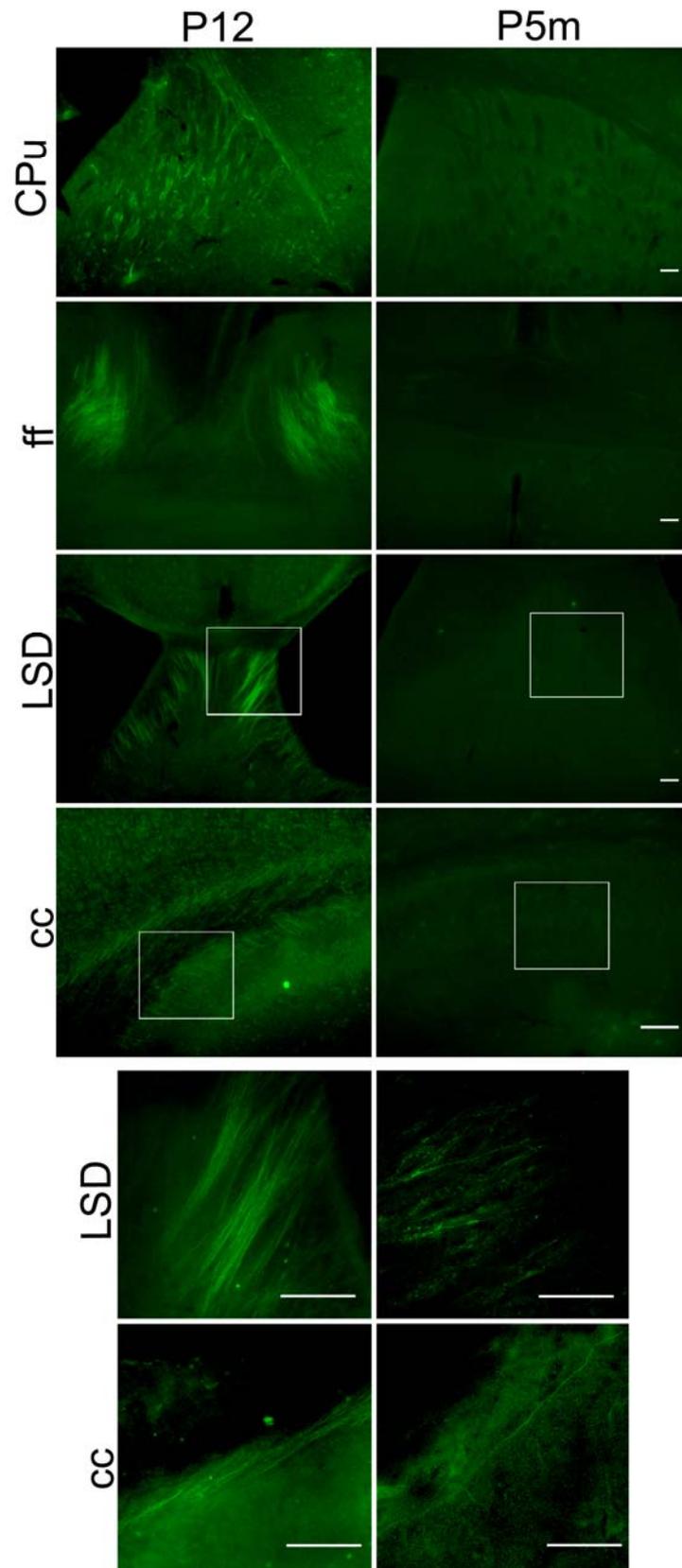


Abbildung 9: TLR7-positive Fasertrakte finden sich vermehrt in der Altersstufe P12 im Vergleich zur Altersstufe P5m. Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-TLR7-Antikörper in C57BL/6J-Maushirnen der Altersstufen P12 und P5m. CPU: kaudales Putamen, LSD: dorsales laterales Septum, ff: Fimbria, Fornix, cc: Corpus callosum. Maßstab = 100 μm.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die TLR7-positiven Fasern mithilfe von Kofärbungen näher zu charakterisieren. Hierzu wurden Antikörper gegen Antigene von Oligodendrozyten, Neuronen, Mikroglia und Astrozyten verwendet (Abb. 10a-d). Zunächst wurden P12-Schnitte mit einem Anti-Neurofilament-Antikörper und anschließend mit dem Anti-TLR7-Antikörper gefärbt. Die Auswertung erfolgte in der konfokalen Mikroskopie. Die Neurofilament-Färbung ergab das bekannte Bild einer axonalen Färbung. Beispielhaft wird hier ein Ausschnitt des striatalen Faserbündels gezeigt (Abb. 10a). Die TLR7-Färbung ergab das Bild der oben beschriebenen Fasern (Abb. 9). Es zeigte sich jedoch keine Kolokalisation zwischen den beiden Färbungen. Die TLR7-positiven Fasern fanden sich aber häufig innerhalb neuronaler Faserbündel. Die Lage der Fasern innerhalb von axonalen Faserbündeln und die charakteristische Morphologie (Abb. 10a) macht die Annahme naheliegend, dass es sich um Subtypen von Axonen handelt, die sich mit dem hier benutzten Neurofilament-Antikörper nicht anfärben lassen.

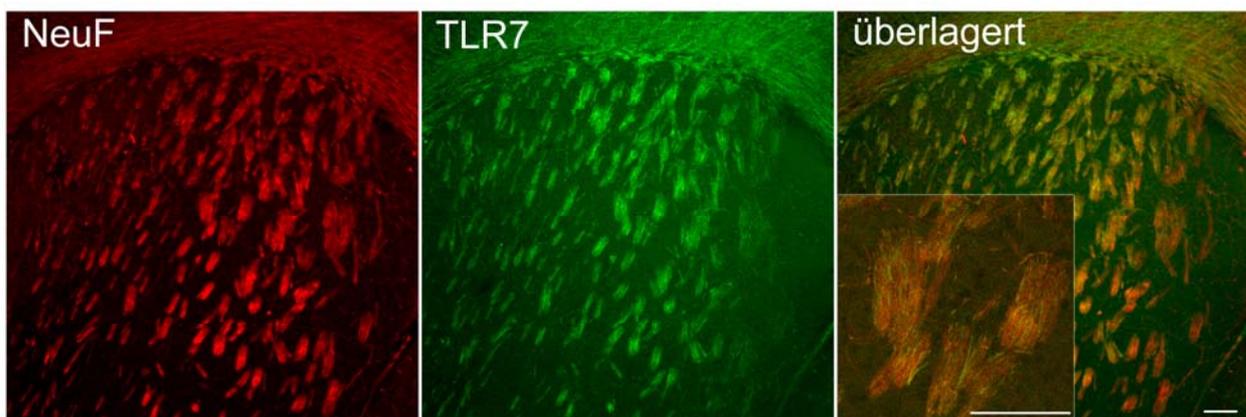


Abbildung 10a: TLR7-positive striatale Fasertrakte exprimieren kein Neurofilament. Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-TLR7- und einem Anti-Neurofilament-Antikörper im Striatum eines C57BL/6J-Maushirns der Altersstufe P12. Konfokale Mikroskopie. Maßstab = 100 μ m.

Als nächstes sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den TLR7-positiven Fasern um Fortsätze von Astrozyten handelt. Zu diesem Zweck wurden Hirnschnitte der Altersstufe P12 mit einem Anti-GFAP-Antikörper behandelt. Die Färbung ergab das bekannte zytoplasmatische Muster der GFAP-Färbung, das sich aus der spezifischen Reaktion des Antikörpers mit den Intermediärfilamenten von Astrozyten ergibt. Nach Färbung mit dem Anti-TLR7-Antikörper ergab sich das oben beschriebene Muster von Fasern mit axonalem Verteilungsmuster. Es fand sich keine Kolokalisation zwischen der TLR7-Färbung und der GFAP-Färbung.

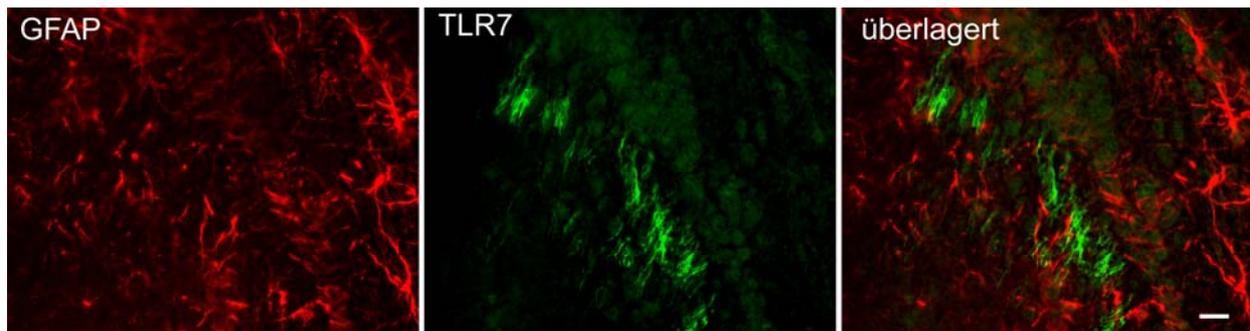


Abbildung 10b: TLR7-positive Fasern kolokalisieren nicht mit GFAP. Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-TLR7- und Anti-GFAP-Antikörpern an einem Maushirn der Altersstufe P12. Maßstab = 10 μm .

Auch Oligodendrozyten sollten als Korrelat der TLR7-positiven Fasern ausgeschlossen werden; es wurde eine Immunfärbung eines Mausgehirns der Altersstufe P12 mit einem Anti-RIP-Antikörper durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung des Schnitts ergab das erwartete Muster einer Oligodendrozyten-Färbung. Eine Kofärbung mit dem Anti-TLR7-Antikörper ergab das oben beschriebene Bild. Eine Kolokalisation zwischen der Anti-RIP- und der Anti-TLR7-Färbung konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Ausschnitt aus der Region des Corpus callosum ist in Abbildung 10c dargestellt.

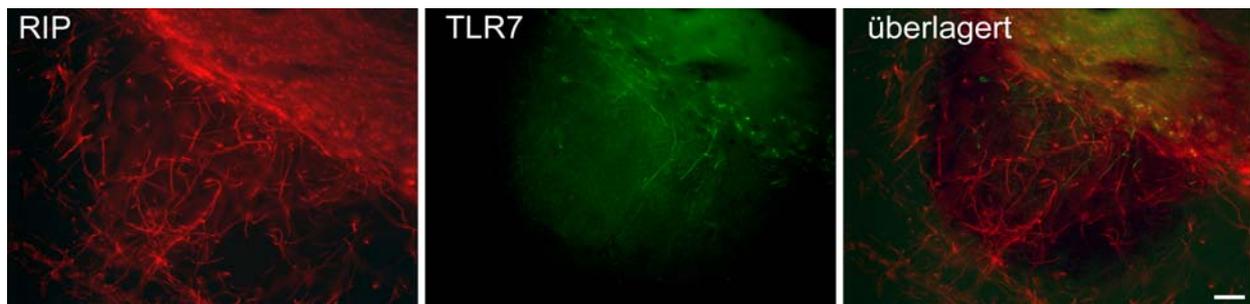


Abbildung 10c: TLR7-positive Fasern kolokalisieren nicht mit dem Oligodendrozytenmarker RIP. Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-TLR7-Antikörper und einem Anti-RIP-Antikörper in einem Maushirn der Altersstufe P12. Die RIP-positiven Oligodendrozyten exprimieren kein TLR7. Maßstab = 10 μm .

Es ist bekannt, dass Mikroglia TLR7 exprimieren. Es sollte daher ausgeschlossen werden, dass die TLR7-positiven Fasern Mikrogliafortsätze darstellen. Aus diesem Grund wurde eine Kofärbung mit einem Anti-Iba1-Antikörper durchgeführt. Hiermit konnte das Zytosol vorhandener Mikroglia angefärbt werden. Eine Kofärbung mit dem Anti-TLR7-Antikörper ergab zwar eine Kolokalisation im Zytosol der Mikroglia, die oben genannten TLR7-positiven Fasern waren jedoch nicht Iba1-positiv (Abb. 10d).

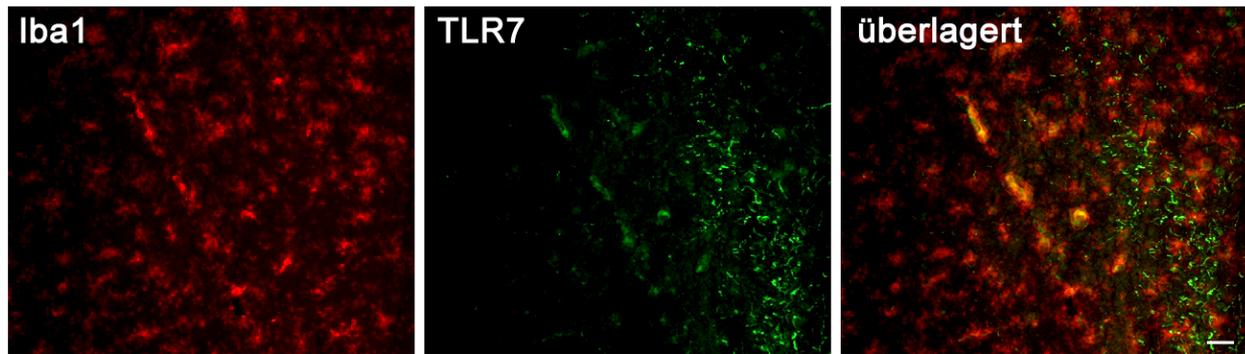


Abbildung 10d: Iba1-positive Mikroglia exprimieren TLR7. Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-TLR7-Antikörper und einem Anti-Iba1-Antikörper an einem Maushirn der Altersstufe P12. Maßstab = 10 μ m.

Zusammengefasst ergaben sich keine Kollokalisierungen der Anti-TLR7-positiven Fasern mit Markern für Neurofilament, Oligodendrozyten, Astrozyten oder Mikroglia. Es fanden sich jedoch vereinzelt TLR7-positive zytosolische Färbungen in Mikroglia. Dies entspricht den Erwartungen, da bekannt ist, dass Mikroglia TLR7 exprimieren (Butchi NB, Du M et al.). Bei den TLR7-positiven Fasern handelt es sich aufgrund der Morphologie und der Lokalisation am ehesten um eine Subpopulation von Axonen, die mit dem verwendeten Antikörper nicht anfärbbar war.

4.2.4 Expressionsanalyse von TLR9-Protein im Mausgehirn während der Entwicklung *in vivo*

Als Nächstes sollten die Zellen identifiziert werden, die TLR9 im ZNS exprimieren. Hierzu wurden mit einem Vibratom angefertigte Maushirnschnitte der Altersstufen P12 und P5m mit dem Anti-TLR9-Antikörper per Immunfluoreszenz gefärbt. Die Färbung war positiv für Zellen mit einem neuronalen Verteilungsmuster im Hippocampus und im Kortex. Anders als TLR7, welcher in erster Linie zytosolisch und in einigen isolierten Fasertrakten der Altersstufe P12 gefunden wurde, war TLR9 sowohl im Zytosol als auch in neuronalen Zellfortsätzen nachzuweisen. Es fanden sich mehr TLR9-positive Zellen im adulten Gehirn als im Gehirn der Altersstufe P12; diese Zellen zeigten eine stärkere Fluoreszenz nach Färbung mit dem Anti-TLR9-Antikörper (Abb. 11). Dieses Ergebnis korreliert gut mit den oben genannten Ergebnissen der QPCR, in der gezeigt wurde, dass die Expression von TLR9-mRNA mit fortschreitender Entwicklung zunimmt.

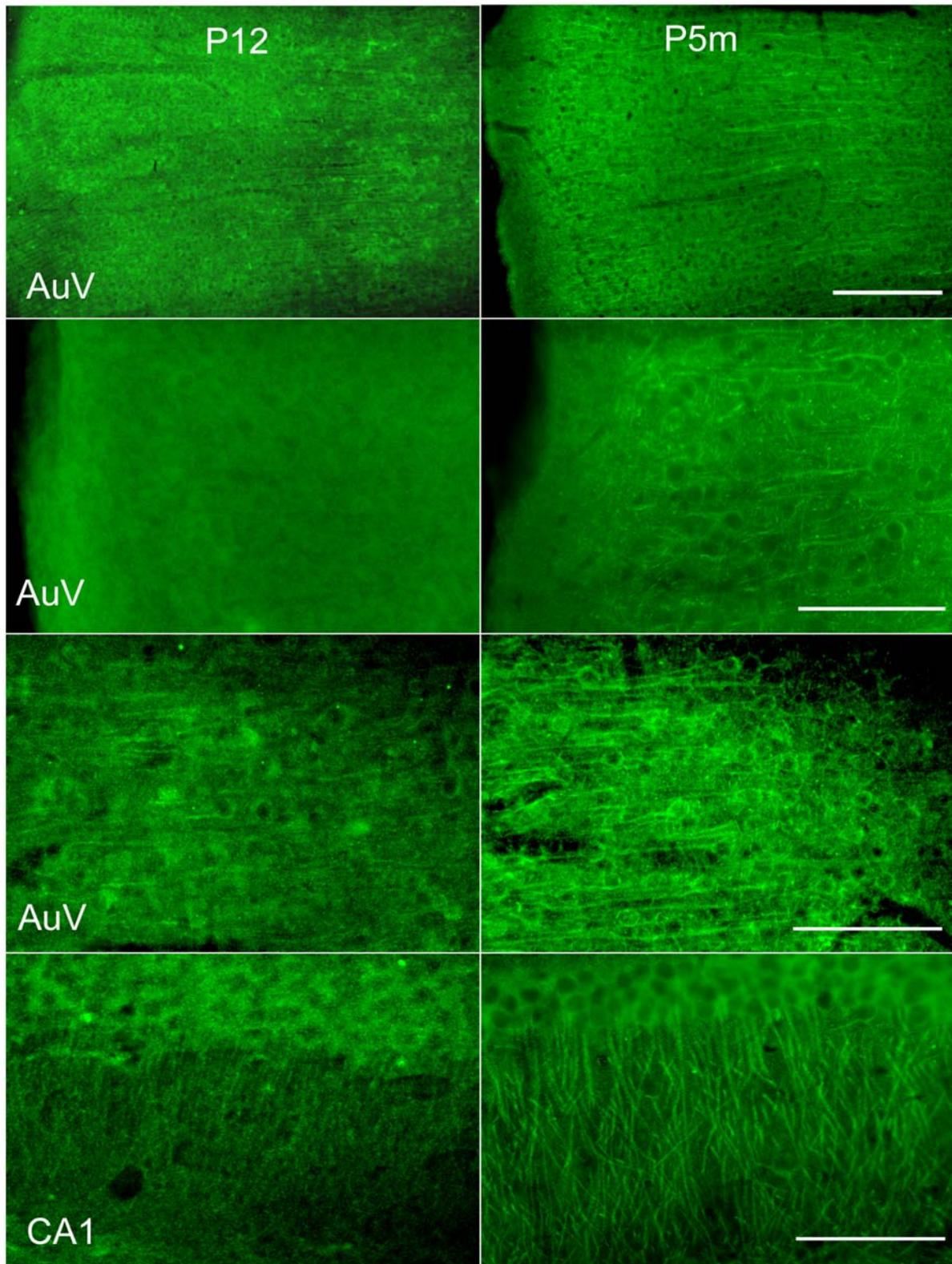


Abbildung 11: TLR9 wird in Zellen mit neuronalem Verteilungsmuster im Hippocampus und im Kortex exprimiert. Die Expression ist in der Altersstufe P5m ausgeprägter als in P12. Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-TLR9-Antikörper in Hirnschnitten der Altersstufen P12 und P5m. AuV: sekundärer auditiver Kortex, CA1: Cornu ammonis 1. Maßstab = 50 µm.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der TLR9-positiven Zellpopulation tatsächlich um Neurone handelt, wurde eine Kofärbung mit einem Anti-MAP2-Antikörper durchgeführt (Abb. 12a). Es zeigte sich eine Kolokalisation zwischen MAP2 und TLR9 sowohl im Kortex als auch im Hippocampus. Zur weiteren morphologischen Analyse der TLR9-Expression erfolgte eine DAB-Färbung an einem P5m-Maushirn (Abb. 12b). Hier zeigte sich die Morphologie der TLR9-Immunfluoreszenzfärbung noch einmal besonders deutlich: Es handelt sich um eine zytosolische Färbung, die auch Zellfortsätze einschließt.

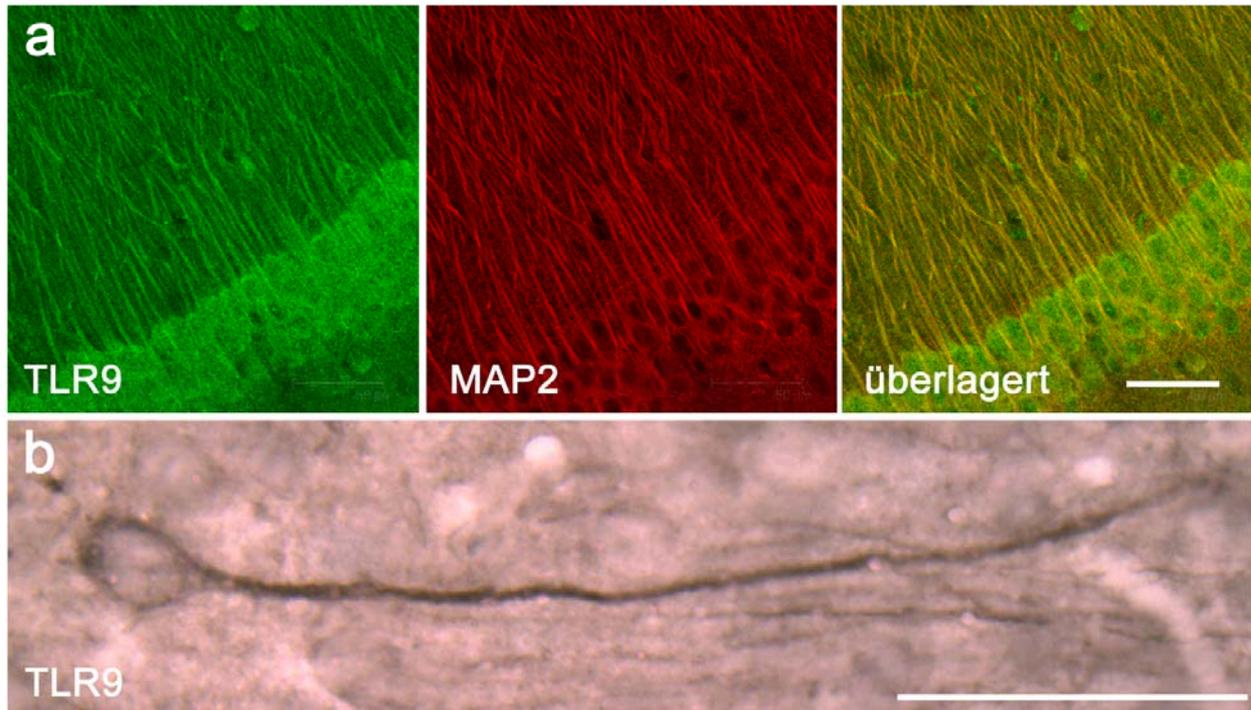


Abbildung 12: Neurone exprimieren TLR9. a) Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-TLR9-Antikörper und einem Anti-MAP2-Antikörper in einem C57BL/6J-Hirnschnitt der Altersstufe P5m im Bereich der hippocampalen Pyramidenzellen. Konfokale Mikroskopie. b) Ein Ausschnitt aus einer DAB-Färbung mit demselben Antikörper eines C57BL/6J-Hirnschnitts der Altersstufe P5m. Maßstab = 50 μ m.

4.3 Expressionsanalyse von TLR7- und TLR9-Protein in kortikalen Neuronen *in vitro*

4.3.1 Analyse mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zur weiteren Analyse der Expression von Toll-like Rezeptoren in Neuronen wurden Kulturen von primären kortikalen Neuronen mit dem Anti-TLR7- und dem Anti-TLR9-Antikörper gefärbt. Hierzu wurden die Großhirne von C57BL/6J-Mäusen der Altersstufe E17 freipräpariert und die Neurone über ein Zentrifugationsprotokoll aufgereinigt. Die Inkubation der Zellen mit Anti-TLR7-Antikörper und Anti-MAP2-Antikörper ergab eine deutliche Kolokalisation im Zytosol der Neurone (Abb. 13).

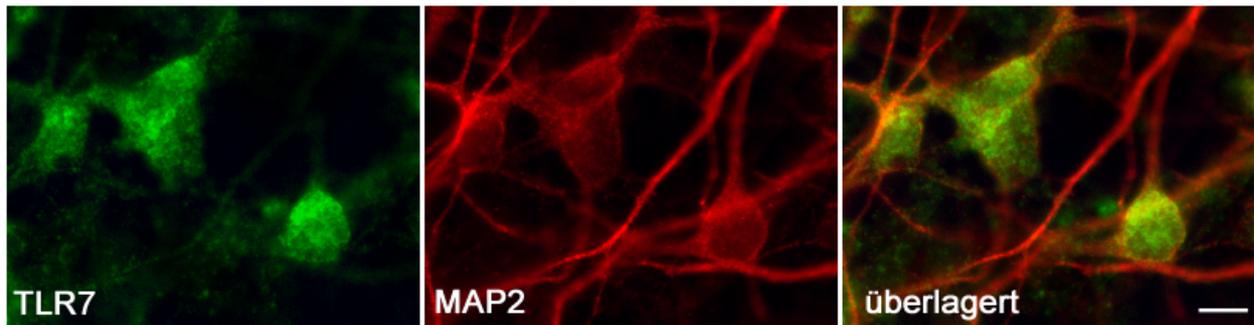


Abbildung 13: TLR7-Protein wird im Zytosol primärer Neurone exprimiert. Immunfluoreszenzfarbung primärer Neurone mit einem Anti-TLR7-Antikörper und einem Anti-MAP2-Antikörper. Konfokale Mikroskopie. Maßstab = 10 μ m.

Die Inkubation primärer Neurone mit Anti-TLR9-Antikörper und Anti-MAP2-Antikörper ergab ebenfalls eine deutliche Kolokalisation (Abb. 14). Im Gegensatz zu dem Anti-TLR7-Antikörper färbte der Anti-TLR9-Antikörper auch die Zellfortsätze der Neurone an.

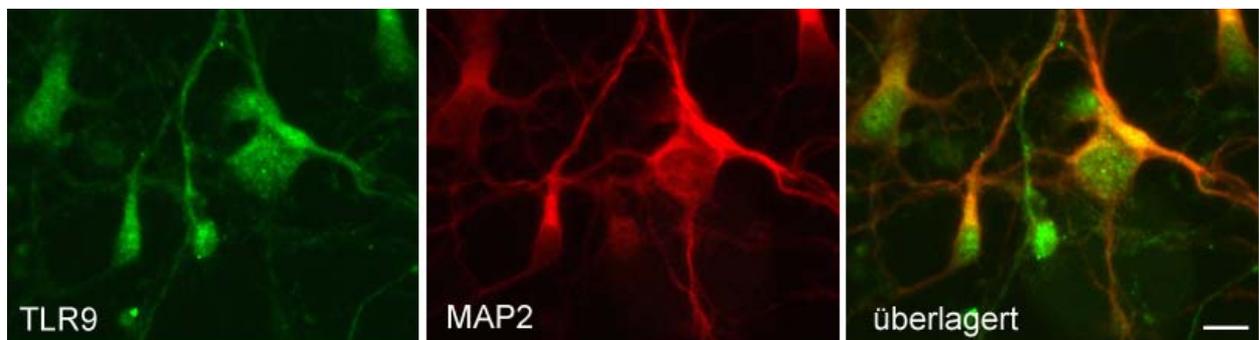


Abbildung 14: TLR9-Protein wird im Zytosol und in den Fortsätzen primärer Neurone exprimiert. Immunfluoreszenzfarbung primärer Neurone mit einem Anti-TLR9-Antikörper und einem Anti-MAP2-Antikörper. Konfokale Mikroskopie. Maßstab = 10 μ m.

4.3.2 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Zur weiteren Analyse der Expression von TLR7 wurden primäre Neurone und Mikroglia mit einem Anti-TLR7-Antikörper inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als neuronenspezifischer Marker diente hierbei Beta(III)tubulin. Als Positivkontrolle dienten primäre Mikroglia, die ebenfalls mit dem Anti-TLR7-Antikörper und dem Mikroglia-spezifischen Marker CD11b markiert wurden. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie bestätigte, dass TLR7 in Neuronen exprimiert wird (Abb. 15).

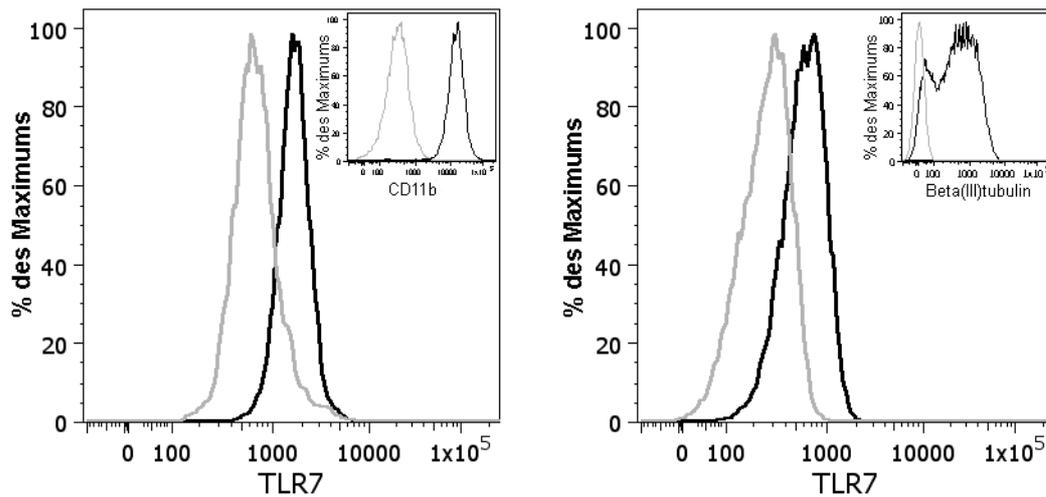


Abbildung 15: Primäre Mikroglia und Neurone exprimieren TLR7. Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD11b/TLR7 auf Mikroglia und Beta(III)tubulin/TLR7 in Neuronen. Die graue Kurve zeigt den Isotyp, die schwarze Kurve zeigt den entsprechenden Zielantikörper (Anti-TLR7, Anti-CD11b, Anti-Beta(III)tubulin).

Des Weiteren wurde die Expression von TLR9-Protein in primären Neuronen in der Durchflusszytometrie untersucht. Primäre Neuronen wurden mit einem Anti-TLR9-Antikörper inkubiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als neuronenspezifischer Marker diente in diesem Fall ebenfalls Beta(III)tubulin. Die Expression von TLR9-Protein auf primären Neuronen konnte auf diesem Weg bestätigt werden (Abb. 16).

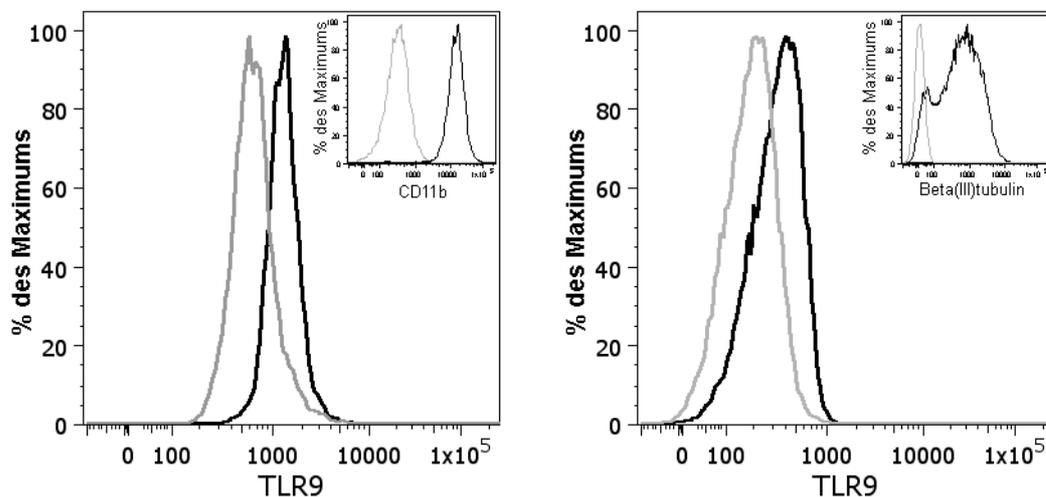


Abbildung 16: Primäre Mikroglia und Neurone exprimieren TLR9. Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD11b/TLR9 auf Mikroglia und Beta(III)tubulin/TLR9 in Neuronen. Die graue Kurve zeigt den Isotyp, die schwarze Kurve zeigt den entsprechenden Zielantikörper (Anti-TLR9, Anti-CD11b, Anti-Beta(III)tubulin).

4.4 Expression von TLR7- und TLR9-mRNA im Modell der neuralen Induktion

Derzeit arbeitet der Autor dieser Arbeit an weiterführenden Experimenten, die die Rolle von TLR7 und TLR9 während der Entwicklung des ZNS untersuchen. Diese Experimente sollen im Rahmen eines Ausblicks kurz vorgestellt werden.

In einem *In-vitro*-Modell der neuralen Entwicklung wird derzeit die Expression von TLR7 und TLR9 untersucht. P19-Zellen sind pluripotente Zellen aus einem Teratokarzinom einer C3H/He-Mauslinie. Die Behandlung mit Retinsäure führt zu einer neuralen Differenzierung dieser Zelllinie, so dass sich diese Zelllinie zu Zellen des adulten ZNS (Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und Neuronen) ausdifferenziert. Während der neuralen Induktion kann im Zeitverlauf die Expression verschiedener Gene mittels QPCR gemessen werden. Als Differenzierungsmarker wurde in diesem Fall GFAP benutzt, welches in differenzierten Astrozyten exprimiert wird. Des Weiteren wurde die Expression von TLR7- und TLR9-mRNA gemessen. Die Genexpression wurde jeweils auf die entsprechende Expression an Tag null bezogen. Es zeigte sich, dass die Expression von TLR7 im Differenzierungsprozess am achten Tag ein Maximum aufweist und dann wieder leicht abfällt (Abb. 17).

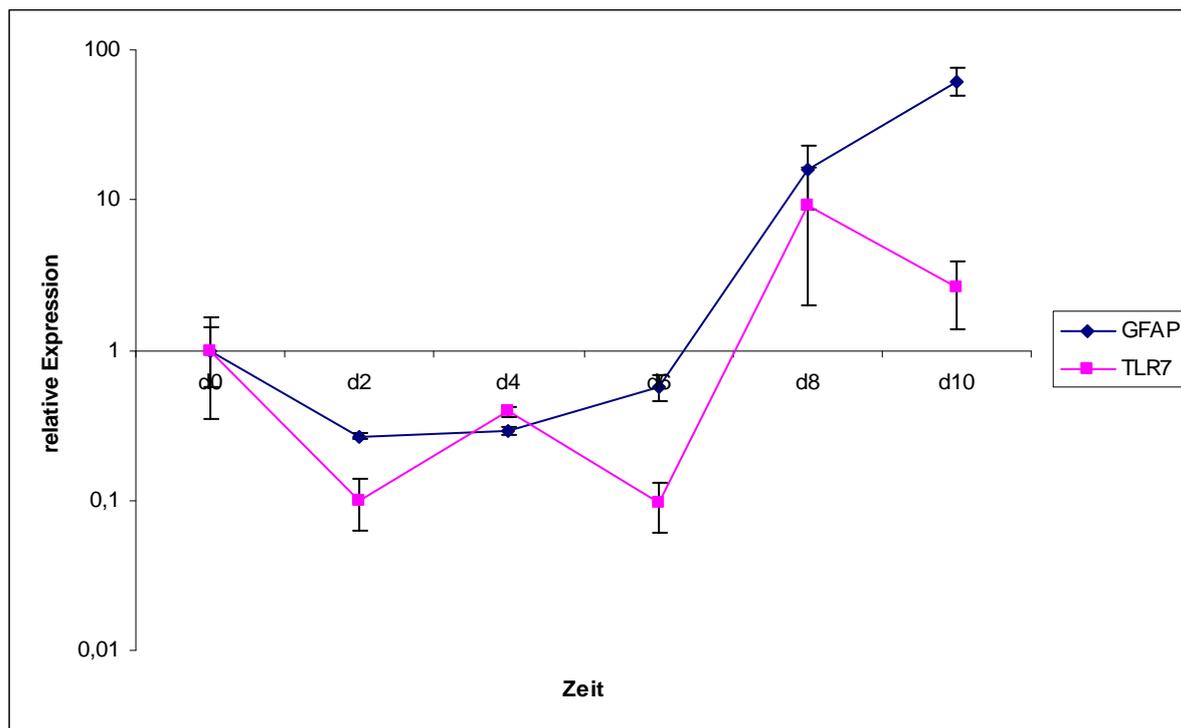


Abbildung 17: TLR7 unterliegt expressionellen Veränderungen im Modell der neuralen Induktion. QPCR der Gene GFAP und TLR7 der cDNA aus P19-Zellen. Messung 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach neuraler Induktion durch Retinsäure (n=2). Die Expression ist jeweils als relativer Wert im Vergleich zum Zeitpunkt 0 dargestellt. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung.

TLR9 fällt im Vergleich zu Tag null ab dem zweiten Tag ab und erreicht am achten Tag wieder seinen Ausgangswert (Abb. 18). Insgesamt fällt auf, dass sowohl TLR7 als auch TLR9 und

GFAP zunächst absinken und zwischen dem sechsten und achten Tag wieder ansteigen. TLR7 und TLR9 erreichen ein Maximum am achten Tag und fallen dann wieder leicht ab, GFAP steigt bis zum zehnten Tag noch etwas an.

Zusammenfassend ergaben sich Hinweise auf expressionelle Veränderungen der beiden Rezeptoren in der neuralen Differenzierung.

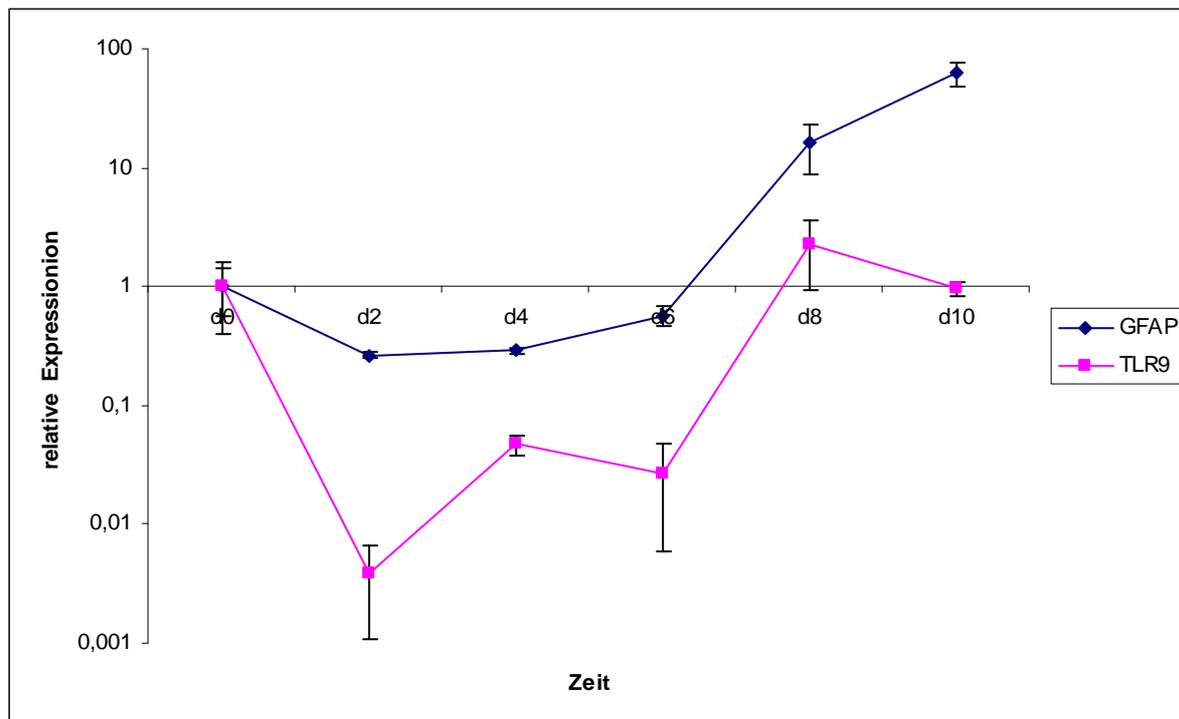


Abbildung 18: TLR9 unterliegt expressionellen Veränderungen im Modell der neuralen Induktion. QPCR der Gene GFAP und TLR9 der cDNA aus P19-Zellen nach 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen nach neuraler Induktion durch Retinsäure. (n=2). Die Expression ist jeweils als relativer Wert im Vergleich zum Zeitpunkt 0 dargestellt. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung.

4.5 Der Effekt von synthetischen TLR7-Liganden auf kortikale Neurone *in vitro*

Es wurde bereits beschrieben, dass einige Toll-like Rezeptoren neuronalen Zelltod vermitteln (s.o.). Zur Untersuchung der funktionalen Rolle von TLR7 in Neuronen wurden primäre Neuronenkulturen mit bekannten TLR7-Liganden wie Imiquimod und ssRNA40 inkubiert. ssRNA40 ist eine einsträngige Oligo-RNA, die spezifisch an TLR7 bindet. Bei Imiquimod handelt es sich um die Substanz 1-Isobutyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]chinolin-4-amin, die in der Medizin als Virostatikum eingesetzt wird und die ebenfalls spezifisch an TLR7 bindet.

Die Stimulation mit Imiquimod und ssRNA40 erfolgte in einer Konzentration von jeweils 10 µg/ml für drei Tage in Neurobasal Medium. Eine Negativkontrolle mit 0,1 M PB-Puffer in Neurobasal Medium wurde mitgeführt. Anschließend erfolgte eine Färbung mit einem Anti-NeuN-Antikörper und DAPI. Es zeigte sich, dass beide TLR7-Liganden neuronalen Zelltod

provozieren. Dies war erkennbar an der Abnahme der Zellzahl bzw. den typischen morphologischen Veränderungen der zurückgebliebenen Zellen: Fragmentation und Kondensation des Kerns (Abb. 19).

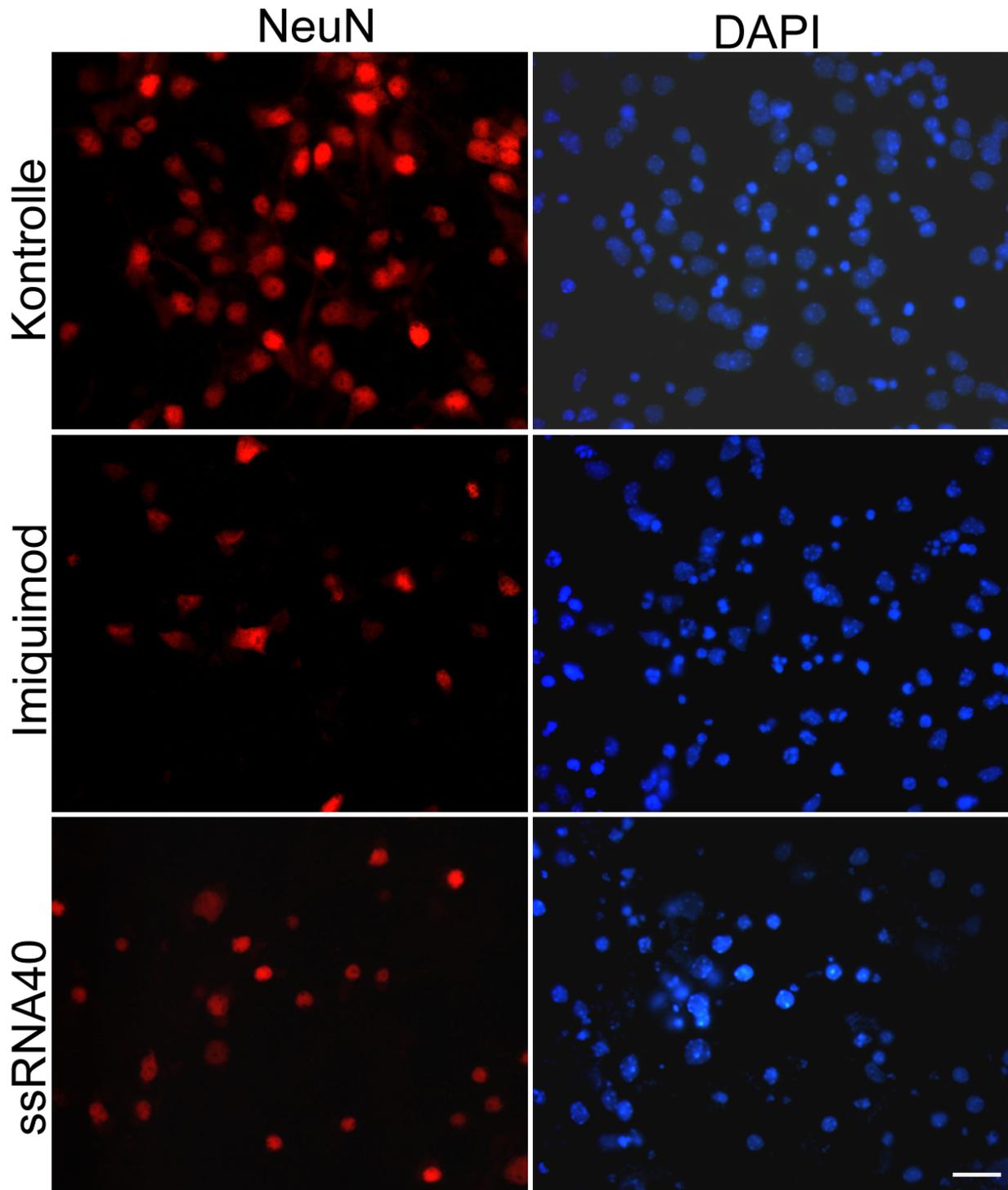


Abbildung 19: TLR7-Liganden induzieren neuronalen Zelltod *in vitro*. Primäre Neurone wurden jeweils drei Tage lang mit den TLR7-Liganden Imiquimod und ssRNA40 in der Konzentration 10 µg/ml stimuliert. Maßstab = 50 µm.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression von Toll-like Rezeptoren im sich entwickelnden Gehirn der Maus untersucht. Zunächst wurde die Expression der mRNA der Toll-like Rezeptoren 1-9 und des Adapterproteins MyD88 in der Real-Time-PCR betrachtet. Die vorgestellten Daten zeigen, dass nur die Toll-like Rezeptoren 7 und 9 in der Entwicklung des Gehirns einer expressionellen Veränderung unterliegen. Diese Veränderung lässt sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen. Des Weiteren zeigte sich, dass TLR7 und TLR9 im ZNS während der Entwicklung hauptsächlich in Neuronen exprimiert werden. TLR7 und TLR9 lassen sich insbesondere im Zellkörper und in Fasern nachweisen. Während der neuralen Induktion in P19-Stammzellen kommt es ebenfalls zu regulatorischen Veränderungen von TLR7 und TLR9. Die Stimulation von Toll-like Rezeptor 7 in Neuronen führt außerdem zu neuronalem Zelltod *in vitro*. Die Daten weisen insgesamt auf eine mögliche funktionelle Rolle von Toll-like Rezeptoren bei der neuronalen Entwicklung hin.

Die Lokalisationen von TLR7-mRNA in hybridisierten Hirnschnitten und von TLR7-Protein in der Immunhistochemie stimmen weitgehend überein. Die Tendenz verstärkter Expression postnatal, die sich für die TLR7-mRNA in den Real-Time-PCR-Messungen zeigte, bestätigte sich in der *In-situ*-Hybridisierung und in den immunhistochemischen Färbungen. Im Zeitraum nach der Geburt findet sich ein Maximum, das in der Altersstufe P5m wieder abflacht. Auffällig sind die Fasertrakte, die in der Immunfluoreszenz vor allem in der Altersstufe P12 gefunden werden können. Für diese Fasertrakte konnten keine Kolokalisation mit gängigen Antikörpern gegen bekannte Strukturen identifiziert werden. Morphologisch sind diese Fasern jedoch am ehesten als axonale Strukturen einzuordnen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es sich um eine Subpopulation von Neuronen handelt, die während der Entwicklung des ZNS auftritt und im weiteren Verlauf entweder wieder untergeht oder ihr Expressionsprofil dahingehend verändert, dass kein TLR7 mehr exprimiert wird.

5.1 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext bisheriger Veröffentlichungen

Im diesem Kapitel sollen die vorgestellten Ergebnisse im Kontext der bisher veröffentlichten Literatur diskutiert werden. Toll-like Rezeptoren im ZNS sind seit ca. zehn Jahren Thema der medizinischen und grundlagenorientierten Forschung. Eine potentielle Rolle bei der Entwicklung des ZNS bzw. bei der neuronalen Plastizität wird seit Kurzem diskutiert, jedoch finden sich nur vereinzelt Originalarbeiten zu diesem Thema.

5.1.1 Die Expression der Toll-like Rezeptoren 7 und 9 in Neuronen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TLR7 und TLR9 in Neuronen exprimiert werden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde diese Expression auf verschiedene Weise nachgewiesen. Die Experimente ergaben, dass beide Rezeptoren in der Entwicklung expressionellen Veränderungen unterliegen. Es wurde außerdem die Expression von TLR7 und TLR9 in Mikroglia nachgewiesen. In den wenigen Arbeiten, die sich bisher mit der Expression von TLR7 im Gehirn auseinandergesetzt haben, wurde das Protein nur auf Mikroglia und Astrozyten gefunden (Bsibsi M, Ravid R et al. 2002; Olson JK und Miller SD 2004; Carpentier PA, Begolka WS et al. 2005). In früheren Arbeiten konnte TLR7 im Westernblot primärer Neuronenkulturen nicht detektiert werden (Ma Y, Li J et al. 2006). Es wurde jedoch beschrieben, dass Neurone den verwandten TLR8 exprimieren und dass Resiquimod, ein Ligand von TLR7 und TLR8, das Auswachsen von Axonen in neuronalen Primärkulturen unterdrückt und Apoptose induzieren kann: eine Wirkung, die die Gruppe auf die Vermittlung von TLR8 zurückführte, da sie davon ausging, dass Neurone TLR7 nicht exprimieren. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass Neurone TLR7 exprimieren, und dass TLR7-Liganden neuronalen Zelltod provozieren können. Dies könnte auch Implikationen für die oben erwähnten Daten haben: Da der Ligand Resiquimod auch an TLR7 bindet, könnte die gezeigte Hemmung des axonalen Wachstums zumindest partiell über TLR7 vermittelt sein. Butchi et al. zeigten in einer Arbeit aus dem Jahr 2008 mithilfe der Durchflusszytometrie, dass TLR7 auf Astrozyten exprimiert wird (Butchi NB, Pourciau S et al. 2008). Diese Beobachtung konnte in unserem Modell der immunhistochemischen Färbung nicht bestätigt werden. Dies kann möglicherweise auf die Verwendung anderer Antikörper oder anderer Zellkulturbedingungen zurückgeführt werden oder auf die Unterschiede zwischen der Durchflusszytometrie und der Immunhistochemie.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TLR9 im Mausgehirn in erster Linie in Neuronen exprimiert wird. TLR9 wurde bisher ebenfalls nur auf Mikroglia (Takeshita S, Takeshita F et al. 2001; Dalpke AH, Schafer MK et al. 2002) sowie auf Astrozyten beschrieben (Takeshita S, Takeshita F et al. 2001; Bowman CC, Rasley A et al. 2003).

Die einzigen zwei Studien, die bisher eine funktionelle Rolle von Toll-like Rezeptoren in Neuronen zeigen, stammen aus der Gruppe von Timothy Vartanian aus Boston. 2007 veröffentlichte diese Gruppe eine Arbeit, in der beschrieben wurde, dass Toll-like Rezeptor 3 vermehrt in den Lamellipodien aussprossender Axone exprimiert wird, und dass der synthetische TLR3-Ligand Poly-Inosin-:Poly-Cytidyl-Säure [Poly(i:c)] axonale Aussprossung im sich entwickelnden Gehirn unterdrücken kann (Cameron JS, Alexopoulou L et al. 2007). Ein Jahr

zuvor hatte die gleiche Gruppe beschrieben, dass die Aktivierung von TLR8 zur Hemmung neuronaler Aussprossung führt und Apoptose induzieren kann (Ma Y, Li J et al. 2006). Die Autoren dieser Studien waren die Ersten, die Toll-like Rezeptoren in einem entwicklungsbiologischen Kontext diskutierten.

5.1.2 Expression von TLR7 und TLR9 bei der Entwicklung des Gehirns

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TLR7 im sich entwickelnden Mausgehirn hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird. Am stärksten ist die Expression kurz nach der Geburt ausgeprägt, nach fünf Monaten fällt die Expression wieder auf das ca. Siebenfache des Ausgangswertes E13 ab. TLR9 wird ebenfalls vor allem in Neuronen exprimiert und steigt in den untersuchten Altersstufen immer stärker an. Während des experimentellen Teils dieser Arbeit wurden erstmals Daten zur Expression von Toll-like Rezeptoren im alternden Mausgehirn veröffentlicht (Letiembre M, Hao W et al. 2007). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt hier auf das alternde adulte Gehirn gelegt, nicht auf das sich entwickelnde bzw. embryonale Gehirn. Die Gruppe untersuchte die Expression von Toll-like Rezeptoren im Mausgehirn in den Altersstufen P3m, P10m, P17m und P28m. QPCR-Analysen ergaben, dass in diesem Zeitraum die Toll-like Rezeptoren 1-7 hochreguliert wurden. Die Expression von TLR8 zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die Expression von TLR9 ließ im Alter von zehn Monaten im Vergleich zu P3m um ca. 50% nach und stieg im Alter von 28 Monaten wieder leicht an, blieb aber unter dem Ausgangsniveau. Des Weiteren untersuchte die Gruppe die Expression inflammatorischer Zytokine. Hier zeigte die Gruppe eine Hochregulation von TNF- α und Interleukin-10 in der Altersstufe P28m im Vergleich zu P3m. INOS, Interleukin-1 β und TGF- β wiesen keine signifikanten Veränderungen im Zeitraum von P3m bis P28m auf. *In-situ*-Hybridisierungen der Altersstufen P3m, P10m, P17m und P28m konnten TLR4, TLR6, TLR8 und TLR9 im Mausgehirn nicht detektieren. TLR3 und TLR7 waren vor allem im kortikalen Bereich zu sehen. TLR2 konnte ab der Altersstufe P6m detektiert werden und war vor allem im Bereich der anterioren Kommissur und entlang der lateralen Ventrikel zu finden. In älteren Tieren gab es außerdem ein Signal im Nucleus praeopticus, im Corpus callosum sowie im Hippocampus. In Kombinationsfärbungen mit dem Mikroglia/Makrophagen-Marker Iba1 zeigte die Gruppe eine Kollokalisierung mit TLR2 und TLR7. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar der Zeitpunkt P3m nicht untersucht, zum Zeitpunkt P5m fanden sich jedoch vor allem TLR7-positive Neurone in Kortex und Hippocampus und nur wenige TLR7-positive Mikroglia.

Die vorliegenden QPCR-Daten und die Daten der Arbeit von Letiembre widersprechen sich nicht, vielmehr ergänzen sich beide Untersuchungen hinsichtlich der untersuchten Zeitpunkte. Der gezeigte Verlauf der TLR7-Expression mit einem Maximum nach der Geburt könnte mithilfe der Daten von Letiembre et al. gedanklich um einen zweiten Höhepunkt im Alter von 17 Monaten ergänzt werden. Auffällig ist allerdings, dass die Gruppe um Letiembre TLR7 in erster Linie in Mikroglia nachweisen konnte. In der vorliegenden Arbeit fanden sich zwar TLR7-positive Mikroglia, vor allem fand sich die Expression jedoch in Neuronen. Dies könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen wurden unterschiedliche Sonden in der *In-situ*-Hybridisierung benutzt, zum anderen wurden unterschiedliche Altersstufen untersucht. So wäre es beispielsweise denkbar, dass die Expression von TLR7 in Neuronen im Alter nachlässt. Letiembre et al. zeigen in der oben genannten Arbeit die in der QPCR gemessenen Expressionslevel von TLR9 zu den Zeitpunkten P3m, P10m, P17m und P28m. TLR9 war zu den Zeitpunkten P10m und P17m signifikant herunterreguliert. Nach einem fast linearen Anstieg von TLR9 zwischen E13 und P5m, wie er in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, könnte der Verlauf gedanklich also um einen Abfall in den Altern P10m und P17m und einen erneuten Anstieg in der Altersstufe P28m ergänzt werden.

In einer weiteren Arbeit aus dem Jahr 2006 der Gruppe von Timothy Vartanian wurde mithilfe der semiquantitativen Westernblotanalyse gezeigt, dass TLR7 im embryonalen Gehirn relativ gleichmäßig exprimiert und zu den Zeitpunkten P21 und P12w stark herunterreguliert ist (s.o.). Eine genaue Vergleichbarkeit mit den hier erhobenen Daten ist bezüglich der Expression in der Entwicklung deshalb nicht möglich, weil die Zeitpunkte P21 und P12w nicht untersucht wurden. Zum untersuchten Zeitpunkt P5m kann die in der genannten Arbeit beobachtete postnatale Herunterregulation auf mRNA-Ebene in unserem Modell jedoch nicht bestätigt werden. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass TLR7 zu den Zeitpunkten P21 und P12w herunterreguliert und zum Zeitpunkt P5m wieder hochreguliert wird. Zu beachten ist allerdings, dass in der Arbeit der auswärtigen Gruppe Swiss-Webster-Mäuse untersucht wurden, in der vorliegenden Arbeit wurde mit C57BL/6J-Mäusen gearbeitet. Es stellt sich daher die Frage, ob es möglicherweise Expressionsunterschiede zwischen den beiden Mausstämmen gibt.

5.1.3 Toll-like Rezeptoren in der Neurogenese

Die hier erhobenen Daten weisen außerdem auf eine mögliche Rolle von TLR7 und TLR9 in der Entwicklung des zentralen Nervensystems bzw. in der neuronalen Plastizität hin. Neben den regulatorischen Veränderungen in der Expression von TLR7 und TLR9 konnte gezeigt werden,

dass TLR7-Liganden neuronalen Zelltod induzieren können, und dass TLR7 und TLR9 im P19-Modell der neuronalen Induktion regulatorischen Veränderungen unterliegen. Es wurde bereits beschrieben, dass das originale *toll*-Gen eine Rolle bei der Regulation aussprossender Motoneurone in *Drosophila* spielt (s.o.). Auch mehren sich die Hinweise, dass Toll-like Rezeptoren eine Rolle bei der neuronalen Aussprossung spielen. Rolls et al. zeigten, dass murine neuronale Vorläuferzellen TLR2 und TLR4 exprimieren und über einen MyD88-abhängigen Signalweg die hippocampale Neuroplastizität regulieren (Rolls A, Shechter R et al. 2007). Diese Daten gaben einen ersten Hinweis darauf, dass Toll-like Rezeptoren im Säuger nicht alleine Aufgaben des angeborenen Immunsystems übernehmen.

Sollte sich eine Rolle von TLR7 und TLR9 bei der neuronalen Plastizität bestätigen, so stellt sich die Frage, welche endogenen Liganden der Toll-like Rezeptoren die Aussprossung regulieren und wie diese Liganden die Toll-like Rezeptoren erreichen. Bisher wurde die Expression von TLR7 und TLR9 nur im Endosom beschrieben. Es gilt also zu klären, wie potentielle endogene Liganden die intrazellulären Rezeptoren erreichen. Berücksichtigt werden sollte außerdem die Tatsache, dass viele Toll-like Rezeptoren Korezeptoren besitzen (Akira S, Uematsu S et al. 2006). Weiterhin wird zu klären sein, inwiefern exogene Liganden – also Pathogene – Prozesse der neuronalen Plastizität beeinflussen können, sowohl im sich entwickelnden Gehirn als auch im adulten Gehirn. In einer auswärtigen Arbeit wurde gezeigt, dass neuronale Aussprossung durch TLR8-Liganden unterdrückt werden kann (s.o.). Diese Hemmung der Aussprossung war MyD88-unabhängig. Daher wird vermutet, dass Toll-like Rezeptoren in Neuronen noch andere, bisher unbekannte Signalwege nutzen können als die MyD88-Kaskade (Ma Y, Li J et al. 2006). Für einen MyD88-unabhängigen Signalweg sprechen auch die Daten der vorliegenden Arbeit, da mit den hier gezeigten regulatorischen Veränderungen von TLR7 und TLR9 in der Entwicklung keine Veränderung der Expression von MyD88 einhergeht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in Neuronen ein MyD88-unabhängiger Signalweg bestritten wird, der noch nicht näher klassifiziert wurde. Ein möglicher Kandidat ist SARM1, ein Adapterprotein, von dem bekannt ist, dass es hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird und das ebenso wie MyD88 eine TIR-Domäne besitzt (Kim Y, Zhou P et al. 2007). SARM1 scheint eine regulatorische Rolle beim Überleben von Neuronen bei metabolischem Stress zu spielen (Dalod M 2007).

Die gezeigten regulatorischen Veränderungen in der Expression von TLR7 und TLR9 in der Entwicklung und im P19-Stammzellenmodell der neuronalen Induktion lassen spekulieren, dass diese nicht vollständig beschriebenen Signalwege möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems spielen. Die Tatsache, dass TLR7-Liganden neuronalen Zelltod induzieren, könnte auf eine Rolle bei der Entwicklung des neuronalen

Netzwerkes hinweisen, da es bei diesem Prozess auch zu neuronalem Zelltod in der Entwicklung kommt (Nijhawan D, Honarpour N et al. 2000).

5.1.4 TLR7- und TLR9-defiziente Mäuse

Sowohl für TLR7 als auch für TLR9 existieren Knockout-Mäuse. Beide Mauslinien sind lebensfähig und zeigen keine groben makroskopischen Auffälligkeiten (Hemmi H, Takeuchi O et al. 2000; Hemmi H, Kaisho T et al. 2002). Die Tatsache, dass die beiden TLR-defizienten Mauslinien lebensfähig sind, weist darauf hin, dass weder TLR7 noch TLR9 für sich allein genommen eine biologisch unersetzbare Rolle bei der Entwicklung des ZNS spielen können. Tatsächlich ist aus der immunologischen Forschung bekannt, dass die verschiedenen Toll-like Rezeptoren starke Redundanzen aufweisen. Das bekannteste Beispiel für TLR-Redundanz bezieht sich auf TLR5: 23% der europäischen Bevölkerung tragen ein Stopp-Codon in einem ihrer TLR5-Gene (Barreiro LB, Ben-Ali M et al. 2009). Die hohe Frequenz dieser Mutation weist darauf hin, dass die Funktion von TLR5 durch andere Gene ersetzt werden kann. Ein anderes Beispiel betrifft die Toll-like Rezeptoren 7, 8 und 9. Eine Mutation im Gen IRAK-4 führt zwar zu einer verminderten Zytokinfreisetzung von Immunzellen nach Stimulation der Toll-like Rezeptoren 7, 8 und 9 mit ihren spezifischen Liganden; die Zytokinfreisetzung nach Virusinfektionen wird jedoch durch die Toll-like Rezeptoren 3 und 4 ersetzt, so dass Tiere, die die Mutation tragen, für die meisten Viren nicht empfänglicher sind als der Wildtyp (Yang K, Puel A et al. 2005). Vor diesem Hintergrund ist es auch vorstellbar, dass eine potenzielle Funktion von TLR7 oder TLR9 bei der Entwicklung des ZNS möglicherweise durch andere Gene ersetzt werden kann. Aus diesem Grund wäre es interessant, Tiere zu untersuchen, in denen größere Gruppen von Toll-like Rezeptoren ausgeschaltet wurden (z. B. die intrazellulären Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 gemeinsam).

Weiterhin muss festgestellt werden, dass weder die TLR7-KO-Maus, noch die TLR9-KO-Maus bisher dezidiert neuroanatomisch bzw. mikroskopisch-strukturell untersucht worden sind. Vorstellbar wäre, dass die Tiere nur wenig ausgeprägte und daher subklinische Anomalien des ZNS zeigen, bzw. dass Anomalien auf bestimmte Gebiete des ZNS beschränkt sind.

5.1.5 Toll-like Rezeptoren im ZNS als Zielstrukturen für die Medikamentenentwicklung

Die vorliegende Arbeit weist zum ersten Mal auf eine mögliche Rolle von TLR7 und TLR9 bei der Entwicklung des ZNS und der neuronalen Plastizität im Gehirn hin – nicht vermittelt durch Mikroglia, sondern zellautonom über die Expression von Toll-like Rezeptoren im Neuron selbst.

Toll-like Rezeptoren sind in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Arzneimittelentwicklung geraten (Nimmo AJ und Vink R 2009). Die Gründe hierfür sind zum einen, dass bestimmte nicht-steroidale Antiphlogistika anscheinend das Risiko vermindern, neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer Demenz oder Morbus Parkinson zu entwickeln (Klegeris A und McGeer PL 2005), zum anderen die wachsende Zahl an Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und der Aktivierung von Toll-like Rezeptoren gezeigt haben. Hierbei sind in den letzten Jahren zwei Gruppen von Mechanismen aufgedeckt worden. Erstens können Neurone durch Mikroglia geschädigt werden, welche via Toll-like Rezeptoren aktiviert wurden (Lehnardt S, Schott E et al. 2008); zweitens kann die axonale Aussprossung durch TLR3 und TLR8 direkt im Neuron gehemmt werden (Ma Y, Li J et al. 2006; Cameron JS, Alexopoulou L et al. 2007). Nachdem zunächst einige synthetische Liganden für Toll-like Rezeptoren entwickelt worden sind, hat sich das Interesse der Pharmaindustrie in der letzten Zeit vor allem auf die TLR-assoziierten Signalkaskaden gerichtet (Hong-Geller E, Chaudhary A et al. 2008). Sollten sich die hier vorgestellten Daten bestätigen, könnten auch TLR7 und TLR9 in Zukunft als Zielstrukturen für Arzneimittel dienen.

5.2 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine systematische Untersuchung der Expression aller als biologisch relevant beschriebenen Toll-like Rezeptoren während der embryonalen und frühen postnatalen Hirnentwicklung durchgeführt. Die nachgewiesenen Veränderungen der TLR7- und TLR9-Expression bei der Entwicklung des Gehirns und bei der neuronalen Differenzierung werfen weitere Fragen auf, die in Zukunft untersucht werden sollen:

Welche funktionelle Rolle spielen TLR7 und TLR9 in der neuronalen Entwicklung? Welche Signalwege sind involviert? Welche Liganden – vor allem endogene – sind beteiligt? Können Störungen der Homöostase von neuronalem Gewebe in Zukunft durch TLR7/9-modulierende Medikamente positiv beeinflusst werden? Parallel zu diesen grundlegenden Fragen muss der schädigende Einfluss von Infektionen, also die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren durch exogene TLR-Liganden, auf das sich entwickelnde Gehirn evaluiert werden. Die vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass Toll-like Rezeptoren im Gehirn nicht nur eine Rolle als Rezeptoren von Mikroglia spielen. Toll-like Rezeptoren sind auch in Neuronen zu finden und können hier eine funktionelle Rolle während der Entwicklung und wahrscheinlich bei Prozessen des neuronalen Zelltodes ausüben, unabhängig von immunologischen Reaktionen. Die Frage, welche Erkenntnisse hinsichtlich der Expression von Toll-like Rezeptoren im Gehirn aus dem

Mausmodell auf den Menschen übertragbar sind, wird im Rahmen weiterer Forschungsanstrengungen zu untersuchen sein.

6 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLR) leiten sich evolutionär von dem sogenannten Toll-Protein in *Drosophila melanogaster* ab. Dieses Protein spielt sowohl bei der Entwicklung der dorsoventralen Achse der Fliegenlarve als auch bei der Immunantwort der Taufliege auf Pilzinfektionen eine zentrale Rolle. Des Weiteren scheint es eine Funktion bei der Zielfindung aussprossender Motoneurone zu übernehmen. Im Säugetier vermitteln Homologe des originären Toll-Proteins - die Toll-like Rezeptoren - angeborene Immunität und finden sich vor allem auf Antigen-präsentierenden Zellen, wo sie sogenannte Pathogen-associated-Molecular-Pattern (PAMP) erkennen. Bei diesen PAMP handelt es sich um evolutionär konservierte Strukturen, die in niederen Pathogenen, nicht jedoch in Zellen höherer Lebewesen vorkommen. So erkennt TLR4 beispielsweise Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien, TLR7 und TLR9 erkennen virale RNA bzw. virale und bakterielle DNA. Mit dem Abkommen von der Vorstellung, dass das Gehirn ein immunprivilegiertes Organ ist, sind Toll-like Rezeptoren in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Neurowissenschaften gerückt. Es wird zunehmend deutlich, dass Toll-like Rezeptoren nicht nur eine Rolle bei der Immunantwort, sondern auch bei Pathogen-unabhängigen Prozessen spielen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Mikroglia über Toll-like Rezeptoren neurotoxische Folgen haben kann. Die Freisetzung des Hitzeschockproteins 60 aus geschädigten Neuronen führt beispielsweise zur Aktivierung von Mikroglia über TLR4. Die Mikroglia beginnen nach ihrer Aktivierung mit der Synthese von Stickstoffmonoxid, welches wiederum den Zelltod weiterer Neurone induziert. Verschiedene andere neurodegenerative bzw. neurotoxische Effekte nach Mikrogliaaktivierung durch TLR-Liganden sind beschrieben worden.

Die Doppelrolle des originären Toll-Proteins bei der embryonalen Entwicklung und der Immunantwort wirft die Frage auf, ob Toll-like Rezeptoren möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung des ZNS spielen. Da bisher keine Studien zu diesem Thema veröffentlicht wurden, stand am Anfang der vorliegenden Arbeit ein breit angelegtes „Screening“ nach expressionellen Veränderungen von Toll-like Rezeptoren bei der Entwicklung des Großhirns im Vordergrund. Mithilfe der Quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion wurden die mRNA-Expressionslevel der Toll-like Rezeptoren 1 bis 9 und des Adapterproteins MyD88, das an der intrazellulären Signalkaskade der Toll-like Rezeptoren beteiligt ist, in Maushirnen verschiedener Altersstufen gemessen. Die Technik der Quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion musste zunächst für die anzuwendenden Primer etabliert werden. Insgesamt wurden schließlich

Hirne an zwölf Zeitpunkten untersucht, beginnend mit dem 13 Tage alten Embryo (E13) bis hin zur fünf Monate alten Maus (P5m). Zu jedem Zeitpunkt wurden drei Großhirne untersucht.

Es stellte sich heraus, dass die beiden Toll-like Rezeptoren 7 und 9 auffällige Expressionsveränderungen während der Entwicklung zeigten. TLR7 stieg kurz nach der Geburt auf ein Vierzigfaches an (im Vergleich zur Altersstufe E13), um dann ab P8 wieder abzufallen, wobei die Expression stets über dem Ausgangsniveau blieb. Die Expression der TLR9-mRNA stieg mit dem Alter konstant an und war in der fünf Monate alten Maus dreizehnmal so hoch wie beim 13 Tage alten Embryo. Die anderen Toll-like Rezeptoren und das Adapterprotein MyD88 zeigten keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Expressionslevel während der ZNS-Entwicklung. Im zweiten Schritt wurde die Expression der beiden Toll-like Rezeptoren 7 und 9 im sich entwickelnden ZNS mit weiteren molekularbiologischen Methoden untersucht. Mithilfe der *In-situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass TLR7-mRNA vor allem in Neuronen des Großhirns abhängig von der Entwicklungsstufe exprimiert wird. Mithilfe der Immunfluoreszenzhistochemie sollte die Expression von TLR7 und TLR9 im Großhirn auf Proteinebene analysiert werden. Die Spezifität der hier verwendeten TLR7- und TLR9-Antikörper wurde mithilfe transfizierter HEK-293-Zellen nachgewiesen. Weitere Antikörper wurden als zelltypspezifische Marker eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass TLR7 in allen untersuchten Altersstufen in erster Linie in Neuronen von Kortex und Hippocampus exprimiert wird, wobei die Expression in der Altersstufe E16 kaum nachweisbar war; in den Altern P0, P12 und P5m jedoch sehr deutlich. TLR9 wurde ebenfalls hauptsächlich in Neuronen von Kortex und Hippocampus nachgewiesen, wobei die Dichte TLR9-positiver Neurone und deren Fluoreszenz im Alter zunahm.

In weiteren Experimenten wurde die Expression von TLR7 und TLR9 in primären Neuronen und Mikroglia mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hier konnte bestätigt werden, dass nicht nur Mikroglia, sondern auch Neurone sowohl TLR7 als auch TLR9 exprimieren.

Am Ende des Ergebnisteiles dieser Arbeit werden weiterführende Experimente vorgestellt, die einen Ausblick auf die funktionelle Rolle der Toll-like Rezeptoren 7 und 9 schaffen sollen. Im neuralen Differenzierungsmodell mit P19-Stammzellen wurde die Expression von TLR7 und TLR9 im Verlauf der Differenzierung analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass TLR7 und TLR9 im Laufe der Differenzierung ähnliche Veränderungen aufweisen wie der Differenzierungsmarker GFAP. Die Expression von TLR7 und TLR9 fiel zunächst leicht ab und stieg dann im weiteren Verlauf etwa hundertfach über den Ausgangswert an. Schließlich konnte gezeigt werden, dass spezifische TLR7-Liganden neuronalen Zelltod *in vitro* induzieren können.

Diese Arbeit stellt die erste systematische Untersuchung der Expression von Toll-like Rezeptoren bei der Entwicklung des Mausgehirns dar. Die *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten weisen auf eine funktionelle Rolle von TLR7 und TLR9 bei der ZNS-Entwicklung hin.

Welche Aufgabe die beiden Toll-like Rezeptoren genau übernehmen und welche endogenen (und exogenen) Liganden hieran beteiligt sind, muss Gegenstand weiterer Experimente sein. Nicht nur physiologische Prozesse bei der ZNS-Entwicklung, sondern auch die Interaktion von Pathogenen mit Toll-like Rezeptoren während der Entwicklung des ZNS werden in Zukunft noch zu untersuchen sein.

Bibliographie

1. Akira S, Uematsu S und Takeuchi O (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
2. Aloisi F (2001). "Immune function of microglia." Glia **36**(2): 165-79.
3. Andersen-Nissen E, Smith KD, Bonneau R, Strong RK und Aderem A (2007). "A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin." J Exp Med **204**(2): 393-403.
4. Anderson KV und Nusslein-Volhard C (1984). "Information for the dorsal--ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA." Nature **311**(5983): 223-7.
5. Barreiro LB, Ben-Ali M, Quach H et al. (2009). "Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense." PLoS Genet **5**(7): e1000562.
6. Bell JK, Botos I, Hall PR et al. (2005). "The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10976-80.
7. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA et al. (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." Science **298**(5595): 1025-9.
8. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL und Marriott I (2003). "Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products." Glia **43**(3): 281-91.
9. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D und van Noort JM (2002). "Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **61**(11): 1013-21.
10. Buchanan SG und Gay NJ (1996). "Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins." Prog Biophys Mol Biol **65**(1-2): 1-44.
11. Butchi NB, Du M und Peterson KE "Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia." Glia **58**(6): 650-64.
12. Butchi NB, Pourciau S, Du M, Morgan TW und Peterson KE (2008). "Analysis of the neuroinflammatory response to TLR7 stimulation in the brain: comparison of multiple TLR7 and/or TLR8 agonists." J Immunol **180**(11): 7604-12.
13. Cameron JS, Alexopoulou L, Sloane JA et al. (2007). "Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals." J Neurosci **27**(47): 13033-41.
14. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ und Miller SD (2005). "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli." Glia **49**(3): 360-74.
15. Chakravarty S und Herkenham M (2005). "Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines." J Neurosci **25**(7): 1788-96.

16. Chen K, Iribarren P, Hu J et al. (2006). "Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide." J Biol Chem **281**(6): 3651-9.
17. Choe J, Kelker MS und Wilson IA (2005). "Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain." Science **309**(5734): 581-5.
18. Chomczynski P (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques **15**(3): 532-4, 536-7.
19. Cornelie S, Hoebeke J, Schacht AM et al. (2004). "Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition." J Biol Chem **279**(15): 15124-9.
20. Dalod M (2007). "Studies of SARM1 uncover similarities between immune and neuronal responses to danger." Sci STKE **2007**(417): pe73.
21. Dalpke AH, Schafer MK, Frey M et al. (2002). "Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia." J Immunol **168**(10): 4854-63.
22. Deng GM, Liu ZQ und Tarkowski A (2001). "Intracisternally localized bacterial DNA containing CpG motifs induces meningitis." J Immunol **167**(8): 4616-26.
23. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S und Reis e Sousa C (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science **303**(5663): 1529-31.
24. Dobrovolskaia MA und Vogel SN (2002). "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS." Microbes Infect **4**(9): 903-14.
25. Dong Y und Benveniste EN (2001). "Immune function of astrocytes." Glia **36**(2): 180-90.
26. Farina C, Krumbholz M, Giese T, Hartmann G, Aloisi F und Meinel E (2005). "Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes." J Neuroimmunol **159**(1-2): 12-9.
27. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL et al. (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." Nat Immunol **4**(5): 491-6.
28. Flier A und Krediet TG (2007). "Innate immunity: toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn." Neonatology **92**(3): 145-57.
29. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C et al. (2005). "Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88." J Immunol **174**(5): 2942-50.
30. Heil F, Hemmi H, Hochrein H et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.
31. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

32. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
33. Hickey WF (1999). "Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles." Seminars in Immunology **11**(2): 125-137.
34. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN und Weis JJ (2000). "Cutting edge: Repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2." Journal of Immunology **165**(2): 618-622.
35. Hong-Geller E, Chaudhary A und Lauer S (2008). "Targeting toll-like receptor signaling pathways for design of novel immune therapeutics." Curr Drug Discov Technol **5**(1): 29-38.
36. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T et al. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product." Journal of Immunology **162**(7): 3749-3752.
37. Hosoi T, Suzuki S, Nomura J et al. (2004). "Bacterial DNA induced iNOS expression through MyD88-p38 MAP kinase in mouse primary cultured glial cells." Molecular Brain Research **124**(2): 159-164.
38. Iliiev AI, Stringaris AK, Nau R und Neumann H (2003). "Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9)." Faseb Journal **17**(15): 412-+.
39. Jin MS, Kim SE, Heo JY et al. (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." Cell **130**(6): 1071-1082.
40. Jung DY, Lee H, Jung BY et al. (2005). "TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: A critical role of IFN-beta as a decision maker." Journal of Immunology **174**(10): 6467-6476.
41. Kaneko T und Silverman N (2005). "Bacterial recognition and signalling by the Drosophila IMD pathway." Cell Microbiol **7**(4): 461-9.
42. Kawai T und Akira S (2007). "Signaling to NF-kappa B by Toll-like receptors." Trends in Molecular Medicine **13**(11): 460-469.
43. Kim Y, Zhou P, Qian L et al. (2007). "MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival." J Exp Med **204**(9): 2063-74.
44. Kitamura Y, Kakimura J, Koike H et al. (2001). "Effects of 15-deoxy-delta(12,14) prostaglandin J(2) and interleukin-4 in Toll-like receptor-4-mutant glial cells." Eur J Pharmacol **411**(3): 223-30.
45. Klegeris A und McGeer PL (2005). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other anti-inflammatory agents in the treatment of neurodegenerative disease." Curr Alzheimer Res **2**(3): 355-65.
46. Krem MM und Di Cera E (2002). "Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation." Trends Biochem Sci **27**(2): 67-74.

47. Laflamme N, Echchannaoui H, Landmann R und Rivest S (2003). "Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria." Eur J Immunol **33**(4): 1127-38.
48. Laflamme N und Rivest S (2001). "Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components." FASEB J **15**(1): 155-163.
49. Laflamme N, Soucy G und Rivest S (2001). "Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS." J Neurochem **79**(3): 648-57.
50. Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC et al. (2007). "A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair." J Immunol **179**(7): 4808-20.
51. Leclerc V und Reichhart JM (2004). "The immune response of *Drosophila melanogaster*." Immunol Rev **198**: 59-71.
52. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S et al. (2002). "The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS." J Neurosci **22**(7): 2478-86.
53. Lehnardt S, Massillon L, Follett P et al. (2003). "Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8514-9.
54. Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T et al. (2008). "A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS." J Neurosci **28**(10): 2320-31.
55. Lehnardt S, Wennkamp J, Freyer D et al. (2007). "TLR2 and caspase-8 are essential for group B *Streptococcus*-induced apoptosis in microglia." J Immunol **179**(9): 6134-43.
56. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM und Hoffmann JA (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-83.
57. Letiembre M, Hao W, Liu Y et al. (2007). "Innate immune receptor expression in normal brain aging." Neuroscience **146**(1): 248-54.
58. Luders F, Segawa H, Stein D et al. (2003). "Slalom encodes an adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transporter essential for development in *Drosophila*." EMBO J **22**(14): 3635-44.
59. Luschnig S, Moussian B, Krauss J, Desjeux I, Perkovic J und Nusslein-Volhard C (2004). "An F1 genetic screen for maternal-effect mutations affecting embryonic pattern formation in *Drosophila melanogaster*." Genetics **167**(1): 325-42.
60. Ma Y, Li J, Chiu I et al. (2006). "Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis." J Cell Biol **175**(2): 209-15.

61. Marshak-Rothstein A (2006). "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease." Nat Rev Immunol **6**(11): 823-35.
62. Medzhitov R (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
63. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E et al. (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." Mol Cell **2**(2): 253-8.
64. Mizel SB, West AP und Hantgan RR (2003). "Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin." J Biol Chem **278**(26): 23624-9.
65. Mohler JD (1977). "Developmental genetics of the Drosophila egg. I. Identification of 59 sex-linked cistrons with maternal effects on embryonic development." Genetics **85**(2): 259-72.
66. Naitza S und Ligoxygakis P (2004). "Antimicrobial defences in Drosophila: the story so far." Mol Immunol **40**(12): 887-96.
67. Nguyen MD, Julien JP und Rivest S (2002). "Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?" Nat Rev Neurosci **3**(3): 216-27.
68. Nijhawan D, Honarpour N und Wang X (2000). "Apoptosis in neural development and disease." Annu Rev Neurosci **23**: 73-87.
69. Nimmo AJ und Vink R (2009). "Recent patents in CNS drug discovery: the management of inflammation in the central nervous system." Recent Pat CNS Drug Discov **4**(2): 86-95.
70. Nusslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K und Cremer C (1980). "A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of Drosophila." Nature **283**(5746): 474-6.
71. Ohashi K, Burkart V, Flohe S und Kolb H (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." J Immunol **164**(2): 558-61.
72. Olson JK und Miller SD (2004). "Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs." J Immunol **173**(6): 3916-24.
73. Prehaud C, Megret F, Lafage M und Lafon M (2005). "Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon." J Virol **79**(20): 12893-904.
74. Prinz M, Garbe F, Schmidt H et al. (2006). "Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis." J Clin Invest **116**(2): 456-64.
75. Rolls A, Shechter R, London A et al. (2007). "Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis." Nat Cell Biol **9**(9): 1081-8.
76. Rose D, Zhu X, Kose H, Hoang B, Cho J und Chiba A (1997). "Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RP3 motoneuron growth cone in Drosophila." Development **124**(8): 1561-71.

77. Rutz M, Metzger J, Gellert T et al. (2004). "Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner." Eur J Immunol **34**(9): 2541-50.
78. Saitoh S und Miyake K (2009). "Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors." Immunol Rev **227**(1): 32-43.
79. Schupbach T und Wieschaus E (1989). "Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations." Genetics **121**(1): 101-17.
80. Segal BM, Chang JT und Shevach EM (2000). "CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo." J Immunol **164**(11): 5683-8.
81. Smiley ST, King JA und Hancock WW (2001). "Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4." J Immunol **167**(5): 2887-94.
82. Stack J, Haga IR, Schroder M et al. (2005). "Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence." J Exp Med **201**(6): 1007-18.
83. Takeda K, Kaisho T und Akira S (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
84. Takeshita S, Takeshita F, Haddad DE, Janabi N und Klinman DM (2001). "Activation of microglia and astrocytes by CpG oligodeoxynucleotides." Neuroreport **12**(14): 3029-32.
85. Tanji T und Ip YT (2005). "Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response." Trends Immunol **26**(4): 193-8.
86. Tsunoda I, Tolley ND, Theil DJ, Whitton JL, Kobayashi H und Fujinami RS (1999). "Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA." Brain Pathol **9**(3): 481-93.
87. Walter S, Letiembre M, Liu Y et al. (2007). "Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease." Cell Physiol Biochem **20**(6): 947-56.
88. Weber AN, Tauszig-Delamasure S, Hoffmann JA et al. (2003). "Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling." Nat Immunol **4**(8): 794-800.
89. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H et al. (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." Nature **420**(6913): 324-9.
90. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H et al. (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." Nat Immunol **4**(11): 1144-50.
91. Yang K, Puel A, Zhang S et al. (2005). "Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses." Immunity **23**(5): 465-78.

92. Yang RB, Mark MR, Gray A et al. (1998). "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." Nature **395**(6699): 284-8.
93. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.

Erklärung an Eides Statt

Ich, David Kaul, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Die Expression von Toll-like Rezeptoren bei der Entwicklung des Mausgehirns“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Berlin, den 01.04.2011

David Kaul

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Lehnardt S, Lehmann S, **Kaul D**, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, Krueger C, Nitsch R, Meisel A, Weber JR. (2007). "Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia." Journal of Neuroimmunology, 190(1-2): 28-33.

Kaul D, Wu CL, Adkins CB, Jordan KW, Defeo EM, Habel P, Peterson RT, McDougal WS, Pohl U, Cheng LL.(2010). "Assessing prostate cancer growth with mRNA of spermine metabolic enzymes." Cancer Biology & Therapy, 9(9).

Kaul D, Habel P, Franzoni E, Wulczyn G, Naumann T, Veh R, Lehmann S, Medzhitov R, Lehnardt S. "Expression of toll-like receptors in the developing brain.", PLoS One, 2012;7(5)

Lehmann S, Rosenberger K, Krüger C, Habel P, **Kaul D**, Rybak A, Brandt C, Wulczyn G, Lehnardt S. "Extracellularly Delivered Single-Stranded Viral RNA Causes Neurodegeneration Dependent on TLR7.", J Immunol, 2012 Aug 1;189(3)

Lehmann S, Krüger C, Park B, Rosenberger K, Baumgart J, Trimbuch T, Eom G, **Kaul D**, Habel P, Kälin R, Veh R, Ninnemann O, Nitsch R, Heppner F, Golenbock D, Schott E, Wulczyn G, Ploegh H, Lehnardt S. "An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration." Nature Neuroscience, *in print*

Kongressbeiträge

Kaul D, Lehnardt S
"Toll-like Receptors in Brain Development",
Berlin Brain Days 2008, 10.-12.12.2008, Berlin, Deutschland

Habel P, Lehmann S, **Kaul D**, Lehnardt S
"The Impact of Toll-like Receptor Expression on the Outcome of Cerebral Injury in the Context of Stroke", Berlin Brain Days 2008, 10.-12.12.2008, Berlin, Deutschland

Herberger SD, **Kaul D**, Adkins CB, Smith BL, Cheng LL, Lentz MR, Brachtel EF
"A Glimpse into Tumor Metabolism by Magnetic Resonance Spectroscopy: Choline Compounds and Choline Kinase Gene Expression in Human Breast Cancer", United States and Canadian Academy of Pathology 98th annual meeting, 7.-13.03.2009, Boston, MA, USA

Lehmann S, **Kaul D**, Krüger C, Zipp F, Nitsch R, Lehnardt S
"Activation of TLR7 in Microglia leads to Neuroinflammation"
2nd European Congress of Immunology, 13.-16.09.09, Berlin, Deutschland

Cheng LL, **Kaul D**, Wu CL, Adkins C, Jordan K, Habel P, Peterson R, McDougal S, Pohl U
"Assesing Prostate Cancer Growth with Intact Tissue MRS and mRNA of Spermine Anabolic Enzymes", ISMRM, Section for Magnetic Resonance Technologists 19th Annual Meeting, 01.-02.05.2010, Stockholm, Schweden

Lebenslauf

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

Danksagung

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

Diese Arbeit widme ich meiner Familie.