

Aus der  
Cecilie-Vogt-Klinik für Neurologie  
Charité-Universitätsmedizin Berlin  
(Direktorin: Univ.-Professorin Dr. med. Frauke Zipp)

## **Habilitationsschrift**

# **Die Bedeutung der Toll-like Rezeptoren für neuronale und gliale Schädigung im Zentralen Nervensystem**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Experimentelle Neurologie  
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Seija Lehnardt**  
**geboren am 22.02.1977 in Berlin**

**Eingereicht:** Januar 2008

**Dekan:** Prof. Dr. M. Paul

1. **Gutachter:** Prof. Dr. M.T. Heneka
2. **Gutachter:** Prof. Dr. W.J. Streit

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einführung in die Thematik	4
2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext	7
2.1 Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS durch pathogene Bestandteile	7
2.1.1 Die Rolle des TLR4 bei der Schädigung von Oligodendrozyten	7
2.1.2 Die Rolle des TLR4 bei der durch Pathogene induzierten neuronalen Schädigung	10
2.1.3 Die Rolle des TLR2 bei der durch Pathogene induzierten neuronalen Schädigung	13
2.1.4 Die Rolle des TLR2 bei der durch Pathogene induzierten Schädigung der Mikroglia	17
2.2 Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS durch wirtseigene Bestandteile	20
2.2.1 Die Rolle des TLR2 bei der zerebralen Schädigung im Kontext des Schlaganfalls	20
2.2.2 Identifizierung des Heat shock Protein 60 als endogener Ligand des TLR4 im ZNS	23
3. Diskussion	26
4. Zusammenfassung	32
5. Literaturverzeichnis	34
Danksagung	43
Eidesstattliche Versicherung	44

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation
DC	Dendritische Zelle
GBS	Gruppe-B-Streptokokken
GBS-F	Gruppe-B-Streptokokken Faktor
HI	Hypoxie-Ischämie
HSP	Heat shock protein
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
MHC	Major Histocompatibility Complex
MyD88	Myeloid differentiation factor-88
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
NO	Stickstoffoxid (nitric oxide)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PRR	Pattern-recognition receptor
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einführung in die Thematik

Der offensichtliche Vorteil einer Entzündungsreaktion im Zentralen Nervensystem (ZNS) ist der Schutz vor eindringenden Pathogenen, die Limitierung von Neoplasmen und die Beseitigung von Zelltrümmern. Ein zunächst unerwarteter Nachteil einer zerebralen Entzündung besteht in der Potenzierung neuronaler Schädigung. Das ZNS ist im Hinblick auf eine entzündlich bedingte Schädigung insofern als besonders vulnerabel anzusehen, als dass Neurone überaus empfindlich auf im Rahmen der Entzündungsprozesse freigesetzte instabile Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen sowie Zytokine reagieren (Chao et al., 1992b). Zudem ist die Regenerationskapazität des ZNS erheblich durch Inhibitoren des axonalen Wachstums und eine suboptimale Repopulation mit neuronalen Stammzellen eingeschränkt (Bjorklund and Lindvall, 2000; Goldberg and Barres, 2000; Fournier and Strittmatter, 2002). Auch das weiße Mark reagiert empfindlich auf entzündliche Prozesse: Zum einen inhibieren proinflammatorische Zytokine die Differenzierung von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten, zum anderen induzieren sie in reifen Oligodendrozyten apoptotischen Zelltod (Selmaj et al., 1991; Louis et al., 1993; Selmaj et al., 1998). Als Folge ist eine vakuoläre Degeneration des Myelins zu beobachten (Probert et al., 1995; Taupin et al., 1997). Im Einklang mit diesen Daten wurde in den letzten Jahren zunehmend deutlich, dass Entzündungsvorgänge eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und dem Verlauf unterschiedlicher Erkrankungen des ZNS spielen. Untersuchungen sowohl am Menschen als auch im Tiermodell zeigen, dass diverse Erkrankungen des ZNS wie der Schlaganfall, die Multiple Sklerose, die bakterielle Meningitis, aber auch klassische neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson nicht nur auf eine zellautonome, d.h. primäre, Schädigung der Neurone oder Oligodendrozyten zurückzuführen sind, sondern dass aktivierte Immunzellen im Rahmen inflammatorischer Prozesse zur Schädigung des ZNS beitragen. Bei der bakteriellen Meningitis zum Beispiel gilt es heute als etabliert, dass mindestens die Hälfte der neuronalen Schädigung durch die wirtsinduzierte Entzündungsreaktion verursacht wird (Weber and Tuomanen, 2007). Darüber hinaus gewinnen anti-entzündliche Therapieansätze besonders im Hinblick auf die Progression der jeweiligen zerebralen Erkrankung zunehmend an klinischer Bedeutung (Perry et al., 2003). Das ZNS wurde aufgrund der Bluthirnschranke lange Zeit als ein „immunprivilegiertes Organ“ betrachtet. In den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend deutlich, dass Immunreaktionen auch in diesem Organ auftreten und eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des ZNS spielen (Hickey, 1999). Mikroglia repräsentieren als mononukleäre Phagozyten die residente zelluläre Abwehr des ZNS und sind maßgeblich an der Generierung entzündlicher Prozesse beteiligt. Diese Prozesse schließen sowohl die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine als auch

Phagozytose, Zytotoxizität und die Regulation der T-Zell-Antwort durch Antigenpräsentation ein und bilden in ihrer Gesamtheit die Grundlage der zerebralen Inflammation (Aloisi, 2001; Hanisch, 2002). Die Aktivierung der Mikroglia wird bei jeglicher Schädigung bzw. Erkrankung des ZNS beobachtet (Perry, 1994; Kreutzberg, 1996; Streit et al., 2004). Dementsprechend wird die resultierende Entzündung als eine universelle Reaktion auf jegliche Schädigung des ZNS angesehen, wobei es jedoch bis heute unklar ist, ob die inflammatorischen Prozesse der im Rahmen von Erkrankungen auftretenden neuronalen oder oligodendroglialen Schädigung vorausgehen oder durch diese erst induziert werden. Auch die an einer solchen Entzündung beteiligten molekularen Mechanismen sind zum großen Teil unbekannt.

Das Immunsystem gliedert sich in einen angeborenen und einen erworbenen Teil. Das erworbene Immunsystem erkennt Pathogene mit Hilfe hochvariabler Rezeptoren auf spezialisierten Immunzellen. Die Interaktion eines T- oder B-Zell-Rezeptors mit seinem Antigen führt zur klonalen Expansion und letztendlich zur Eradikation des Pathogens. Dieser Mechanismus erfordert Zeit. Die angeborene Immunität hingegen setzt unmittelbar ein. Organspezifische, gewebständige Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, dendritische Zellen (DC) sowie die im ZNS angesiedelten Mikroglia und perivaskulären Makrophagen reagieren früh auf in den Wirt eindringende Organismen und kontrollieren gleichzeitig unterschiedliche Funktionen der adaptiven Immunantwort (Akira et al., 2006). Sie erkennen Pathogene mit Hilfe von im Laufe der Evolution hoch konservierten Rezeptoren, die nahezu allen Organismen gemeinsam sind. Diese Rezeptoren werden als Pattern-Recognition Rezeptoren (PRR) bezeichnet und schließen die Toll-like Rezeptoren (TLR) ein. *Toll* wurde primär als ein Membranrezeptor beschrieben, der die dorso-ventrale Ausrichtung der Körperachse der Fruchtfliege *Drosophila* während der Embryogenese steuert (Anderson et al., 1985). Später wurde gezeigt, dass *Toll* zudem eine notwendige Komponente der antifungalen Immunantwort der adulten *Drosophila* darstellt (Lemaitre et al., 1996). Das erste humane Ortholog des *Drosophila Toll* wurde 1997 von Janeway und Kollegen als ein Rezeptor beschrieben, der angeborene Immunität vermittelt (Medzhitov et al., 1997). Kurze Zeit später wurde TLR4 als derjenige Rezeptor definiert, der Lipopolisaccharid (LPS), die Hauptkomponente der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien, bindet und dessen Aktivierung zu Inflammation führt. Er ist dadurch maßgeblich an der angeborenen Immunantwort gegen Gram-negative Bakterien beteiligt (Poltorak et al., 1998; Beutler, 2000). Bisher wurden 13 verschiedene TLR Homologe identifiziert. Diese Rezeptoren erkennen invariante, mit Pathogenen assoziierte molekulare Strukturen, sogenannte PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Zu diesen mikrobiellen Motiven gehören u.a. LPS, Lipoteichonsäure (LTA), Lipoproteine, virale DNA und RNA sowie unmethylierte, an CpG-

Motiven reiche DNA, die bevorzugt in Bakterien vorkommt (Akira et al., 2006). TLR enthalten Leuzin-reiche Wiederholungen in der extrazellulären Komponente und eine TIR (Toll/IL-1 Rezeptor) Domäne im zytoplasmatischen Anteil. Die den TLR nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktion ist komplex und schließt intrazelluläre Proteine wie den Myeloid-Differenzierungsfaktor 88 (MyD88), die Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK)1-4 und den TNF- $\alpha$  Rezeptor assoziierten Faktor (TRAF) 6 ein. Die durch diese Moleküle gebildete Signalkaskade führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Akira et al., 2006). Mit Ausnahme von TLR3 nutzen alle bisher identifizierten TLR diese Signalkaskade. Drei weitere Adapter-Moleküle, TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$  (TRIF oder TICAM-1), TIR domain-containing adapter protein (TIRAP) bzw. MyD88-adapter like (Mal) und TRIF-related adapter molecule (TRAM), spielen eine Rolle bei MyD88-unabhängigen Signalkaskaden (Akira et al., 2006). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt letztendlich zur Freisetzung proinflammatorischer Moleküle wie TNF- $\alpha$ , Stickstoffoxid (NO) und verschiedene Interleukine (IL), die wiederum die Grundlage jeder Entzündung bilden. Die Aufklärung der Vorgänge, die der Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS zugrunde liegen, ist essentiell für das Verständnis der Entstehung entzündlicher Prozesse und der damit einhergehenden Schädigung des ZNS.

## **2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext**

### **2.1 Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS durch pathogene Bestandteile**

#### **2.1.1 Die Rolle des TLR4 bei der Schädigung von Oligodendrozyten**

Verschiedene Erkrankungen des ZNS wie die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) oder die Multiple Sklerose werden im Hinblick auf Manifestation und Progression mit früheren - jedoch nicht spezifischen - Infektionen assoziiert (Volpe, 1997; Moses and Sriram, 2001; Yucesan and Sriram, 2001). Die Beziehung zwischen einer systemischen Infektion und einer zerebralen Schädigung ist besonders ausführlich bei der PVL untersucht worden und kann als Modell für verschiedene zerebrale Erkrankungen dienen. Die PVL wird als eine wesentliche Ursache der kognitiven Beeinträchtigung und der Zerebralparese angesehen, deren Ursachen in einer frühkindlichen Hirnschädigung liegen. Die daraus resultierende Behinderung ist durch Störungen des Nerven- und Muskelsystems im Bereich der willkürlichen Bewegungskoordination und durch ein abnormes Lern- und Verhaltensmuster charakterisiert. Sehr kleine Frühgeborene sind etwa 100- bis 300-mal häufiger betroffen als Reifgeborene (Volpe, 2001). Die fokale Nekrose mit nachfolgendem Zellverlust und die diffuse Schädigung der weißen Substanz, die insbesondere die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten betrifft, stellen die pathologischen Merkmale dieser Erkrankung dar (Leviton and Gilles, 1981; Back et al., 2002). Die Pathogenese der PVL wird heute als multifaktoriell beurteilt und schließt zum einen die durch eine Ischämie und Reperfusion bedingte Schädigung mit gestörter Regulation des Blutflusses in der kritischen frühkindlichen Phase ein, zum anderen spielt der durch entzündliche Vorgänge induzierte Schaden im Rahmen einer maternalen und/oder fetalen Infektion eine wichtige Rolle (Volpe, 1997). Sowohl bei der Ischämie und Reperfusion als auch bei der Infektion werden reaktive Sauerstoffradikale und Stickstoffderivate wie NO freigesetzt. NO wiederum verbindet sich mit Superoxiden zum hochreaktiven Peroxynitrat. Freie Radikale führen zu einer ausgeprägten Schädigung der während der frühkindlichen Phase in der weißen Substanz dominierenden Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (Haynes et al., 2005). Ein Zusammenhang zwischen einer systemischen Infektion, zirkulierendem LPS und der Pathogenese der PVL wurde erstmals von Gilles und Kollegen vermutet (Gilles et al., 1977). Tatsächlich wurde in Tierversuchen gezeigt, dass sowohl LPS als auch ganze *E. coli* Bakterien neurotoxische Eigenschaften besitzen und über die Induktion verschiedener Zytokine auch zur Schädigung der weißen Substanz führen (Hillhouse and Mosley, 1993; Barone et al., 1997; Yoon et al., 1997a; Cai et al., 2000). Analog hierzu wurde der Effekt proinflammatorischer Zytokine und der Überexpression von

TNF- $\alpha$  als Ursache für auftretende Defekte der Myelinisierung und für die Apoptose der Oligodendroglia beschrieben (Akassoglou et al., 2003). Eine geringe Dosis LPS erhöht die Anfälligkeit neugeborener Ratten, zerebrale Infarkte als Antwort auf ansonsten subklinische Phasen der Hypoxie-Ischämie auszubilden (Ekland et al., 2001). Auch beim Menschen häufen sich die Hinweise darauf, dass eine kausale Verbindung zwischen intrauterinen Infektionen und der Ausbildung einer PVL besteht: Die Inzidenz der zerebralen Parese und der PVL ist bei Frühgeborenen erhöht, wenn zum einen maternale/fetale Infektionen vorliegen (Zupan et al., 1996; Baud et al., 1998; Dammann and Leviton, 1998; Leviton et al., 1999; Wu and Colford, 2000), zum anderen erhöhte Konzentrationen verschiedener Zytokine im Nabelschnurblut, im Fruchtwasser oder im neonatalen Blut nachgewiesen werden (Grether and Nelson, 1997; Yoon et al., 1997b; Martinez et al., 1998; Nelson et al., 1998). Da die bei den mit der PVL assoziierten Infektionen nachgewiesenen Mikroben diverser Natur sind (Gibbs et al., 1992), ist anzunehmen, dass der gesuchte Schädigungsmechanismus eine Eigenschaft der Infektion *per se* darstellt, nicht aber auf *einen* spezifischen Erreger zurückzuführen ist.

Um die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Schädigung der weißen Substanz zu beleuchten, untersuchten wir zunächst die Expression des TLR4 und seines Ko-Rezeptors CD14 in Zellen des ZNS. Diese Rezeptoren sind in zirkulierenden Monozyten für die durch LPS ausgelösten molekularen und zellulären Effekte erforderlich (Means et al., 2000; Medzhitov and Janeway, 2000). Unsere PCR Studien zeigten, dass Mikroglia sowohl TLR4 als auch CD14 exprimieren. Hingegen weisen Oligodendrozyten, die Zielzellen pathologischer Prozesse bei der PVL (Back et al., 2001), niedrige Level an CD14, jedoch kein TLR4 auf. Aus früheren Studien an Zellkulturen war bereits bekannt, dass die Inkubation mit LPS zu einer Reduzierung der Oligodendrozytenzahl führt (Molina-Holgado et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch ungeklärt, ob dieser toxische Effekt zellautonom induziert oder durch andere Zellen wie Astrozyten und/oder Mikroglia vermittelt wird. Unsere funktionellen Studien *in vitro* ergaben, dass LPS seine biologische Wirkung hauptsächlich über Mikroglia ausübt. Die Aktivierung dieser Zellen war zuvor schon in frühen Phasen der Pathogenese der PVL aufgefallen (Kadhim et al., 2001). Desweiteren beobachteten wir, dass an Fluoreszenz gekoppeltes LPS ausschließlich an Mikroglia bindet, nicht aber an Oligodendrozyten oder Astrozyten. Wir untersuchten mit Hilfe von *Ips*<sup>d</sup> Mäusen, ob die durch LPS induzierte Toxizität spezifisch auf TLR4 zurückzuführen ist und von Mikroglia vermittelt wird. Diese Tiere weisen eine Punktmutation am Kodon 712 der für TLR4 kodierenden Genregion auf, und die intrazelluläre Signaltransduktion jenseits von TLR4 ist bei diesen Tieren unterbrochen. Makrophagen dieser Mauslinie sezernieren nach Stimulation mit LPS im



Gegensatz zum Wildtypen weder TNF- $\alpha$  noch IL-1 oder IL-6 (Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999; Qureshi et al., 1999). In den von uns durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass sich die aus diesen Tieren präparierten ZNS Mischkulturen unempfindlich gegenüber einer Inkubation mit LPS verhielten, wohingegen die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten in den aus Wildtypmäusen isolierten Mischkulturen nach Zugabe von LPS starben. Damit wurde bewiesen, dass der durch LPS vermittelte toxische Effekt auf Oligodendrozyten über TLR4 vermittelt wird. Um die physiologische Relevanz der durch LPS induzierten Toxizität auf Oligodendrozyten zu beleuchten, wurde LPS stereotaktisch in die Region des Corpus callosum neugeborener Ratten injiziert. Die histologische Auswertung ergab, dass die Applikation von LPS zu einer Schädigung der Oligodendrozyten bzw. der weißen Substanz führt. Diese Schädigung manifestiert sich in einer Hypomyelinisierung und der Ausbildung zystischer Läsionen, die in dieser Form auch die neuropathologischen Charakteristika der PVL im Menschen repräsentieren (P1).

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die durch LPS induzierte Schädigung der Vorläufer-Oligodendrozyten die Expression von TLR4 in Mikroglia erfordert. Somit wurde die Aktivierung der angeborenen Immunität im ZNS als eine mechanistische Verbindung zwischen einer Infektion mit Gram-negativen Bakterien und der PVL etabliert.

### **Eigene Publikation:**

**P1** Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. The Toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS.

J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7): 2478-2486.

### **2.1.2 Die Rolle des TLR4 bei der durch Pathogene induzierten Neurodegeneration**

In den meisten Organen führt eine Entzündung zu einem „Kollateralschaden“, d.h. dass nicht nur der primäre Auslöser einer solchen Immunreaktion, wie z.B. die eindringenden Mikroben, mit den entzündungsassoziierten toxischen Bedingungen konfrontiert wird, sondern auch das organspezifische gesunde Gewebe wird von diesen entzündlichen Prozessen beeinflusst. Abhängig von der Regenerationskapazität des jeweiligen Organs ist dieser „Kollateralschaden“ mehr oder weniger gut reversibel. Im ZNS ergibt sich jedoch eine spezielle Situation: Aufgrund der hier nur spärlich ausgeprägten Eigenschaft der Geweberegeneration führt eine Entzündungsreaktion zu einem irreversiblen Verlust der Neurone und gegebenenfalls zu einer Atrophie des Gewebes.

Es ist seit langem bekannt, dass systemische Infektionen mit einer Verschlechterung verschiedener Erkrankungen des ZNS einhergehen. Die Mechanismen, die diesem Zusammenhang zugrunde liegen, sind jedoch unklar. Auch die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer ist größtenteils unbekannt, und sowohl virale als auch bakterielle Infektionen werden immer wieder als Primärursache der jeweiligen Erkrankung diskutiert. Es fällt auf, dass bei den unterschiedlichsten neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Huntingtonsche Erkrankung, Multiple Sklerose oder ALS erhöhte Konzentrationen von Molekülen vorgefunden werden, die sowohl mit einer Aktivierung der angeborenen als auch der adaptiven Immunität einhergehen. Die erst in den letzten Jahren identifizierten Mechanismen der Immunantwort im ZNS bilden die Grundlage für die Hypothese, dass immunologische Prozesse insbesondere für sporadisch auftretende neurodegenerative Erkrankungen ätiologisch bedeutsam sein könnten, und weisen auf die Möglichkeit hin, dass die primäre Ursache solcher Erkrankungen auch außerhalb des ZNS liegen könnte. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese werden bei Patienten mit den zuvor genannten zerebralen Erkrankungen sowohl im Serum als auch im Liquor erhöhte Konzentrationen an IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gefunden (Pasinetti, 1998b; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Julien, 2001a). Diese Moleküle werden u.a. von aktivierter Mikroglia sezerniert und führen in verschiedenen Tiermodellen der Neurodegeneration zum neuronalen Zelltod. Die hier beobachteten zelltoxischen Effekte werden durch anti-inflammatorische Agentien und neutralisierende Antikörper abgeschwächt (Pasinetti, 1998a). So ist die auf eine Inflammation hinweisende Aktivierung der Mikroglia und der Astrozyten im ZNS dieser Patienten ein stabiles pathologisches Merkmal.

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass LPS neurotoxische Eigenschaften besitzt (Castano et al., 1998). Verschiedene Regionen des ZNS reagieren unterschiedlich empfindlich auf LPS. So fanden Kim und Kollegen, dass nach Injektion bakteriellen Endotoxins in den Hippocampus,

den Kortex oder die Substantia nigra adulter Ratten ausschließlich eine neuronale Schädigung im Bereich der Substantia nigra eintrat. Die Autoren führten diese Differenzen auf eine unterschiedliche Dichte residenter Mikroglia in den jeweiligen Regionen zurück (Kim et al., 2000).

Da TLR4 der am besten untersuchten TLR ist und LPS, das eine hohe biologische Potenz aufweist, als ein hochspezifischer Ligand des genannten Rezeptors etabliert ist, erschien uns diese Molekülkombination als besonders geeignet, um die Rolle der angeborenen Immunität bei der neuronalen Schädigung im ZNS zu untersuchen (P2). Die Aktivierung des TLR4 durch LPS dient in unseren Arbeiten als ein Modell für die Aktivierung der angeborenen Immunität im ZNS und für seine Folgen. Es war bekannt, dass Mikroglia die Rezeptoren TLR4 und CD14 exprimieren, die beide für die durch LPS induzierte Signalkaskade erforderlich sind (P1, (Becher and Antel, 1996). Wir hatten in Vorarbeiten demonstriert, dass andere gliale Zellen diese Moleküle nicht besitzen. In unseren erweiterten PCR Studien zeigte sich, dass Mikroglia tatsächlich die einzige Zellpopulation im ZNS ist, die TLR4 exprimiert; insbesondere Neurone weisen diesen Rezeptor nicht auf. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die durch LPS induzierte Neurotoxizität zum einen ein Spezies-übergreifendes Phänomen darstellt und nicht von neuronalen Subklassen abhängig ist; zum anderen wird der toxische Effekt - analog zu den zuvor an Oligodendrozyten durchgeführten Untersuchungen - nicht zellautonom, sondern durch Mikroglia vermittelt. Gemischte Zellkulturen des ZNS aus *lps<sup>d</sup>* Mäusen, die einen non-funktionalen TLR4 exprimieren, sind vor der durch LPS induzierten Neurotoxizität gänzlich geschützt. Die physiologische Relevanz des TLR4 für die neuronale Schädigung wurde an neonatalen *lps<sup>d</sup>* und Wildtypmäusen untersucht, die nach einer intraperitonealen Gabe von LPS einer für sich subklinischen Hypoxie-Ischämie ausgesetzt wurden. Die histologische Analyse dieser Tiere zeigte, dass Wildtypmäuse einen ausgeprägten neuronalen und axonalen Schaden im Kortex sowie in angrenzenden Strukturen erlitten hatten, während die im Hinblick auf TLR4 mutierten Tiere vor Neurodegeneration geschützt waren. Somit kann die Aktivierung der angeborenen Immunität im ZNS grundsätzlich zu einer neuronalen Schädigung führen und insbesondere eine durch Hypoxie-Ischämie hervorgerufene subklinische Schädigung der Neurone in eine manifeste Neurodegeneration umwandeln (P2).

**Eigene Publikation:**

**(P2)** Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway.  
PNAS 2003 Jul 8;100(14): 8514-8519.

### 2.1.3 Die Rolle des TLR2 bei der durch Pathogene induzierten neuronalen Schädigung

Streptokokken der serologischen Gruppe B (GBS oder *S. agalactiae*) stellen die häufigste Ursache der neonatalen Sepsis dar. Eine Besiedelung des mütterlichen Genitaltraktes führt zur Infektion des Kindes mit dem Risiko einer Neugeborenenenerkrankung. Es werden zwei Formen der Erkrankung unterschieden: Die frühe Form der Infektion (early onset), die in den ersten Stunden bis Tagen nach der Geburt auftritt, äußert sich als schwere Allgemeininfektion mit einer ausgeprägten Pneumonie. Der Krankheitsverlauf kann in eine schwere Schocksymptomatik münden, und es muss mit neurologischen Langzeitschäden gerechnet werden. Die zweite Form ist die späte Neugeboreneninfektion (late onset), bei der Symptome einer Infektion mit Streptokokken ca. eine Woche nach der Geburt auftreten. Die hier im Vordergrund stehende bakterielle Meningitis kann zu verschiedenen neurologischen Folgeschäden führen: 52% der Patienten, die diese Infektion überleben, sind zeitlebens kognitiv beeinträchtigt, leiden unter Krampfanfällen und weisen motorische Ausfälle auf (de Gans and van de Beek, 2002; Heath et al., 2004).

Die Inzidenz der Erkrankung in den USA beträgt 1,8 pro 1000 Lebendgeburten, ca. 80% der Fälle betreffen reife Neugeborene. Die Mortalitätsrate beträgt 6% (Schuchat et al., 1990). In den USA repräsentieren GBS allgemein die dritthäufigste Ursache der bakteriellen Meningitis (Domingo et al., 1997; Schuchat, 1999), und bei 50% aller neonatalen Meningitiden werden GBS als verantwortlicher Keim nachgewiesen (Volpe, 2001).

TLR2 wurde in den letzten Jahren als ein Rezeptor des angeborenen Immunsystems charakterisiert, der ein auffallend großes Repertoire an Liganden aufweist. Alle Klassen von Mikroorganismen, die bis heute getestet wurden, weisen mindestens einen Vertreter auf, der TLR2 aktiviert. Dieser Rezeptor erkennt vor allem Gram-positive Bakterien und bindet verschiedene mikrobielle Komponenten wie Lipoteichonsäure (LTA) oder Lipoproteine. TLR2 interagiert mit TLR1 und TLR6, die bei der Diskriminierung subtiler Veränderungen des Lipidanteils der Lipoproteine eine Schlüsselrolle spielen. Die Aktivierung dieser Dimere mündet in die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Akira et al., 2006). Die Bedeutung des TLR2 für die Wirtsabwehr gegen Gram-positive Bakterien erschließt sich aus dem Phänotyp TLR2-defizienter Mäuse: Diese Tiere zeigen eine ausgeprägte Anfälligkeit für Infektionen, die durch *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufen werden (Takeuchi et al., 2000; Echchannaoui et al., 2002). Ein Polymorphismus des humanen *tlr2* Gens ist mit einer reduzierten Immunantwort auf verschiedene bakterielle Lipoproteine und einem septischen Schock nach Infektion mit Gram-positiven Bakterien assoziiert (Cook et al., 2004).

TLR2 mRNA wird konstitutiv im ZNS exprimiert (Laflamme et al., 2001). Es wurde bereits in

früheren Arbeiten berichtet, dass TLR2, TLR6 und MyD88 in Makrophagen in die inflammatorische Antwort auf Infektionen mit GBS involviert sind (Henneke et al., 2001; Mancuso et al., 2004).

Aus unseren Vorarbeiten (P1, P2) war bereits bekannt, dass die Aktivierung der angeborenen Immunität durch Bestandteile Gram-negativer Bakterien im ZNS zu neuronaler Schädigung führen kann. Im Kontext der durch GBS induzierten bakteriellen Meningitis sollte nun untersucht werden, ob auch Gram-positive Bakterien von der angeborenen Immunität im ZNS erkannt werden und wenn ja, welche Konsequenzen sich hieraus insbesondere für Neurone ergeben (P3). Wir analysierten zunächst den Effekt von GBS auf Neurone und fanden, dass GBS in Anwesenheit von Mikroglia Neurodegeneration auslösen. In aufgereinigten Neuronenkulturen blieb diese Wirkung aus. GBS-Faktor (GBS-F) ist ein hitze-labiles Molekül, das während des bakteriellen Wachstums von GBS freigesetzt wird und in peritonealen Makrophagen zu einer starken Induktion von NO führt (Henneke et al., 2001). Auch dieses GBS-Derivat wurde von uns im Hinblick auf Neurotoxizität geprüft und zeigte ähnliche Effekte wie intakte GBS: GBS-F induzierte neuronalen Zelltod nur in Abhängigkeit von Mikroglia. TUNEL-Analysen charakterisierten sowohl den durch GBS als auch den durch GBS-F vermittelten neuronalen Zelltod als Apoptose. Als nächstes analysierten wir die Expression des TLR2 in verschiedenen Zellen des ZNS *in vitro*: Sowohl Mikroglia als auch Astrozyten und Oligodendrozyten exprimierten TLR2; einzig Neurone wiesen diesen Rezeptor nicht auf. Um den molekularen Mechanismus zu identifizieren, welcher der durch GBS und GBS-F induzierten Neurotoxizität zugrunde liegt, berücksichtigten wir folgende Informationen: Zum einen war bekannt, dass aktivierte TLR den intrazellulären Adapter MyD88 rekrutieren (Kawai et al., 1999) und dass dieser wiederum über eine komplexe Signalkaskade zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (Medzhitov et al., 1998; Underhill et al., 1999). Zum anderen induzieren sowohl GBS als auch GBS-F in Makrophagen die Produktion von NO (Henneke et al., 2001). Neben neuroprotektiven Eigenschaften weist NO auch neurotoxische Eigenschaften auf (Chao et al., 1992a; Brosnan et al., 1994): Der durch NO vermittelte neuronale Zelltod wurde in einem infantilen Rattenmodell der durch GBS induzierten Meningitis beschrieben (Leib et al., 1996). Vor diesem Hintergrund verglichen wir die Freisetzung von NO aus mit GBS und GBS-F behandelten Mikroglia aus Wildtyptieren mit Zellen aus MyD88- und TLR2-defizienten Mäusen. Unsere Studien zeigten, dass erstens GBS und GBS-F die Produktion von NO in Mikroglia initiieren, zweitens dieser Vorgang TLR2 und MyD88 erfordert und drittens das in diesem Kontext sezernierte NO neurotoxische Eigenschaften aufweist.

Da LTA ein gut untersuchter Bestandteil Gram-positiver Bakterien und zugleich ein etablierter Ligand für TLR2 ist (Neuhaus and Baddiley, 2003; Akira et al., 2006), analysierten

wir die Rolle von LTA bei der mikroglialen Sekretion von NO und der neuronalen Schädigung. Die Inkubation mit LTA führte weder zu einer neuronalen Schädigung in aufgereinigten Neuronenkulturen noch in Kulturen, die aus Neuronen und Mikroglia bestanden. Auch führte es nicht zur Sekretion von NO durch Mikroglia. Somit war LTA nicht verantwortlich für die zuvor beobachteten und durch GBS induzierten neurotoxischen Effekte, und der Ligand des TLR2 in diesem Kontext bleibt zunächst unbekannt. Zuletzt stellte sich die Frage, ob TLR2 und MyD88 für die durch GBS- und/oder durch GBS-F induzierte Neurotoxizität erforderlich sind. Mit Hilfe von TLR2- und MyD88-defizienten Mäusen wiesen wir nach, dass sowohl GBS als auch GBS-F in Abhängigkeit von TLR2 und MyD88 in Mikroglia zu Neurodegeneration führen.

Die physiologische Relevanz dieser Daten wurde in einer anschließenden Studie untersucht, in der Pam3CysSK4, ein synthetisch hergestellter und hochspezifischer Ligand für TLR2, intrathekal in Wildtypmäuse injiziert wurde (P4). Als Vergleichsgruppe dienten Tiere, denen intrathekal lebende Pneumokokken verabreicht wurden und die eine typische bakterielle Meningitis entwickelten. Die Analysen der mit lebenden Bakterien oder Pam3CysSK4 behandelten Tiere zeigten, dass beide Gruppen im Vergleich zu Kontroll-operierten Tieren einen beschleunigten zerebralen Blutfluss und einen erhöhten intrakraniellen Druck entwickelten. Zudem wies der Liquor beider Gruppen erhöhte Leukozytentiter auf. Damit wurde gezeigt, dass die alleinige Aktivierung des TLR2 zur Ausbildung derselben pathophysiologischen Merkmale führt, die bei der durch lebende Bakterien verursachten Meningitis gefunden werden. Weitere Experimente ergaben, dass die durch eine Injektion von Pam3CysSK4 ausgelöste Inflammation in TLR2-defizienten Mäusen unterdrückt war. In Analogie zu diesem Befund induzierte Pam3CysSK4 zwar einen neuronalen Schaden im Hippokampus von Wildtyptieren, jedoch nicht von TLR2-defizienten Tieren. Die durch Pam3CysSK4 vermittelte Neurotoxizität erforderte die Aktivierung von Mikroglia.

Zusammengefasst zeigen unsere Arbeiten, dass sowohl intakte GBS als auch ein aus GBS freigesetzter Faktor *in vitro* neuronalen Zelltod induzieren, der durch TLR2 und MyD88 in Mikroglia vermittelt wird. Darüber hinaus wurde mit Hilfe eines hochspezifischen synthetischen Liganden für TLR2 *in vivo* nachgewiesen, dass allein die Aktivierung des TLR2 im ZNS zu Inflammation und neuronaler Schädigung führt. Diese Daten belegen eine kausale Beziehung zwischen einer Infektion mit Gram-positiven Bakterien, der Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS und nachfolgender Neurodegeneration.

**Eigene Publikationen:**

**(P3)** Lehnardt S, Henneke P, Lien E, Kasper DL, Volpe JJ, Bechmann I, Nitsch R, Weber JR, Golenbock DT, Vartanian T. A Mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia.

J Immunol 2006 Jul 1;177(1): 583-592.

**(P4)** Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Lehnardt S, Weber JR. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage.

J Immunol 2007 May 15;178(10): 6476-6481.



#### **2.1.4 Die Rolle des TLR2 bei der durch Pathogene induzierten Schädigung der Mikroglia**

Aktivierte Mikroglia sezernieren proinflammatorische und zytotoxische Moleküle wie Interleukine (IL), TNF- $\alpha$  und NO (Banati et al., 1993). Im Einklang mit diesen Daten wiesen unsere zuvor beschriebenen Arbeiten nach, dass die Aktivierung des TLR2 in Mikroglia durch Gram-positive Bakterien wie GBS zur Sekretion von neurotoxischem NO führt (P3). Es ist einerseits leicht vorstellbar, dass eine insuffiziente Aktivierung der Mikroglia - und damit eine schwach ausgeprägte Entzündung im ZNS - das Wachstum und die weitere Infiltration von ins ZNS eingedrungenen Mikroben begünstigt, was wiederum zu einer stärkeren Schädigung des zerebralen Gewebes führen kann. Auf der anderen Seite ist vor dem Hintergrund unserer Arbeiten anzunehmen, dass eine anhaltende oder übermäßige Produktion zelltoxischer Moleküle durch Mikroglia an sich neuronale Schädigung potenzieren kann. Somit stellt sich die Frage, welche Strategien einem Organismus zur Verfügung stehen, um eine potentielle Gewebeschädigung durch das eigene Immunsystem zu minimieren. Eine solche Strategie ist z.B. für B- und T-Lymphozyten bekannt, die durch ihre eigene Aktivierung in die Apoptose getrieben werden. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „aktivierungsinduzierter Zelltod“ (AICD) bezeichnet und ermöglicht dem Organismus, inflammatorische Prozesse zu limitieren und damit zu kontrollieren (Crispe, 1999; Donjerkovic and Scott, 2000). Ähnliche Mechanismen wurden in der Vergangenheit sowohl für Makrophagen als auch für Mikroglia diskutiert (Adler et al., 1995; Liu et al., 2001).

Aliprantis und Kollegen demonstrierten Ende der 90er Jahre, dass die Aktivierung von Rezeptoren der angeborenen Immunität nicht nur zur Induktion proinflammatorischer Gene führt, sondern dass diese Moleküle auch Eigenschaften eines Zelltod vermittelnden Rezeptors aufweisen können: Beispielsweise werden Monozyten durch bakterielles Lipoprotein in Abhängigkeit von TLR2 und MyD88 gleichzeitig aktiviert und in die Apoptose getrieben (Aliprantis et al., 1999; Aliprantis et al., 2000). Ähnliche Eigenschaften wurden auch für TLR4 in Makrophagen beschrieben (Haase et al., 2003). Mitglieder der Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptoren (TNFR), auch als zelluläre Todesrezeptoren bekannt, aktivieren ebenfalls sowohl proinflammatorische als auch mit dem Zelltod assoziierte Signalwege. Todesrezeptoren induzieren Apoptose über Adaptermoleküle, die den Membranrezeptor mit der intrazellulären Maschinerie des Zelltodes verbinden (Ashkenazi and Dixit, 1998). Fas-associated death domain Protein (FADD) ist ein solcher zentraler Adapter, der durch eine C-terminale Todesdomäne (DD) an den Rezeptorkomplex gebunden wird und durch einen N-terminalen Todeseffektorabschnitt an eine Pro-Domäne des Caspase-8 Proteins gekoppelt ist (Baker and Reddy, 1998). Caspasen wiederum sind zytoplasmatische Cysteinproteasen, die apoptotische Signale initiieren und weiterleiten (Thornberry and

Lazebnik, 1998). Sie werden zunächst als Zymogene synthetisiert und durch limitierte Proteolyse in das reife Enzym umgewandelt. Die Oligomerisierung der Caspase-8 am Rezeptorkomplex wird durch FADD vermittelt und führt zur Reifung des Enzyms (Martin et al., 1998; Muzio et al., 1998). Im anschließenden Teil der Signalkaskade werden weitere Effektorcaspasen mittels proteolytischer Spaltung durch die reife Caspase-8 aktiviert, und das apoptotische Programm wird vollzogen. Mit der Identifizierung der TLR als Todesrezeptoren wurde eine molekulare Verbindung zwischen pathogenen Bestandteilen, Mechanismen der Wirtsabwehr und der Apoptose etabliert.

Während unserer Studien an der durch GBS induzierten neuronalen Schädigung (P3) fiel auf, dass GBS nicht nur auf Neurone einen toxischen Effekt ausüben, sondern zeitlich verzögert auch auf Mikroglia selbst. Weitere Versuche zeigten, dass GBS in Mikroglia Apoptose induzieren (P5). Dieser Effekt war nicht auf den Zellwandbestandteil LTA zurückzuführen, obwohl dieses Molekül die Mikroglia aktiviert. Auch das transmembrane Glykoprotein FasLigand, eine wichtige Komponente sowohl für die Apoptose im Kontext des AICD in Lymphozyten (Krueger et al., 2003) als auch grundsätzlich für die Apoptose in Mikroglia (Spanaus et al., 1998; Lee et al., 2000), spielte bei dem durch GBS induzierten Zelltod der Mikroglia keine wesentliche Rolle. Das von aktivierten Mikroglia sezernierte NO ist zum einen für den durch GBS und durch Pneumokokken induzierten Zelltod in peripheren Makrophagen verantwortlich (Marriott et al., 2004; Ulett et al., 2005), zum anderen weist es neurotoxische Eigenschaften im Rahmen der durch GBS vermittelten neuronalen Apoptose auf (P3). Um zu klären, ob während der Aktivierung von Mikroglia freigesetzte lösliche Moleküle wie NO eine Rolle bei der durch GBS vermittelten mikroglialen Apoptose spielen, nutzten wir sowohl Transwell-Systeme, die einen freien Molekülaustausch zwischen zwei Zellkulturkammern ermöglichen, als auch den iNOS-Inhibitor Aminoguanidin. Es zeigte sich, dass die Freisetzung löslicher Moleküle aus Mikroglia keinen Einfluss auf das mikrogliale Überleben nach Inkubation mit GBS hat. Im nächsten Schritt wurden Mikroglia aus TLR2- und MyD88-defizienten Mäusen mit GBS behandelt, und es zeigte sich, dass diese Zellen gänzlich vor der durch GBS induzierten Toxizität geschützt sind.

Der durch GBS induzierte Zelltod in Makrophagen wird über das terminale Effektormolekül Caspase-3 vermittelt (Ulett et al., 2005). Überraschenderweise ergaben unsere Versuche an Mikroglia, dass die Aktivierung der Caspase-3 keine Rolle bei der durch GBS induzierten Apoptose spielt. Im Gegensatz hierzu ist die durch GBS induzierte Aktivierung der Caspase-8 erforderlich, die wiederum die Transkriptionsfaktorfamilie Ets benötigt.

Zusammengefasst induzieren GBS nicht nur durch Mikroglia vermittelten Zelltod von Neuronen, sondern bewirken auch den Tod der Mikroglia selbst. Die zur Apoptose führende

Signalkaskade erfordert TLR2, MyD88 und Caspase-8. Damit wurde in unseren Arbeiten TLR2 als ein Todesrezeptor in Zellen der residenten Immunabwehr im ZNS etabliert.

**Eigene Publikation:**

**(P5)** Lehnardt S, Wennkamp J, Freyer D, Liedtke C, Krueger C, Nitsch R, Bechmann I, Weber JR, Henneke P. TLR2 and caspase-8 are essential for group B streptococcus-induced apoptosis in microglia.

J Immunol 2007 Nov 1;179(9): 6134-61 43.

## **2.2 Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS durch wirtseigene Bestandteile**

Immunreaktionen und inflammatorische Prozesse können auch in Abwesenheit von Pathogenen auftreten. Diese Vorgänge umfassen sowohl die inflammatorische Antwort auf eine Gewebeschädigung als auch die durch Lymphozyten vermittelte Reaktionen gegen Auto-Antigene im Rahmen von Autoimmunerkrankungen. In letzter Zeit häufen sich die Hinweise darauf, dass TLR nicht nur eine Schlüsselfunktion bei der Immunregulation hinsichtlich mikrobieller Liganden einnehmen, sondern auch an inflammatorischen Reaktionen auf wirtseigene Bestandteile beteiligt sind. So aktivieren nekrotische Zellen den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in Fibroblasten, Makrophagen und DC, und zwar in Abhängigkeit von TLR2. Desweiteren induzieren nekrotische Zellen die Reifung von DC, was wiederum zur Aktivierung von T-Zellen führt (Beg, 2002). Heat shock-Proteine (HSP), die aus nekrotischen Zellen freigesetzt werden, bewirken ebenfalls eine Reifung von DC. Wirtseigene Moleküle wie Fibrinogen,  $\beta$ -Defensin 2 und Bestandteile der extrazellulären Matrix wurden kürzlich als endogene Liganden für TLR4 in DC und Makrophagen identifiziert. Verschiedene HSP werden sowohl von TLR2 als auch von TLR4 erkannt. Desweiteren wurde mRNA als endogener Ligand für TLR3 identifiziert (Beg, 2002; Tsan and Gao, 2004).

Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass Rezeptoren des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei Erkrankungen des ZNS spielen, und zwar unabhängig davon, ob eine klassische Infektion vorliegt oder nicht. So scheinen TLR2, TLR4 und CD14 in die Phagozytose des zerebralen  $\beta$ -Amyloid in Tiermodellen für Morbus Alzheimer involviert zu sein (Fassbender et al., 2004; Chen et al., 2006; Tahara et al., 2006). TLR9 und MyD88 wurden als essentielle Modulatoren autoimmuner Prozesse im Rahmen der experimentellen autoimmunen Enzephalitis, einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, beschrieben (Prinz et al., 2006). Im Mausmodell der ALS korreliert eine Induktion des TLR2 und proinflammatorischer Zytokine eng mit dem Schweregrad der Erkrankung (Nguyen et al., 2004). Obwohl in all diesen Modellen zerebraler Erkrankungen Rezeptoren der angeborenen Immunität wie TLR oder CD14 eine funktionale Rolle im Hinblick auf die Pathologie der jeweiligen Erkrankung zu spielen scheinen, wurden die Liganden, die an diese Rezeptoren im ZNS binden bzw. diese aktivieren, in den jeweiligen Arbeiten nicht identifiziert.

### **2.2.1 Die Rolle des TLR2 bei der zerebralen Schädigung im Kontext des Schlaganfalls**

Obwohl der Schlaganfall eine der Hauptursachen einer Langzeitbehinderung und der Gesamtmortalität unserer Gesellschaft darstellt, stehen nur begrenzte Therapieoptionen zur

Verfügung. Bei der zerebralen Ischämie - einer häufigen Form des Schlaganfalls - kommt es durch eine akute Reduktion des Blutflusses im Gehirn zu ausgeprägten Gewebeschäden. Die Pathogenese des Schlaganfalls schließt sowohl inflammatorische als auch infektiöse Prozesse ein. Zum einen führt die zerebrale Ischämie zu einer starken inflammatorischen Reaktion, die durch die Induktion und Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und proteolytischen Enzymen gekennzeichnet ist, die allesamt den Gewebeschaden vergrößern (del Zoppo et al., 2000; Emsley and Tyrrell, 2002). Zum anderen haben frühere Studien belegt, dass chronische Infektionen, insbesondere mit Chlamydien und *Helicobacter pylori*, das Risiko vergrößern, einen Schlaganfall zu erleiden (Lindsberg and Grau, 2003; Paganini-Hill et al., 2003), wobei die genauen Zusammenhänge unklar sind.

Die Expression proinflammatorischer Proteine führt zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirnschranke und zur Infiltration peripherer Makrophagen ins Parenchym des Gehirns. Die ersten inflammatorischen Zellen jedoch, die auf eine Ischämie reagieren, sind die Mikroglia. Diese Zellen werden regelmäßig in aktivierter Form in der geschädigten Hirnregion vorgefunden. Da die von aktivierten Mikroglia sezernierten proinflammatorischen Moleküle neurotoxische Eigenschaften aufweisen, wird vermutet, dass aktivierte Mikroglia grundsätzlich zu der akuten Schädigung des ZNS beitragen, wie sie etwa im Kontext des Schlaganfalls auftritt. Zusätzlich wird diskutiert, ob Mikroglia selbst in späteren Phasen durch freie Radikale aktiviert werden und einen sekundären Zelltod in der Penumbra induzieren, die das ischämische Zentrum umgibt (Dirnagl et al., 1999; Danton and Dietrich, 2003). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Mikroglia durch die reduzierte Sauerstoffzufuhr innerhalb von Minuten aktiviert werden, d.h. schneller reagieren, als ein neuronaler Zelltod nachgewiesen werden kann (Nakajima and Kohsaka, 2004). Diese Daten wiederum deuten darauf hin, dass Mikroglia auch in frühen Phasen der Ischämie eine Rolle bei der Regulation des neuronalen Zelltodes spielen könnten. Die molekularen Mechanismen, die einer solchen mikroglialen Aktivierung bei der zerebralen Ischämie zugrunde liegen, sind aber zum größten Teil unbekannt.

Es wurde mehrfach beschrieben, dass die Expression von TLR2 und TLR4 im Nieren- und Herzgewebe unter ischämischen Bedingungen stark induziert wird. Daher wurde diesen Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der durch die Ischämie vermittelten Gewebeschädigung zugeschrieben (Dybdahl et al., 2002; Shishido et al., 2003). Ausserdem wurde berichtet, dass ein Polymorphismus des für TLR4 kodierenden Gens mit dem ischämischen Schlaganfall assoziiert ist (Lin et al., 2005).

Wir untersuchten die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der akuten Schädigung des ZNS durch zerebrale Ischämie im experimentellen Modell der middle cerebral artery occlusion (MCAO) (P6) und fanden zunächst, dass die Expression der TLR2 mRNA im ZNS

als Antwort auf die fokale zerebrale Ischämie stark induziert wird. Daraufhin wurde sowohl in TLR2-defizienten als auch in Wildtypmäusen eine fokale zerebrale Ischämie induziert, und es zeigte sich, dass die aus der Ischämie resultierenden Infarktgrösse bei TLR2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtypen um 30% verringert war. Etwa 1/4 der Wildtypmäuse starb während der ersten 72 Stunden nach MCAO, wohingegen alle TLR2-defizienten Tiere diesen Zeitraum überlebten.

Zuvor wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass vor allem die durch Granulozyten ausgelöste Inflammation zu der Gewebeschädigung im Kontext der zerebralen Ischämie beiträgt (Emerich et al., 2002). Es war ausserdem berichtet worden, dass TLR2 eine wichtige Rolle bei der Modulation der granulozytären Funktion spielt (Sabroe et al., 2005). Vor diesem Hintergrund wurden in unserer Arbeit die rekrutierten Granulozyten in den mit MCAO behandelten Hirnen der TLR2-defizienten und der Wildtypmäuse quantifiziert. Die Zahl der Granulozyten in den beiden Stämmen unterschied sich nicht. Somit konnten die ungleichen Infarktvolumina in beiden Mausstämmen nicht auf eine unterschiedliche Rekrutierung dieser Zellen ins Parenchym zurückgeführt werden. Die immunhistochemische Auswertung der mit einer MCAO behandelten Hirne ergab, dass TLR2 ausschließlich in aktivierten Mikroglia der durch die Ischämie geschädigten Hemisphäre exprimiert wird.

Zusammengefasst zeigt unsere Arbeit, dass TLR2 die zerebrale Schädigung bei fokaler zerebraler Ischämie potenziert. Die in diesem Kontext an TLR2 bindenden Moleküle konnten in dieser Arbeit jedoch nicht identifiziert werden.

### **Eigene Publikation:**

(P6) Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, Krueger C, Nitsch R, Meisel A, Weber JR. Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol* 2007 Oct;190(1-2): 28-33.

## 2.2.2 Identifizierung des Heat shock Protein 60 als endogener Ligand des TLR4 im ZNS

Heat shock proteine (HSP) sind im Laufe der Evolution hoch konservierte intrazelluläre Proteine, die sowohl von Pro- als auch von Eukaryonten exprimiert werden. Da HSP eine Schlüsselrolle bei der korrekten Faltung neu synthetisierter Proteine und bei dem Zusammenfügen molekularer Untereinheiten spielen, werden HSP auch als „Chaperone“ bezeichnet. Die Expression erfolgt sowohl konstitutiv als auch induziert: Zellulärer Stress, sei er durch Hitze, Strahlung, chemische Agentien oder Entzündung verursacht, führt zu einer verstärkten Expression dieser Moleküle. Sie üben zytoprotektive Funktionen aus, indem sie die Aggregation denaturierter Proteine verhindern und entweder deren erneute Faltung oder deren proteolytische Degradation induzieren (Hartl, 1996; Fink, 1999; Bukau et al., 2000). HSP werden von gestressten und sterbenden Zellen in den Extrazellulärraum freigesetzt und weisen in dieser Form immunmodulierende Eigenschaften auf (Srivastava, 2002). Gegen HSP gerichtete Immunreaktionen im Rahmen gewebespezifischer Autoimmunerkrankungen sind von pathogenetischer Bedeutung. Beispiele hierfür sind die rheumatoide Arthritis, der Diabetes mellitus und die Atherosklerose (Feige and Cohen, 1991; Xu et al., 2000).

Auch im engeren Kontext der angeborenen Immunität spielen HSP offenbar eine wichtige Rolle: Sie induzieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine und aktivieren APC (Kol et al., 2000; Srivastava, 2002). Verschiedene Untersuchungen geben näheren Einblick in die hier involvierten Mechanismen: HSP60, HSP70 und GP96 führen über die Aktivierung von TLR2 und TLR4 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und induzieren die Reifung von DC (Ohashi et al., 2000; Vabulas et al., 2001; Asea et al., 2002).

Die Isolierung von ZNS Zellen aus dem Gehirn der Maus kann in gewisser Hinsicht als ein schweres zerebrales Trauma angesehen werden. Während unserer Präparationen gemischter ZNS Zellen beobachteten wir kontinuierlich, dass die resultierenden Zellkulturen aus  $lps^d$  Mäusen 60% mehr Zellen enthielten und sich während der Kulturzeit als weniger vulnerabel erwiesen als diejenigen, die aus Wildtypmäusen gewonnen wurden. Die auf diese Beobachtung hin durchgeführten Analysen ergaben, dass die  $lps^d$  Kulturen im Vergleich zum Wildtypen 40% mehr Neurone und axonale Strukturen aufwiesen (P7). Dabei offenbarten die Gehirne der mutierten Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren weder makroskopische noch mikroskopische Differenzen. Wie oben ausgeführt, ist die durch TLR4 vermittelte Signalkaskade bei den  $lps^d$  Mäusen unterbrochen, und der hochspezifische Ligand für TLR4 ist LPS. Da ein defekter TLR4 die Ausbeute vitaler Neurone in der Abwesenheit einer offensichtlichen Infektion mit Gram-negativen Bakterien quantitativ verbesserte, postulierten wir, dass ein endogener Ligand an diesen Rezeptor binden muss. Dieser Ligand würde aus im Rahmen der Zellisolierung geschädigten ZNS Zellen freigesetzt werden, an TLR4 binden und

ähnlich wie in unseren Vorarbeiten (P1, P2) über dessen Aktivierung zu weiterer neuronaler Zellschädigung oder Zelltod führen. Da Ohashi und Kollegen bereits im Jahr 2001 HSP60 als endogenen Liganden für TLR4 in peritonealen Makrophagen identifiziert und dessen proinflammatorische Potenz beschrieben hatten, untersuchten wir die Rolle von HSP60 bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS (P7). Versuche mit rekombinantem HSP60 zeigten zunächst, dass dieses Protein im ZNS einzig an Mikroglia bindet und in Anwesenheit dieser Zellen zu neuronaler Apoptose führt. Versuche mit aufgereinigten Neuronenkulturen belegten, dass diese Neurotoxizität nicht zellautonom vermittelt wird, sondern von TLR4 und MyD88 in Mikroglia abhängig ist. Wir zeigten dann, dass endogenes HSP60 aus nekrotischen und apoptotischen ZNS Zellen freigesetzt wird und neuronalen Schaden und Zelluntergang induziert. Wie schon in unseren Vorarbeiten identifizierten wir auch in diesem Kontext NO als einen für die Neurotoxizität verantwortlichen Mediator, der nach Aktivierung der über TLR4 ausgelösten Signalkaskade aus Mikroglia sezerniert wird. Obwohl in unseren initialen Studien ein hochaufgereinigtes HSP60 verwendet wurde, musste bei der Untersuchung endogener TLR Liganden, insbesondere im Kontext von TLR4, immer die Möglichkeit einer Kontamination des Kandidatenproteins mit LPS oder Lipoproteinen berücksichtigt werden. In der Literatur besteht im Hinblick auf die Arbeit mit verschiedenen endogenen TLR-Liganden eine intensive Diskussion über den Einfluss potentieller Kontaminationen auf durch TLR vermittelte zelluläre Effekte (Tsan and Gao, 2004). Zudem hatten wir in Vorarbeiten die durch LPS induzierte neurotoxische Rolle des TLR4 beschrieben (P1, P2). Wir führten eine Reihe von Kontrollversuchen durch, um zu klären, ob die in diesem Kapitel beschriebenen neurotoxischen Effekte spezifisch auf HSP60 zurückzuführen waren. Sowohl der Einsatz von Polymyxin B, einem LPS-Antagonisten, als auch verschiedene Methoden der Proteindegeneration durch Trypsin, Proteinase K oder Hitze belegten, dass die in Zellkulturen beobachteten toxischen Effekte auf ein Protein, nicht jedoch auf LPS zurückzuführen waren. Die Transfektion von HEK293 Zellen mit zwei verschiedenen gegen HSP60 gerichteten siRNAs bewirkte, dass die Toxizität des Lysates nekrotischer HEK293 Zellen gegenüber Neuronen signifikant abnahm. Die in einem weiteren Ansatz initiierte Überexpression von HSP60 in HEK293 Zellen bewirkte das Gegenteil: Die Sterberate der Neurone nahm in Anwesenheit von Mikroglia nach Inkubation mit lysierten, HSP60-transfizierten Zellen signifikant zu. Damit wurde die Spezifität der HSP60-bedingten Neurotoxizität sowohl in einem *loss-of-function* als auch in einem *gain-of-function* Experiment bewiesen.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit HSP60 als endogener Ligand des TLR4 im ZNS identifiziert. Dieses von sterbenden Zellen des ZNS freigesetzte Molekül aktiviert über TLR4



mikrogliale Zellen, die wiederum durch die Sekretion von NO weiteren Zelltod von Neuronen induzieren.

**Eigene Publikation:**

**(P7)** Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, Nitsch R, Weber JR. A vicious cycle involving release of Heat shock protein 60 from injured cells and activation of TLR4 mediates neurodegeneration in the CNS.

J Neuroscience, *in press*.

### 3. Diskussion

Wir untersuchten zunächst die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Schädigung der weißen Substanz im Gehirn und identifizierten TLR4 als einen verantwortlichen Faktor für den Zelltod von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten, wie man ihn insbesondere im Kontext der humanen PVL beobachtet. Generell kann eine Schädigung von Oligodendrozyten auf verschiedene molekulare Mechanismen zurückgeführt werden (Barres et al., 1992; Barres et al., 1993). *In vitro* Studien lassen aber vermuten, dass insbesondere oxidativer Stress und proinflammatorische Zytokine hierbei eine kritische Rolle spielen (Boje and Arora, 1992; Merrill et al., 1993; Vartanian et al., 1995). Durch Bindung von LPS aktivierte Mikroglia sezernieren sowohl reaktive Sauerstoffderivate als auch verschiedene Zytokine, auf die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten empfindlich reagieren (Woodrooffe et al., 1991; Benveniste and Benos, 1995). Vorläuferzellen der Oligodendrozyten weisen eine sehr viel ausgeprägtere Vulnerabilität gegenüber den genannten Molekülen auf als reife Zellen (Oka et al., 1993; Baerwald and Popko, 1998). In Zusammenschau mit unseren Arbeiten kann postuliert werden, dass die Aktivierung der angeborenen Immunsystems des sich entwickelnden Gehirns zum Untergang von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten in der weißen Substanz führt. Dabei bleiben die Astrozyten ausgespart. Diese Konstellation findet man typischerweise bei der humanen PVL des Frühgeborenen. Es bleibt zu untersuchen, welche Mediatoren, die im Rahmen der Immunantwort freigesetzt werden, letztlich den oligodendroglialen Zelltod induzieren. Es ist sehr wahrscheinlich, dass NO zumindest einen der gesuchten Faktoren darstellt: Zum einen ist seit längerem bekannt, dass NO aus aktivierten Mikroglia sezerniert wird und die mikrogliale Toxizität gegenüber Oligodendrozyten der Ratte vermittelt (Merrill et al., 1993). Zum anderen haben wir in unseren Arbeiten gezeigt, dass Mikroglia, die durch TLR2 oder TLR4 aktiviert werden, NO freisetzen und dass dieses wiederum maßgeblich zur Schädigung von Neuronen beiträgt. Es ist anzunehmen, dass der Mechanismus der oligodendroglialen Schädigung im Kontext der Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS ähnlich, wenn nicht identisch ist.

Da sowohl virale als auch bakterielle Infektionen grundsätzlich zu neuronaler Schädigung führen können, werden sie immer wieder als ätiologische Faktoren bei Erkrankungen des ZNS diskutiert. Die Tatsache, dass intermittierend sowohl RNA und DNA verschiedener Pathogene als auch gegen virale Bestandteile gerichtete Antikörper im Serum und Gewebe des ZNS von Patienten mit neurologischen Erkrankungen nachgewiesen werden, unterstützt die Hypothese, dass Infektionen eine wichtige Rolle bei solchen zerebralen Erkrankungen spielen. Verschiedene Befunde stehen mit dieser Hypothese im Einklang. Beispielsweise gelten Viren als potentielle kausale Faktoren insbesondere bei der Pathogenese von Erkrankungen der Motorneurone: ALS-ähnliche Symptome werden bei viral bedingten

Erkrankungen wie AIDS gehäuft beobachtet. In diesem Fall können die auftretenden motorischen Symptome wirksam mit Virostatika behandelt werden (MacGowan et al., 2001; Moulignier et al., 2001). Die Beobachtung, dass eine Infektion mit HIV zu Enzephalitis und Demenz führen kann, unterstreicht die pathogenetische Bedeutung der durch Viren induzierten Neurotoxizität. Obwohl die Ätiologie der *Rasmussen* Enzephalitis, einer progressiven Entzündung des zerebralen Kortex, weiterhin als unbekannt gilt, werden sowohl bakterielle als auch virale Infektionen zunehmend als Ursache der Erkrankung diskutiert (O'Meara and Ouvrier, 1996). Hingegen ist die neurotoxische Eigenschaft von Pneumokokken ausreichend belegt, und die durch diese Mikroben induzierte experimentelle Meningitis der Maus führt regelmässig zu einer neuronalen Schädigung im Hippokampus und zu kognitiven Defiziten (Wellmer et al., 2000).

Unsere Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems im ZNS zu neuronaler Schädigung beitragen kann und dass die durch TLR2 und TLR4 induzierte neuronale Schädigung durch Mikroglia vermittelt wird. In unseren Arbeiten exprimierten Neurone weder TLR2 noch TLR4, und hoch aufgereinigte Neuronenkulturen waren gegenüber einer Inkubation mit den jeweiligen Liganden für TLR2 und TLR4 unempfindlich. Der Gedanke, dass TLR eine funktionale Rolle bei neurologischen Erkrankungen spielen könnten, führt natürlich zwingend zu der Frage, ob und welche TLR in Neuronen exprimiert werden. In jüngster Zeit wurden Arbeiten veröffentlicht, die sowohl die Expression als auch die Funktion von TLR in Neuronen analysieren. Hier zeigte sich unter anderem, dass TLR3 und TLR8 in Neuronen exprimiert werden und eine funktionale Bedeutung beim axonalen Wachstum und bei der neuronalen Apoptose haben (Ma et al., 2006; Cameron et al., 2007). Obwohl in letzter Zeit verschiedene Anstrengungen unternommen wurden, die Expression von TLR in Neuronen abschliessend zu charakterisieren, ist dieser Aspekt längst nicht eindeutig und erschöpfend geklärt. So wurde TLR2 von einer anderen Arbeitsgruppe im Mausmodell der durch Herpes simplex Virus I induzierten Enzephalitis in Neuronen nachgewiesen (Kurt-Jones et al., 2004). Desweiteren wurde die Induktion von TLR2 und TLR4 in Neuronen nach zerebraler Ischämie und Reperfusion beschrieben (Tang et al., 2007). Vor dem Hintergrund der - auf den ersten Blick - unterschiedlichen Ergebnisse in diesen und in unseren Arbeiten ist anzunehmen, dass die TLR im ZNS je nach experimenteller oder pathologischer Situation im Hinblick auf Zelltypen und Ausmaß unterschiedlich exprimiert werden und unterschiedliche Funktionen ausüben können. Sowohl allgemeine Stressfaktoren wie Exzitotoxizität und mitochondriale Dysfunktion als auch Effektormoleküle wie Caspasen und NO spielen eine Rolle beim Zelltod spezifischer Neuronenpopulationen. Diese Mechanismen sind für die neuronale Schädigung in Tiermodellen der ALS, des Morbus Parkinson, des Morbus Alzheimer und der

Huntingtonschen Erkrankung gut belegt (Mattson et al., 1999; Albers and Beal, 2000; Julien, 2001b). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass allein die aufgezählten Faktoren die Spezifität der Neurodegeneration bestimmen oder die spezifisch in bestimmten Regionen des ZNS auftretenden entzündlichen Prozess auslösen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Neurone sich in immunologischer Hinsicht komplexer verhalten, als noch vor einiger Zeit angenommen: Unter anderem exprimieren Neurone wie alle kernhaltigen Zellen MHC I Moleküle (Neumann et al., 1995; Neumann et al., 1997; Corriveau et al., 1998), die aber im ZNS zunächst anscheinend andere Funktionen einnehmen als in der Peripherie, da sie unmittelbar Einfluss auf neuronale Funktionen nehmen (Corriveau et al., 1998). Es ist anzunehmen, dass diese Moleküle auch in die Präsentation von Antigenen im Rahmen der zerebralen Immunantwort involviert sind. Insbesondere im Kontext der vorliegenden Arbeit stellt sich die Frage, wie die Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS zu selektiver Neurodegeneration beitragen kann. Es scheint, dass verschiedene Populationen von Neuronen unterschiedliche, aber spezifische, Molekülkomplexe exprimieren und dass diese Moleküle für spezifische biochemische Eigenschaften verantwortlich sind. Diese sogenannten „molekularen Fingerabdrücke“ könnten zum einen die spezifischen Funktionen verschiedener neuronaler Populationen determinieren, zum anderen könnten sie für deren unterschiedlich ausgeprägte Vulnerabilität verantwortlich sein, indem sie als spezifische Antigene für die jeweiligen, wahrscheinlich krankheitsspezifischen, Antikörper fungieren. Als ein Beispiel für einen solchen molekularen Fingerabdruck kann das Protein DARP-32 gelten, das von Neuronen der Basalganglien exprimiert wird. Die dieses Protein exprimierenden Zellen werden selektiv bei der Huntingtonschen Erkrankung zerstört (Musunuru and Darnell, 2001). Wir haben sowohl für TLR2 als auch für TLR4 eine im Hinblick auf das Überleben von Neuronen detrimental Rolle beschrieben. Dieser toxische Effekt erfordert die vermittelnde Rolle der Mikroglia, die im aktivierten Zustand inflammatorische und zelltoxische Moleküle freisetzt. Die Beobachtung, dass die Aktivierung von TLR2 auch die Mikroglia selbst in den Zelltod treibt und dabei auf dem direkten Weg zelluläre Todeseffektormoleküle wie Caspasen aktiviert, könnte die Grundlage einer Diskussion bilden, die klären soll, auf welche Weise sich das ZNS vor überschießenden und damit unkontrollierten Entzündungsprozessen schützen kann. Unsere Daten zu diesem Aspekt beruhen bisher auf Beobachtungen *in vitro*, und es bleibt abzuwarten, ob die beschriebenen Effekte auch *in vivo* nachvollzogen werden können.

In Anbetracht unserer und der von anderen Gruppen publizierten Arbeiten, bei denen zunächst die schädigende Wirkung des angeborenen Immunsystems bei Erkrankungen des ZNS im Fokus steht, darf nicht unerwähnt bleiben, dass das angeborene Immunsystem im ZNS natürlich auch oder gar überwiegend protektive Wirkung entfaltet, die über rein

antiinfektiöse Mechanismen hinausgeht. Zum Beispiel belegt die Arbeit von Glezer und Kollegen, dass die Aktivierung von TLR4 in Mikroglia zur Remyelinisierung führt und weitere Reparaturprozesse im ZNS aktiviert (Glezer et al., 2006). Es wurde auch gezeigt, dass die Aktivierung von TLR4 im ZNS zu einer effizienteren Beseitigung von  $\beta$ -Amyloid führen und damit im Kontext des Morbus Alzheimer als neuroprotektive Eigenschaft der angeborenen Immunität beurteilt werden kann (Kakimura et al., 2002). Desweiteren beschleunigen aktivierte Mikroglia das axonale Auswachsen geschädigter Neurone in Schädigungsmodellen des Rückenmarks (Prewitt et al., 1997). In Anbetracht der Arbeiten, die die Rolle der TLR bei verschiedenen zerebralen Schädigungsmustern unterschiedlich beurteilen, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass Rezeptoren des angeborenen Immunsystems im ZNS unterschiedliche Funktionen und damit unterschiedliche pathophysiologische Bedeutungen haben können, je nachdem, welche spezifische Pathologie vorherrscht.

Es mehren sich Hinweise darauf, dass Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie die TLR nicht nur in die Aktivierung der angeborenen Immunität des ZNS als Antwort auf eindringende Pathogene involviert sind, sondern auch die Reaktion des Wirtsorganismus auf eine nicht-infektiöse Schädigung des Gewebes vermitteln. Dieser Aspekt erscheint insofern zunächst als irritierend, als dass traditionelle TLR Liganden wie die PAMP infektiöser Organismen unter physiologischen Bedingungen nicht vorhanden sind. Im Zusammenhang der durch TLR vermittelten Schädigung des ZNS stellt sich jedoch immer drängender die Frage, ob dieser schädigende Effekt überhaupt die Präsenz pathogener Moleküle erfordert. Verschiedene Arbeiten weisen daraufhin, dass Rezeptoren des angeborenen Immunsystems eine Rolle bei Erkrankungen des ZNS spielen und zwar unabhängig davon, ob eine klassische Infektion vorliegt oder nicht. Wir haben gezeigt, dass TLR2, der vor allem als Rezeptor für Bestandteile Gram-positiver Bakterien bekannt ist, maßgeblich zum Ausmaß der zerebralen Schädigung im Rahmen des Schlaganfalls bei der Maus beiträgt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für TLR4 beschrieben (Caso et al., 2007). Babcock und Kollegen beschrieben eine Rolle für TLR2 im Kontext der axonalen Schädigung bei Läsionen des entorhinalen Kortex der Maus (Babcock et al., 2006), und Tanga und Kollegen beobachteten einen Einfluss von TLR4 auf die verhaltensassoziierte Hypersensitivität in einem Mausmodell der schmerzhaften Neuropathie. In dieser Arbeit war das Ausmaß der normalerweise beim Wildtypen durch eine Transsektion lumbaler Nerven induzierten mechanischen Allodynie und thermalen Hypersensitivität in TLR4-defizienten Mäusen reduziert. Dieser Effekt war von einer verminderten Aktivierung der Mikroglia und einer unterdrückten proinflammatorischen zellulären Antwort im lumbalen Rückenmark begleitet (Tanga et al., 2004; Tanga et al., 2005). Wie zuvor bereits ausgeführt, spielen Rezeptoren der angeborenen Immunität bei der

zellulären Beseitigung des zerebralen  $\beta$ -Amyloid im Mausmodell des Morbus Alzheimer, bei der Induktion proinflammatorischer Zytokine im Rahmen der ALS und bei autoimmunen Prozessen im Kontext der experimentellen autoimmunen Enzephalitis eine kritische Rolle (Fassbender et al., 2004; Nguyen et al., 2004; Chen et al., 2006; Prinz et al., 2006). Obwohl bisher keiner der endogenen TLR Liganden identifiziert wurde, der für die in den zuvor genannten Krankheitsmodellen im ZNS beobachteten Effekte verantwortlich wäre, ist anzunehmen, dass diese Moleküle - ähnlich den mikrobiellen Liganden - verschiedene Signalkaskaden aktivieren und damit mehrere Gruppen von Effektorgenen induzieren können. Sowohl „gestresste“ als auch sublethal geschädigte oder sterbende Zellen setzen Signalmoleküle in ihre Umgebung frei, was wiederum eine Aktivierung der residenten angeborenen Immunabwehr bewirkt. Die Freisetzung dieser intrazellulären Moleküle in den Extrazellularraum kann als Warnung an den Organismus verstanden werden, die eine Störung der normalen Zellfunktion anzeigt. Diejenigen Moleküle, die die angeborene Immunität in der Peripherie aktivieren, sind im Laufe der Evolution hoch konservierte Proteine oder Nukleotide, die im extrazellulären Raum des normalen Gewebes offensichtlich als „fremde Moleküle“ erkannt werden (Basu et al., 2000; Sauter et al., 2000; Schnurr et al., 2000; Termeer et al., 2000; Somersan et al., 2001). Unsere Daten belegen, dass solche endogenen „fremden Moleküle“ auch im ZNS existieren und über die Aktivierung der angeborenen Immunität zu neuronaler Schädigung führen können. Diese Beobachtungen stützen das sogenannte „Danger Modell“ für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, das erstmalig von Polly Matzinger formuliert wurde. In diesem Modell können DC von endogenen, d.h. wirtseigenen Molekülen, auf ähnliche Weise wie von Pathogenen aktiviert werden (Matzinger, 2002). Dieses Modell postuliert, dass sich PRR - wie z.B. die TLR - zunächst während der Evolution herausgebildet haben, um mit einer Schädigung des Gewebes einhergehende Signale zu erkennen. Erst in zweiter Linie detektierten dieselben Rezeptoren mikrobielle Moleküle. Eine grundsätzlich andere Möglichkeit besteht darin, dass TLR auch eine Rolle bei Entwicklungsvorgängen beim Menschen spielen könnten, zumal das Äquivalent *toll* in phylogenetisch niederen Lebewesen wie der *Drosophila* die Ausrichtung der dorso-ventralen Körperachse während der Embryonalphase reguliert (Anderson et al., 1985). Tatsächlich gibt es erste Hinweise auf eine solche Funktion im Hinblick auf das sich entwickelnde ZNS: Für TLR8 wurde kürzlich eine regulierende Funktion im Hinblick auf das axonale Wachstum während der zerebralen Entwicklung beschrieben (Ma et al., 2006). Obwohl während der Entwicklung des ZNS ein großer Teil der Zellen im Rahmen apoptotischer Prozesse vernichtet wird, scheint die angeborene Immunität hier nicht aktiviert zu werden (Sastry and Rao, 2000). Dieses Phänomen könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass das residente angeborene Immunsystem nicht vor der Perinatalperiode ausgebildet

ist und damit eine inflammatorische Reaktion bis zu diesem Zeitpunkt nicht (in vollem Ausmaß) erfolgen kann. Alternativ ist auch denkbar, dass Zellen, die durch genetische oder umweltbedingte Faktoren geschädigt und letztendlich in die Apoptose getrieben werden (z.B. bei der Huntingtonschen Erkrankung)(Przedborski and Jackson-Lewis, 1998; Mattson, 2000), Moleküle freisetzen, die während der normalen Entwicklungsstufen zu keinem Zeitpunkt in den Extrazellulärraum gelangen.

Die Identifizierung endogener Liganden der angeborenen Immunität im ZNS ist also deshalb von besonderer Bedeutung, weil diese Moleküle den residenten Teil des Immunsystems auf ähnliche Weise aktivieren können wie mikrobielle Komponenten. Unsere Arbeiten zeigen, dass eine solche Aktivierung zu neuronaler Schädigung führen kann. Daraus folgt, dass endogene Liganden für Rezeptoren der angeborenen Immunität, die aus geschädigten Zellen des ZNS freigesetzt werden, zu einer Schädigung weiterer Nervenzellen bei verschiedenen Formen entzündlicher bzw. neurodegenerativer Erkrankungen führen könnten. Dieser neuronale Schaden wäre in diesem Fall unabhängig vom primären Auslöser der Erkrankung. Führt man diesen Gedanken weiter, dann könnte die Aktivierung der angeborenen Immunität im ZNS zur Progression prinzipiell aller Erkrankungen beitragen, bei denen Neurone zugrunde gehen, und zwar unabhängig davon, ob die Erkrankung initial von infektiösen oder nicht-infektiösen Mechanismen verursacht wurde. Dadurch würde sich ein Teufelskreis ergeben, der die mikrogliale Aktivierung durch endogene Liganden, die aus sterbenden Zellen des ZNS freigesetzt werden, und die weitere neuronale Schädigung durch die aktivierte Mikroglia verbindet. Therapeutische Ansätze, die die TLR-vermittelte Signalkaskade blockieren und damit die Aktivierung der Mikroglia abschwächen, könnten daher in Zukunft ein generelles Konzept zur Eindämmung des neuronalen Schadens bei Erkrankungen des ZNS darstellen.

#### **4. Zusammenfassung**

Eine Entzündung im ZNS dient zunächst der Abwehr eindringender Mikroorganismen, dem Schutz vor Neoplasmen und der Beseitigung zellulären Abfalls. Entzündliche Prozesse weisen jedoch auch eine schädigende Wirkung auf Neurone und die weiße Substanz auf, so dass sie eine potenzierende Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des ZNS spielen könnten. Da zum einen Oligodendrozyten und Neurone besonders empfindlich auf die im Rahmen der Entzündungsvorgänge freigesetzten Moleküle reagieren, zum anderen die Regenerationskapazität des ZNS stark eingeschränkt ist, können die Folgen einer Entzündung im Gehirn verheerend sein. Bei nahezu allen zerebralen Erkrankungen werden aktivierte Mikroglia vorgefunden, und es ist unklar, ob die Aktivierung dieser Zellen vor der Schädigung des zerebralen Parenchyms erfolgt oder als ein reaktives, sekundäres Phänomen anzusehen ist. Mikroglia repräsentieren das angeborene Immunsystem im ZNS und detektieren Pathogene u.a. mit Hilfe der Toll-like Rezeptoren (TLR). Diese Rezeptoren binden konservierte Bestandteile von Pathogenen und induzieren über eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade die Sekretion proinflammatorischer Moleküle.

Zunächst wurde die Rolle der Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei der Schädigung von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass LPS, ein Bestandteil Gram-negativer Bakterien, TLR4 auf Mikroglia aktiviert, was wiederum zur Degeneration von Oligodendrozyten führt. Die in diesem Kontext beobachteten zellulären Phänomene werden auch bei der periventrikulären Leukomalazie gefunden, einer häufigen Erkrankung humaner Frühgeborener.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde im Rahmen der neuronalen Schädigung identifiziert. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Bestandteile Gram-negativer Bakterien wandelt eine subklinische hypoxisch-ischämische Schädigung des ZNS in eine manifeste Neurodegeneration um. Dieses Modell wurde auch im Rahmen der bakteriellen Meningitis untersucht, und es zeigte sich, dass Gruppe-B-Streptokokken, die häufigsten Erreger der neonatalen Meningitis, über TLR2 auf Mikroglia zu Neurodegeneration führen. Diese neurotoxischen Effekte werden zum großen Teil durch aus Mikroglia freigesetztes Stickstoffoxid vermittelt. Weitere Studien belegten zudem, dass die alleinige Aktivierung von TLR2 alle typischen Merkmale der bakteriellen Meningitis inklusive Neurodegeneration im Mausmodell zu induzieren vermag, auch wenn keine bakterielle Infektion vorliegt.

Die Aktivierung des TLR2 in Mikroglia durch Gruppe-B-Streptokokken führt nicht nur zu einer neuronalen Schädigung, sondern auch zum zeitlich verzögerten Zelltod der Mikroglia selbst. Dieser Effekt erfordert zudem MyD88 und die Aktivierung der Caspase-8 und kann als ein Kontrollmechanismus interpretiert werden, der das ZNS vor einer überschießenden und damit detrimentalen Entzündung schützt.



Schließlich identifizierten wir HSP60, das aus sterbenden ZNS Zellen freigesetzt wird, als endogenen Liganden für TLR4 in Mikroglia und wiesen nach, dass die Aktivierung dieses Rezeptors - ähnlich wie bei der durch Pathogene verursachten Neurodegeneration - zu neuronaler Schädigung weiterer Neurone führen kann. Dieser neurotoxische Effekt wird wiederum durch aus Mikroglia sezerniertes Stickstoffoxid vermittelt. Damit wurde ein Teufelskreis etabliert, der den neuronalen Zelltod mit einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS und daraus resultierender weiterer Neurodegeneration verbindet.

## 5. Literaturverzeichnis

- Adler B, Adler H, Jungi TW, Peterhans E (1995) Interferon-alpha primes macrophages for lipopolysaccharide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 215:921-927.
- Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L (2003) Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:709-714.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Albers DS, Beal MF (2000) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *J Neural Transm Suppl* 59:133-154.
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* 19:3325-3336.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739.
- Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
- Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42:791-798.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277:15028-15034.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
- Babcock AA, Wrenfeldt M, Holm T, Nielsen HH, Dissing-Olesen L, Toft-Hansen H, Millward JM, Landmann R, Rivest S, Finsen B, Owens T (2006) Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation. *J Neurosci* 26:12826-12837.
- Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC (2001) Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 21:1302-1312.
- Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, Arvin KL, Holtzman DM (2002) Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 22:455-463.
- Baerwald KD, Popko B (1998) Developing and mature oligodendrocytes respond differently to the immune cytokine interferon-gamma. *J Neurosci Res* 52:230-239.
- Baker SJ, Reddy EP (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261-3270.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.
- Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ (1997) Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28:1233-1244.
- Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC (1993) Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118:283-295.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12:1539-1546.
- Baud O, Ville Y, Zupan V, Boithias C, Lacaze-Masmonteil T, Gabilan JC, Frydman R, Dehan M (1998) Are neonatal brain lesions due to intrauterine infection related to mode of delivery? *Br J Obstet Gynaecol* 105:121-124.

- Becher B, Antel JP (1996) Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia* 18:1-10.
- Beg AA (2002) Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 23:509-512.
- Benveniste EN, Benos DJ (1995) TNF-alpha- and IFN-gamma-mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *Faseb J* 9:1577-1584.
- Beutler B (2000) Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 12:20-26.
- Bjorklund A, Lindvall O (2000) Self-repair in the brain. *Nature* 405:892-893, 895.
- Boje KM, Arora PK (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 587:250-256.
- Brosnan CF, Battistini L, Raine CS, Dickson DW, Casadevall A, Lee SC (1994) Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci* 16:152-161.
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101:119-122.
- Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG (2000) Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 47:64-72.
- Cameron JS, Alexopoulou L, Sloane JA, DiBernardo AB, Ma Y, Kosaras B, Flavell R, Strittmatter SM, Volpe J, Sidman R, Vartanian T (2007) Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *J Neurosci* 27:13033-13041.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70:1584-1592.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992a) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736-2741.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992b) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736-2741.
- Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho EH, Lockett S, Dunlop NM, Wang JM (2006) Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. *J Biol Chem* 281:3651-3659.
- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA (2004) Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5:975-979.
- Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ (1998) Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21:505-520.
- Crispe IN (1999) Death and destruction of activated T lymphocytes. *Immunol Res* 19:143-157.
- Dammann O, Leviton A (1998) Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin Pediatr Neurol* 5:190-201.
- Danton GH, Dietrich WD (2003) Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:127-136.
- de Gans J, van de Beek D (2002) Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 347:1549-1556.
- del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ (2000) Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 10:95-112.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.

- Domingo P, Barquet N, Alvarez M, Coll P, Nava J, Garau J (1997) Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. *Clin Infect Dis* 25:1180-1187.
- Donjerkovic D, Scott DW (2000) Activation-induced cell death in B lymphocytes. *Cell Res* 10:179-192.
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A (2002) Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 105:685-690.
- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R (2002) Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186:798-806.
- Eklind S, Mallard C, Leverin AL, Gilland E, Blomgren K, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H (2001) Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury. *Eur J Neurosci* 13:1101-1106.
- Emerich DF, Dean RL, 3rd, Bartus RT (2002) The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol* 173:168-181.
- Emsley HC, Tyrrell PJ (2002) Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1399-1419.
- Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K (2004) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *Faseb J* 18:203-205.
- Feige U, Cohen IR (1991) The 65-kDa heat-shock protein in the pathogenesis, prevention and therapy of autoimmune arthritis and diabetes mellitus in rats and mice. *Springer Semin Immunopathol* 13:99-113.
- Fink AL (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79:425-449.
- Fournier AE, Strittmatter SM (2002) Regenerating nerves follow the road more traveled. *Nat Neurosci* 5:821-822.
- Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL (1992) A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 166:1515-1528.
- Gilles FH, Averill DR, Jr., Kerr CS (1977) Neonatal endotoxin encephalopathy. *Ann Neurol* 2:49-56.
- Glezer I, Lapointe A, Rivest S (2006) Innate immunity triggers oligodendrocyte progenitor reactivity and confines damages to brain injuries. *Faseb J* 20:750-752.
- Goldberg JL, Barres BA (2000) The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci* 23:579-612.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22:219-240.
- Grether JK, Nelson KB (1997) Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *Jama* 278:207-211.
- Haase R, Kirschning CJ, Sing A, Schrottner P, Fukase K, Kusumoto S, Wagner H, Heesemann J, Ruckdeschel K (2003) A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol* 171:4294-4303.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155.
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-579.
- Haynes RL, Baud O, Li J, Kinney HC, Volpe JJ, Folkerth DR (2005) Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol* 15:225-233.
- Heath PT, Balfour G, Weisner AM, Efstratiou A, Lamagni TL, Tighe H, O'Connell LA, Cafferkey M, Verlander NQ, Nicoll A, McCartney AC (2004) Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. *Lancet* 363:292-294.

- Henneke P, Takeuchi O, van Strijp JA, Guttormsen HK, Smith JA, Schromm AB, Espevik TA, Akira S, Nizet V, Kasper DL, Golenbock DT (2001) Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. *J Immunol* 167:7069-7076.
- Hickey WF (1999) Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* 11:125-137.
- Hillhouse EW, Mosley K (1993) Peripheral endotoxin induces hypothalamic immunoreactive interleukin-1 beta in the rat. *Br J Pharmacol* 109:289-290.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-3752.
- Julien JP (2001a) Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104:581-591.
- Julien JP (2001b) Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104:581-591.
- Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G (2001) Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 56:1278-1284.
- Kakimura J, Kitamura Y, Takata K, Umeki M, Suzuki S, Shibagaki K, Taniguchi T, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Smith MA, Perry G, Shimohama S (2002) Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *Faseb J* 16:601-603.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11:115-122.
- Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309-6316.
- Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA (2000) Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 164:13-17.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH (2003) The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193:58-69.
- Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW (2004) Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1315-1320.
- Laflamme N, Soucy G, 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* 79:648-657.
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW (2000) Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106:723-731.
- Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Tauber MG (1996) Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* 98:2632-2639.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Leviton A, Gilles F (1981) Periventricular leukomalacia. *Arch Neurol* 38:398.
- Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Allred EN, Dammann O, Kuban K, Van Marter LJ, Pagano M, Hegyi T, Hiatt M, Sanocka U, Shahrivar F, Abiri M, Disalvo D, Doubilet P, Kairam R, Kazam E, Kirpekar M, Rosenfeld D, Schonfeld S, Share J, Collins M, Genest D, Shen-Schwarz S, et al. (1999) Maternal infection, fetal

- inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. *Developmental Epidemiology Network Investigators. Pediatr Res* 46:566-575.
- Lin YC, Chang YM, Yu JM, Yen JH, Chang JG, Hu CJ (2005) Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 180:305-309.
- Lindsberg PJ, Grau AJ (2003) Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* 34:2518-2532.
- Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS (2001) Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem* 77:182-189.
- Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S (1993) CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 259:689-692.
- Ma Y, Li J, Chiu I, Wang Y, Sloane JA, Lu J, Kosaras B, Sidman RL, Volpe JJ, Vartanian T (2006) Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 175:209-215.
- MacGowan DJ, Scelsa SN, Waldron M (2001) An ALS-like syndrome with new HIV infection and complete response to antiretroviral therapy. *Neurology* 57:1094-1097.
- Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Biondo C, Galbo R, Akira S, Henneke P, Golenbock D, Teti G (2004) Dual role of TLR2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease. *J Immunol* 172:6324-6329.
- Marriott HM, Ali F, Read RC, Mitchell TJ, Whyte MK, Dockrell DH (2004) Nitric oxide levels regulate macrophage commitment to apoptosis or necrosis during pneumococcal infection. *Faseb J* 18:1126-1128.
- Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ (1998) Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* 273:4345-4349.
- Martinez E, Figueroa R, Garry D, Visintainer P, Patel K, Verma U, Sehgal PB, Tejani N (1998) Elevated Amniotic Fluid Interleukin-6 as a Predictor of Neonatal Periventricular Leukomalacia and Intraventricular Hemorrhage. *J Matern Fetal Investig* 8:101-107.
- Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:120-129.
- Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S (1999) Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N Y Acad Sci* 893:154-175.
- Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305.
- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ (2000) The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:219-232.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89-97.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2:253-258.
- Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE (1993) Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151:2132-2141.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Guaza C (2001) LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci* 13:493-502.
- Moses H, Jr., Sriram S (2001) An infectious basis for multiple sclerosis: perspectives on the role of *Chlamydia pneumoniae* and other agents. *BioDrugs* 15:199-206.

- Moullignier A, Moulouguet A, Pialoux G, Rozenbaum W (2001) Reversible ALS-like disorder in HIV infection. *Neurology* 57:995-1001.
- Musunuru K, Darnell RB (2001) Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-binding proteins and signaling proteins in neuronal degeneration. *Annu Rev Neurosci* 24:239-262.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926-2930.
- Nakajima K, Kohsaka S (2004) Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4:65-84.
- Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM (1998) Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 44:665-675.
- Neuhaus FC, Baddiley J (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:686-723.
- Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H (1995) Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269:549-552.
- Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H (1997) Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med* 185:305-316.
- Nguyen MD, D'Aigle T, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2004) Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 24:1340-1349.
- O'Meara M, Ouvrier R (1996) Viral encephalitis in children. *Curr Opin Pediatr* 8:11-15.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558-561.
- Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA, Volpe JJ (1993) Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci* 13:1441-1453.
- Paganini-Hill A, Lozano E, Fischberg G, Perez Barreto M, Rajamani K, Ameriso SF, Heseltine PN, Fisher M (2003) Infection and risk of ischemic stroke: differences among stroke subtypes. *Stroke* 34:452-457.
- Pasinetti GM (1998a) Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *J Neurosci Res* 54:1-6.
- Pasinetti GM (1998b) Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *J Neurosci Res* 54:1-6.
- Perry V (1994) *Macrophages and the Nervous System*: RG Landes Co.
- Perry VH, Newman TA, Cunningham C (2003) The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4:103-112.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ, Houle JD (1997) Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 148:433-443.
- Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutscher I, Wolter K, Piesche M, Schroers R, Weiss E, Kirschning CJ, Rochford CD, Bruck W, Becher B (2006) Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:456-464.
- Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G (1995) Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous

- system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11294-11298.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V (1998) Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord* 13 Suppl 1:35-38.
- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615-625.
- Sabroe I, Dower SK, Whyte MK (2005) The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S421-426.
- Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1-20.
- Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N (2000) Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191:423-434.
- Schnurr M, Then F, Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A (2000) Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 165:4704-4709.
- Schuchat A (1999) Group B streptococcus. *Lancet* 353:51-56.
- Schuchat A, Oxtoby M, Cochi S (1990) Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in Metropolitan Atlanta. *J Infect Dis* 162:672-677.
- Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF (1991) Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 147:1522-1529.
- Selmaj K, Walczak A, Mycko M, Berkowicz T, Kohno T, Raine CS (1998) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with a TNF binding protein (TNFbp) correlates with down-regulation of VCAM-1/VLA-4. *Eur J Immunol* 28:2035-2044.
- Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, Takahashi H, Arimoto T, Maeda K, Yamakawa M, Takeuchi O, Akira S, Takeishi Y, Kubota I (2003) Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 108:2905-2910.
- Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, Basu S, Srivastava P, Bhardwaj N (2001) Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167:4844-4852.
- Spanaus KS, Schlapbach R, Fontana A (1998) TNF-alpha and IFN-gamma render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL. *Eur J Immunol* 28:4398-4408.
- Srivastava P (2002) Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2:185-194.
- Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1:14.
- Tahara K, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K (2006) Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* 129:3006-3019.
- Takeuchi O, Hoshino K, Akira S (2000) Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165:5392-5396.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13798-13803.
- Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA (2004) Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* 45:397-407.



- Tanga FY, Natile-McMenemy N, DeLeo JA (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5856-5861.
- Taupin V, Renno T, Bourbonniere L, Peterson AC, Rodriguez M, Owens T (1997) Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system. *Eur J Immunol* 27:905-913.
- Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC (2000) Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* 165:1863-1870.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Tsan MF, Gao B (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76:514-519.
- Ulett GC, Maclean KH, Nekkhalpu S, Cleveland JL, Adderson EE (2005) Mechanisms of group B streptococcal-induced apoptosis of murine macrophages. *J Immunol* 175:2555-2562.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276:31332-31339.
- Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K (1995) Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1:732-743.
- Volpe JJ (1997) Brain injury in the premature infant--from pathogenesis to prevention. *Brain Dev* 19:519-534.
- Volpe JJ (2001) *Neurology of the newborn*, 4th Edition. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Weber JR, Tuomanen EI (2007) Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol* 184:45-52.
- Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R (2000) Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. *Neurosci Lett* 296:137-140.
- Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, Cuzner ML (1991) Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol* 33:227-236.
- Wu YW, Colford JM, Jr. (2000) Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *Jama* 284:1417-1424.
- Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, Wick G (2000) Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 102:14-20.
- Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, Kim BI (1997a) Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 177:825-830.
- Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, Chi JG (1997b) High expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 177:406-411.
- Yucesan C, Sriram S (2001) Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 14:355-359.

Zupan V, Gonzalez P, Lacaze-Masmonteil T, Boithias C, d'Allest AM, Dehan M, Gabilan JC (1996) Periventricular leukomalacia: risk factors revisited. *Dev Med Child Neurol* 38:1061-1067.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen denjenigen, die mich auf dem Weg zur Habilitation begleitet und unterstützt haben. Insbesondere trifft das auf Frau Prof. Dr. Frauke Zipp, Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch, Herrn Prof. Dr. Jörg Weber, Herrn Prof. Dr. Christoph Hübner und Herrn Prof. Dr. Roland Wauer zu. Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Timothy Vartanian und Herrn Prof. Dr. Joseph Volpe, in deren Arbeitsgruppen ich mich mehr als zwei Jahre intensiv mit der Rolle der angeborenen Immunität im ZNS befassen und als Wissenschaftlerin entwickeln durfte.

Schließlich danke ich Mama und Chia für alles und Eckart wie immer für seine Liebe und Geduld.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde, gleich welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 11.12.2007

Dr. med. Seija Lehnardt