

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Neurochirurgische Klinik, Klinikum rechts der Isar

Die Rolle der toll-like-Rezeptoren beim sekundären Hirnschaden nach
experimentellem Schädel-Hirn-Trauma

Florian Voigt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. F. Ringel
2. Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer

Die Dissertation wurde am 01.08.2012 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 16.10.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

Häufige Abkürzungen

1 Einleitung	5
2 Material und Methoden	10
2.1 Versuchstiere	10
2.2 Experimentelles Modell	11
2.2.1 Anästhesie	11
2.2.2 Durchführung eines standardisierten, kortikalen Hirntraumas	11
2.2.3 Kontrolle der Körpertemperatur	13
2.2.4 Histologische Auswertung des Nekrosevolumens	13
2.2.5 Bestimmung des Hirnwassergehalts und des Hemisphärenvolumens	14
2.2.6 Präkonditionierung mit TLR 9 – Agonist	15
2.3 Tabelle der Versuchsgruppen	16
2.4 Statistik	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Nekrosevolumen	18
3.1.1 Nekrosewachstum der TLR2/4 knockout Mäuse	18
3.1.2 Nekrosewachstum der TLR9 knockout Mäuse	19
3.1.3 Nekrosewachstum nach Toleranzinduktion durch TLR9 Agonisten	20
3.2 Hirnödem	22
3.2.1 Hirnödem der TLR 2/4 knockout Mäuse	22
3.2.2 Hirnödem der TLR9 knockout Mäuse	24
3.3 Schwellung des Hirns	25
3.3.1 Hirnschwellung der TLR2/4 knockout Mäuse	26
3.3.2 Hirnschwellung der TLR9 knockout Mäuse	27
3.3.3 Hirnschwellung der mit CpG ODNs konditionierten Mäuse	28
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss der TLRs auf die Pathologie des experimentellen Schädel-Hirn-Traumas	31

4 Diskussion	32
4.1 Experimentelles Modell	32
4.2 TLRs im ZNS	34
4.2.1 Grundlagen	34
4.2.2 Lokalisation, Signalkaskade und Liganden der TLRs	35
4.2.3 Bedeutung der TLRs im ZNS	40
4.2.4 Mögliche Wege der Vermittlung neurotoxischer Wirkung durch TLRs	43
4.2.5 Mechanismen zur Induktion von Endotoxintoleranz durch TLRs	46
4.3 Einfluss der TLRs auf die sekundäre Hirnschädigung nach experimentellem SHT	48
4.3.1 Hirnödem	49
4.3.2 Nekrosevolumen	52
4.3.3 Schlussbetrachtung	53
5 Zusammenfassung	54
Literaturverzeichnis	56

Häufige Abkürzungen

TLR	toll-like-Rezeptor
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
CpG ODN	Cytosin – Phospat – Guanin Olygodesoxinukleotide
KO	knockout
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem
ICP	intrakranieller Druck
PAMP	pathogen associated molecular patterns
AP-1	activator Protein 1
NF κ B	nuclear factor kappa B
IRF	interferon regulatory factor
IL	Interleukin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
SD	Standardabweichung
MW	Mittelwert
fp	fluid percussion
cci	controlled cortical impact
LPS	Lipopolysaccharid

1 Einleitung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist eines der größten ökonomischen und gesundheitlichen Probleme der gesamten Welt (Ghajar 2000). In westlichen Ländern stellt es für Erwachsene unter 40 Jahren die Hauptursache für Tod und Behinderung dar und gewinnt mit steigender Motorisierung der Schwellenländer auch dort rasch an Bedeutung. Das niedrige Alter der Patienten und die hohe Zahl an Langzeittherapiebedürftigen machen die traumatische Verletzung des Hirns zu einem der drei Hauptfaktoren der unfallverursachten Gesundheitskosten (Polinder et al. 2005). In Europa wird die jährliche Zahl der behandlungsbedürftigen Hirntraumata auf 235 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Tagliaferri et al. 2006).

Die häufigste Ursache von SHTs sind Unfälle im Straßenverkehr. Diese Zahl konnte in den modernen Industrienationen durch Präventionsmaßnahmen wie Gurtpflicht und Sicherheitstechnik deutlich gesenkt werden. In unserer alternden Gesellschaft resultieren Schädeltraumata jedoch immer öfter aus Stürzen von Menschen mit eingeschränkter Beweglichkeit. Die Folge ist ein stetiger Anstieg des durchschnittlichen Patientenalters. Weitere nennenswerte Ursachen sind Gewaltdelikte und Verletzungen im Sport. Schussverletzungen, wie sie in den USA häufig sind, spielen in Europa kaum eine Rolle.

Will man den neuronalen Schaden gezielt therapeutisch beeinflussen ist das Verständnis der Pathophysiologie von großer Bedeutung. So ist es sinnvoll die Schädigung des Hirns in zwei getrennten Phasen zu betrachten. Im Moment des Unfalls kommt es zu einer mechanischen Zerstörung verschiedenster Strukturen des zentralen Nervensystems. Dieser sogenannte primäre Schaden ist nur durch Prävention zu beeinflussen und somit einer Therapie nicht zugänglich. Deshalb konzentrieren sich die therapeutischen Maßnahmen auf die zweite Phase, das sogenannte sekundäre Nekrosewachstum. Hierbei kommt es vor allem in den ersten Stunden und Tagen nach einer traumatischen Hirnschädigung zu einer Ausweitung der ursprünglichen Verletzung. Die enorme Bedeutung dieses Phänomens lässt sich auch aus unseren Versuchsreihen erschliessen, in denen das Nekrosevolumen nach 24 Stunden auf 150 bis 160 Prozent des Primärschadens ansteigt. Die Mechanismen, die potentiell zur Entstehung des sekundären Schadens beitragen sind ausgesprochen vielfältig. Die Ausschüttung von Neurotransmittern führt zu Exzytotoxizität. Auch die Produktion freier Radikale, die Störung der Calcium-Homeostase und die Funktionsstörung der mitochondrialen Energiegewinnung

leiten den Tod von Zellen des ZNS ein. Um dies zu verhindern muss zu jedem Zeitpunkt eine Hypoxie oder Hypotension des Patienten vermieden werden, was auch in Studien zu einem signifikant besseren Outcome führt (Rudehill et al. 2002). Eine gefürchtete Komplikation des Schädel-Hirn-Traumas ist der Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP), der der Perfusion des Gehirns entgegenwirkt und über diesen Effekt zum sekundären Nekrosewachstum beiträgt. Zur Senkung des ICP kann beispielsweise Mannitol verabreicht werden, das einen osmotischen Gradienten erzeugt, der eine verstärkte Rückresorption von Flüssigkeit nach intravasal über die Blut-Hirn-Schranke hinweg bedingt (Polderman et al. 2003) und gleichzeitig den zerebralen Blutfluss verbessert (Muizelaar et al. 1983). Einen zusätzlichen Beitrag zum sekundären Nekrosewachstum liefert die Aktivierung des Immunsystems, die Gegenstand unserer Untersuchungen ist und laut Graham et al. vor allem bei der Kontusionsverletzung große Bedeutung hat (Graham et al. 2002). Nach Hirnverletzungen kommt es zur raschen Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten (Amat et al. 1996) deren Maximum erst nach einigen Tagen erreicht ist. Aufgrund der Geschwindigkeit dieses Prozesses liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei hauptsächlich um eine Reaktion des angeborenen Immunsystems handelt. Möglicherweise wird eben diese Immunantwort über Toll-like Rezeptoren (TLR) vermittelt. Sie sind Sensoren des angeborenen Immunsystems, die am Anfang der immunologischen Signalkaskade stehen und dadurch potentiell ein hocheffektives Ziel zur Suppression der Immunantwort, und somit dem sekundären Nekrosewachstum nach Hirnverletzungen, darstellen.

TLRs sind Transmembranproteine, die der Wahrnehmung von sogenannten pathogen associated molecular patterns (PAMPs) dienen (Kawai and Akira 2007a). Hashimoto und Kollegen beschrieben erstmalig 1988 die Beteiligung von toll Rezeptoren an der Immunabwehr von *Drosophila* Fliegen (Hashimoto et al. 1988). In Säugetieren wurde später ein homologes Protein entdeckt (Medzhitov et al. 1997), welches als toll-like Rezeptor bezeichnet wurde. Bis heute sind 13 verschiedene TLRs identifiziert, von denen 11 im menschlichen Genom nachgewiesen wurden (Takeda and Akira 2007). Im ZNS werden diese Proteine auf einem breiten Spektrum von Zellen exprimiert. So gelang der Nachweis auf Zellen der Mikroglia (Jack et al. 2005), auf Astrozyten und Oligodendrozyten (Bsibsi et al. 2002), auf Neuronen (Mishra et al. 2006) und Endothelzellen (Gibson, III et al. 2008). Jeder TLR hat ein für ihn spezifisches Repertoire an Liganden. Diese Spezifität beruht auf der Bildung von Homo-, oder Heterodimeren mit anderen TLRs und gewährleistet so eine

adäquate Immunreaktion auf eine Vielzahl unterschiedlicher Signale (Kawai and Akira 2007a). Interessanterweise binden diese Rezeptoren, wie es für einen Bestandteil des Immunsystems typisch wäre, nicht nur exogene Moleküle sondern auch eine Reihe von körpereigenen Proteinen. TLR 2 und 4 erkennen Membranlipide von gram-positiven Bakterien, Mykoplasmen und Spirochäten (Aliprantis et al. 1999; Aliprantis et al. 2000; Hirschfeld et al. 1999; Lien et al. 1999) aber auch Moleküle von zerstörten, körpereigenen Zellen wie Hitzeschockproteine, Fibronectin, Hyaluronsäure, Heparansulfate oder Fibrinogen (Miyake 2007). Ähnliches gilt für TLR9, der sowohl virale oder bakterielle Einzelstrang-DNA oder -RNA (Takeda et al. 2003) als auch körpereigene DNA und RNA bindet (Wagner 2006).

Nachdem ein spezifisches PAMP gebunden wurde, leiten die TLRs das Signal nach intrazellulär, wo dann über eine Reihe von Adaptermolekülen eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Das wichtigste dieser Adapterproteine stellt myeloid differentiation factor 88 (MyD88) dar, weshalb eine grobe Einteilung der Signalverarbeitung in einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Weg vorgenommen werden kann (Kawai and Akira 2007a). Je nach Kombination von TLR, Adaptermolekül und Signalweg werden am Ende der Signalkaskade bestimmte Transkriptionsfaktoren aktiviert. Dazu gehören activator protein 1 (AP-1), nuclear factor kappa B (NF κ B), und interferon regulatory factor 3 (IRF3). Diese führen wiederum zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) oder Typ I Interferonen, die dann die Entzündungsreaktion vermitteln (Akira and Takeda 2004).

Taupin et al. untersuchten in einem fluid percussion Traumamodell die Veränderung der Spiegel von IL-1, IL-6 und TNF α innerhalb des traumatisierten Gehirns. Während alle zuvor genannten Zytokine in Sham-operierte Ratten nur in sehr geringem Maß nachweisbar waren, stiegen sie bereits wenige Stunden nach Verletzung des Gehirns signifikant an (Taupin et al. 1993). In vitro konnte weiterhin eine neurodegenerative Wirkung von bestimmten Interleukinen gezeigt werden. Gibt man Ratten nach fluid percussion Trauma einen rekombinanten IL-1 Rezeptor Antagonisten, lässt sich das Nekrosevolumen um ca. 44% reduzieren (Toulmond and Rothwell 1995). Relton et al. applizierten einen IL-1 Rezeptor Antagonisten nach Okklusion der mittleren Hirnarterie und wiesen eine Reduktion des Läsionsvolumens um ca. 50% nach (Relton and Rothwell 1992).

Hinweise für eine Neuroprotektion durch Unterbrechung der Entzündungsreaktion an einer früheren Stelle der Signalverarbeitung, nämlich bereits auf Höhe der Signalwahrnehmung durch toll-like Rezeptoren, lieferten vor allem Studien zur ischämischen Hirnverletzung. Ziegler et al. beschrieben eine Hochregulierung von TLR2, TLR4 und TLR9 auf mRNA-Ebene nach fokaler, zerebraler Ischämie bei Mäusen. Gleichzeitig führte der Knockout von TLR2 oder TLR4 zu einer Reduktion des sekundären, ischämischen Nekrosevolumens gegenüber der Wildtyp Vergleichsgruppe (Ziegler et al. 2007). Eine weitere Arbeit verglich TLR4 Knockout Mäuse mit Wildtyp Mäusen nach globaler Ischämie mit anschließender Reperfusion. Dabei zeigte sich in den Wildtyp Tieren eine vermehrte Proteinexpression von TLR4. In den Knockout Mäusen war eine erniedrigte Aktivität von NFκB mit einer signifikant niedrigeren Expression von IL-6 und TNFα verbunden. Als mögliches Resultat dieser Veränderungen konnte eine reduzierte Apoptoserate in den TLR4 Knockout Mäusen gegenüber den Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden (Hua et al. 2007). Auch TLR2 scheint nach fokaler Ischämie ein neurotoxisches Potential zu vermitteln. Lehnardt und Kollegen beschrieben in Wildtyp Mäusen eine vermehrte mRNA- Expression von TLR2 nach zerebraler Ischämie. Gleichzeitig war das Nekrosevolumen 72 Stunden nach Reperfusion in TLR2 Knockout Mäusen um ca. 30 Prozent gegenüber den Wildtyp Tieren vermindert (Lehnardt et al. 2007). Auch für den dritten in unseren Studien verwendeten Rezeptor, nämlich TLR9, wurde eine Beteiligung an postischämischer Neurodegeneration beschrieben (Stevens et al. 2008).

Weitaus geringer in Zahl und Aussagekraft sind Studien über die Rolle der TLRs nach traumatischer Hirnverletzung. Eine interessante Studie hierzu wurde von Chen et al. durchgeführt. Sie verwendeten ein „weight drop“ Traumamodell und untersuchten die Auswirkung einer posttraumatischen Applikation von Simvastatin, ein Medikament, das zur Therapie erhöhter Blutfette eingesetzt wird. Die Ratten, die mit Simvastatin behandelt wurden wiesen eine verminderte TLR4 Proteinexpression und NFκB Aktivität auf. Folglich waren auch die Konzentrationen an IL-1, IL-6 und TNFα in der Simvastatin-Gruppe erniedrigt. Die Gabe von Simvastatin führte weiterhin zu einer geringeren Ausprägung des posttraumatischen Hirnödems und der neuronalen Apoptoserate (Chen et al. 2009). In einer weiteren Studie, die TLR2/4 Doppelknockout Mäuse verwendete, konnte nach kälteinduziertem Trauma kein neuronaler Überlebensvorteil gegenüber Wildtyp Mäusen demonstriert werden. Der Knockout des Adaptermoleküls MyD88, ein bereits weiter oben angesprochenes, wichtiges Protein für

die Signaltransduktion mehrerer TLRs, erzeugte wiederum eine signifikante Reduktion des sekundären Nekrosewachstums nach Kältetrauma des Gehirns (Koedel et al. 2007).

Somit ist eine wichtige Rolle der TLRs in der Pathophysiologie nach akuter Schädigung des Hirns wahrscheinlich. Eine Rolle, die für die zerebrale Ischämie bereits gut untersucht wurde die aber bei der traumatischen Hirnverletzung noch einige Fragen aufwirft. Und gerade für das Schädel-Hirn-Trauma wäre ein Ansatzpunkt für eine wirksame medikamentöse Therapie nötig. Denn keines der über 20 verschiedenen Medikamente, die in den letzten 25 Jahren in klinischen Phase III Studien untersucht wurden, konnten einen überzeugenden Therapieerfolg in der gesamten Studienpopulation erbringen (Maas et al. 1999; Narayan et al. 2002). Die größten Fortschritte in der Behandlung des SHTs sind auf eine verbesserte Technik zur Überwachung der Patienten und eine individuelle Therapieorganisation zurückzuführen.

Ziel dieser Studie war es deshalb die Bedeutung der TLRs für das sekundäre Nekrosewachstum nach traumatischer Hirnverletzung näher darzustellen. Wir entschieden uns für die toll-like Rezeptoren 2 und 4, da diese Rezeptoren am besten untersucht sind. Sie scheinen eine wichtige Rolle für das sekundäre Nekrosewachstum nach Ischämie zu spielen und werden gleichzeitig von einer Vielzahl von Zellen des ZNS exprimiert. Für den toll-like Rezeptor 9 wurde ausserdem ein interessantes Phänomen beschrieben, das wir näher untersuchen wollten. Hierbei handelt es sich um die sogenannte Präkonditionierung, die zu einer Abschwächung der Signalverarbeitung, ähnlich eines Knockouts des jeweiligen Rezeptors, führt. Wir betrachteten die Auswirkung eines Fehlens der toll-like Rezeptoren 2 und 4 sowie 9 auf das neuronale Überleben und die Entwicklung des Hirnödems anhand des controlled cortical impact Modells. Weiterhin interessierte uns wie die oben genannte Präkonditionierung von TLR9 das sekundäre Nekrosewachstum beeinflusst. Für die TLR2/4 Doppelknockout Mäuse bestimmten wir zusätzlich den zeitlichen Verlauf der Expression einiger wichtiger inflammatorischer Parameter.

2. Material und Methoden

Die Versuche wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilian-Universität München zwischen 2007 und 2009 unter dem damaligen Direktor Prof. Dr. med. Ulrich Pohl in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurochirurgie“ von Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila durchgeführt. Die Untersuchungen waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.1 Versuchstiere

Nach der Durchführung von Vorversuchen zur Standardisierung des Modells wurden die eigentlichen Versuche an ca. 100 C57Bl/6 Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), 50 TLR 2/4 Doppelknockout-Mäusen sowie 10 TLR 9 Knockoutmäusen vorgenommen. Diese Tiere wurden fünf mal zu ihrem genetischen Hintergrund, den C57Bl/6 Mäusen, zurückgekreuzt. Die Versuchstiere waren männlich mit einem Gewicht zwischen 20 und 25 Gramm. Nach Lieferung konnten sich die C57Bl/6 Mäuse mindestens 24h im Tierstall erholen bevor sie für Versuche verwendet wurden.

Die für die Versuche verwendeten Knockoutmäuse wurden in der Tierhaltung des Instituts für Chirurgische Forschung gezüchtet. Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen Nr. 2 mit maximal 5 Mäusen pro Käfig gehalten. In den Räumen der Tierhaltung bestand eine Temperatur von 20-24°C sowie eine Luftfeuchtigkeit von 50-70% mit einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Futter (Sniff® R/M-H, Soest, Deutschland) und Wasser standen jederzeit frei zur Verfügung. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den betreffenden Richtlinien und Bestimmungen der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

2.2 Experimentelles Modell

2.2.1 Anästhesie

Zur raschen Narkoseeinleitung erhielten die Mäuse unter einem Plastikbecher 5% Volumenanteil Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) für etwa 40 Sekunden. Anschließend wurden die Oberkiefer der spontan atmenden Mäuse in einer Metallaufhängung fixiert und ein kontinuierlicher Zufluss von Narkosegas mit einem Volumenanteil von 1,5-2% Isofluran gewährleistet. Das Gasgemisch wurde durch einen Gummischlauch zu einer T-förmigen Plastikmaske, die die fixierte Schnauze der Maus umspannte, geleitet und auf der anderen Seite durch einen zweiten Gummischlauch abgesaugt. Das Narkosegas wurde mit einem Isofluran-Verdampfer (Vapor 19.3, Drägerwerke AG, Lübeck, Deutschland) vaporisiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose verwendeten wir ein Gemisch aus ca. 68-68,5% Lachgas, 30% Sauerstoff und 1,5 bis 2 % Isofluran. Der inspiratorische Sauerstoffgehalt wurde ständig über eine Sauerstoffsonde kontrolliert (Oxydig, Drägerwerke AG, Lübeck). Zur Beschleunigung der Aufwachphase nach Beendigung der OP wurden die Mäuse für kurze Zeit mit 100% Sauerstoff versorgt. Zur Hirnentnahme wurden die Mäuse, wie oben zur Narkoseeinleitung beschrieben, für ca. 1 Minute mit 5% Isofluran anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.2 Durchführung eines standardisierten, kortikalen Hirntraumas

Dixon et al. beschrieben das Modell des „controlled cortical impacts“ an Ratten (Dixon et al. 1991). Dieses Modell, das auch für Traumastudien an Mäusen Anwendung findet, ist in unserer Arbeitsgruppe gut etabliert und wurde bereits mehrfach publiziert (Zweckberger et al. 2003). Deshalb hielten wir uns, unter geringen Abwandlungen, an diesen Versuchsablauf. Einige der nachfolgenden Schritte wurden unter Zuhilfenahme eines Mikroskops (OpMi-1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 16 facher Vergrößerung durchgeführt. Nach oben beschriebener Narkotisierung wurde ein medianer, sagittaler Hautschnitt von Höhe der Augen bis Höhe der Ohren des Tieres angelegt. Die Haut wurde nach lateral geklappt und der Schädelknochen exponiert. Mit einer Hochgeschwindigkeitsfräse wurde mittels einer lateralen, parallel zur Sagittalnaht verlaufenden Bohrlinie und einer dorsalen, parallel zur Coronarnaht verlaufenden Bohrlinie ein rechteckiges Fenster erzeugt. Dieses Knochenfenster

konnte unter Sprengung der Coronarnaht nach medial aufgeklappt werden und erlaubte einen direkten Zugang zur harten Hirnhaut. Nach Drehung des fest fixierten Kopfes um wenige Winkelgrade konnte auf die Hirnhaut ein pneumatischer Bolzen schlüssig aufgesetzt werden. Dieser Bolzen erzeugte nach Auslösung ein genau definiertes Trauma mit einer Eintauchtiefe von 1 mm, einem Durchmesser von 3 mm, einer Geschwindigkeit von 8m/s sowie einer Kontaktzeit von 150ms (siehe Abb.1). Dabei musste um eine gleichbleibende Defektgröße zu gewährleisten darauf geachtet werden, dass der Bolzen vor Auslösung exakt der harten Hirnhaut auflag. Der nach medial aufgeklappte Knochendeckel konnte anschließend wieder auf das offene Fenster gelegt und mit einem Gewebekleber (Vetbond, 3M Animal Care Products, St. Paul, MN, USA) fixiert werden. Anschließend wurde die Haut mit Vicrylfäden der Stärke 5-0 verschlossen.

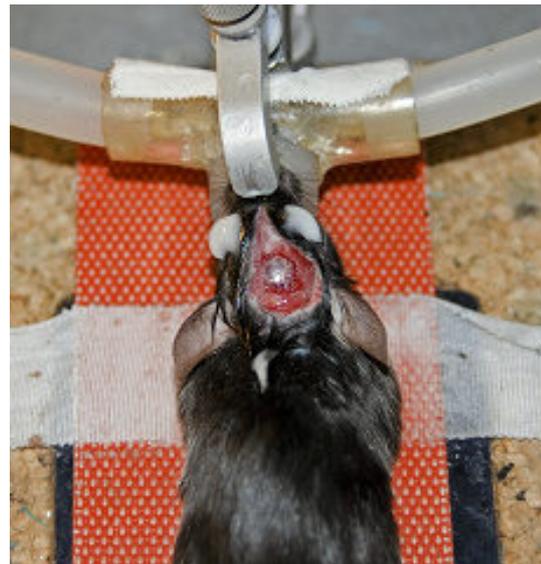
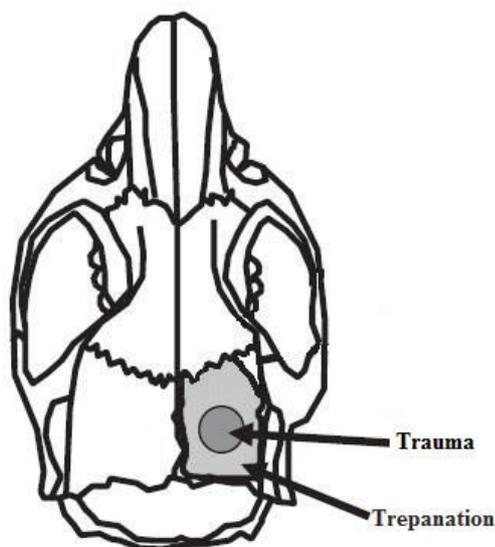


Abb.1: Links: Schematische Darstellung eines Mäuseschädels. Darauf eingezeichnet ist das Knochenfenster, das nach medial geklappt wird um Zugang zur harten Hirnhaut zu erlangen.

Rechts: Operationssitus nach Verschluss des Knochenfensters mit Gewebekleber. Der Hautdefekt wurde anschließend mit Vicrylfäden genäht.

2.2.3 Kontrolle der Körpertemperatur

Um ein Auskühlen zu verhindern wurden die Tiere während der Operationszeit auf eine Heizplatte gelegt (temperature control, FHC, Bowdoinham, ME, USA). Die Regelung der Körpertemperatur erfolgte über eine rektale Temperatursonde und die Heizplatte, die eine konstante Körpertemperatur von $37\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ während der Operation der Tiere gewährleistete. Nach einer kurzen Aufwachphase wurden die Tiere bei Raumtemperatur in ihre Käfige zurückgelegt.

2.2.4 Histologische Auswertung des Nekrosevolumens

Zur Bestimmung des Primärschadens wurden ausgewählte Tiere 15 Minuten nach Trauma durch zervikale Dislokation getötet. Um die Größe des Sekundärschadens zu ermitteln überlebten die Tiere zwischen Trauma und zervikaler Dislokation 24 Stunden. Nach zervikaler Dislokation, wurden die Tiere mit einer Schere dekapitiert und die mediane Hautnaht wieder eröffnet. Der Knochen zwischen den beiden Orbitae wurde ebenfalls mit einer Schere durchtrennt und somit die ventralen Riechhirnanteile vom Schädelknochen getrennt. Anschließend konnte mit einem Spatel der Schädelknochen schrittweise abgetragen und das Gehirn entnommen werden. Das entnommene Organ wurde in eine Schale mit Trockeneis gelegt. Sobald die Hirne vollständig durchgefroren waren, wurden sie in Alufolie verpackt und bei -20°C gelagert. Zur histologischen Auswertung wurden die Hirne in TissueTek® (Sakura Finetek B.V., Zeoterwoude, Niederlande) eingebettet und mit einem Cryotom (HM 560, Microm, Walldorf, Deutschland) weiterverarbeitet. Hierzu wurden von jedem Hirn 14 Schnitte in Abständen von $500\mu\text{m}$ und mit einer Dicke von $10\mu\text{m}$ auf einem Objektträger gesammelt. Der erste Schnitt wurde angefertigt sobald im koronaren Anschnitt Riechhirn und Cortex gleich groß waren, der letzte lag auf Höhe des Kleinhirns und enthielt keine nekrotischen Anteile mehr. Zur besseren Abgrenzbarkeit der traumatischen Nekrosezone von unverändertem Parenchym wurden die Schnitte mit Cresylviolett nach Nissl gefärbt. Mit Hilfe einer auf ein Mikroskop montierten Digitalkamera wurden die Gewebeproben abfotografiert und die Bilder an einen Computer übertragen (siehe Abb. 2).

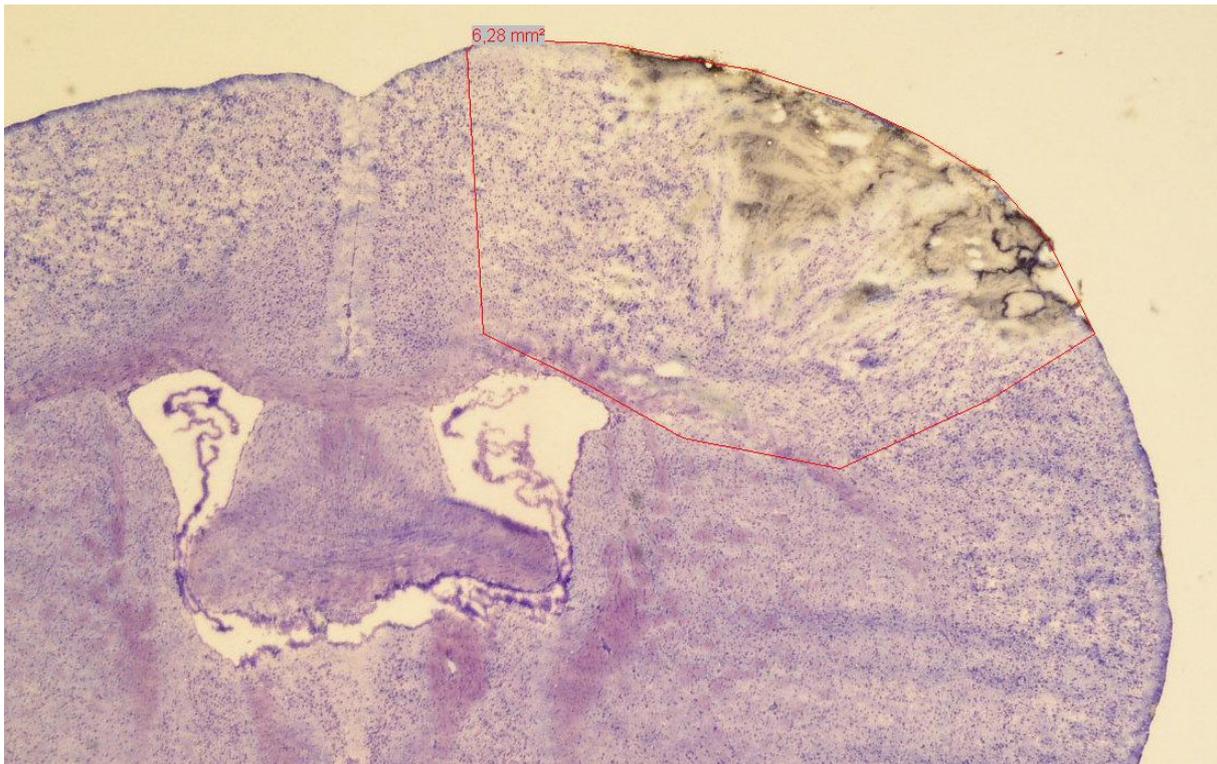


Abb. 2: Koronarschnitt im Bereich der Nekrosezone, die rot umrandet ist. Der Schnitt zeigt die durch den Bolzen verursachte, umschriebene Auflockerung und beginnende Entfärbung der Neurone 15 Minuten nach Trauma. Die dunklen Strukturen im Bereich des Cortex sind Blutauflagerungen.

Ein Bildanalyseprogramm (Olympus DP-SOFT; Olympus, Hamburg, Deutschland) lieferte nach manuellem Markieren der Nekrosezone sowie der beiden gesamten Hemisphären die jeweiligen Flächen in mm^2 für jeden der 14 Schnitte. Durch Multiplikation der Flächen mit dem Abstand zweier Schnitte ($500\mu\text{m}$) konnte aus diesen Daten das Volumen der traumatischen Nekrose und der gesamten Hemisphären ermittelt werden. Für die Errechnung des Nekrosevolumens gilt folgende Formel: $(A_1+A_2+A_3\dots+A_{14})\cdot d$, dabei entspricht A_x der Fläche der Nekrose auf jedem der 14 gesammelten Schnitte, die zu einem Gehirn gehören und d dem Abstand zwischen zwei Schnitten (hier $0,5\text{mm}$).

2.2.5 Bestimmung des Hirnwassergehalts und des Hemisphärenvolumens

Hierfür wurden die Tiere 24 Stunden nach kortikalem Trauma durch zervikale Dislokation getötet und die Hirne, wie für die histologische Auswertung, entnommen. Da wir uns bei der Auswertung nur für die Veränderungen im Bereich des Großhirns interessierten, wurde bei den zu untersuchenden Hirnen die Riech- und Kleinhirnanteile entfernt. Die Großhirnhemisphären wurden in der Mittellinie exakt getrennt und direkt nach Entnahme

einzelnen gewogen (AG 245, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland). Daraus ergab sich das Feuchtgewicht der jeweiligen Hemisphäre. Um den Proben sämtliche Feuchtigkeit zu entziehen wurden sie in einem Wärmeschrank bei 110°C für 24 Stunden getrocknet und anschließend erneut gewogen. Dieser Wert entsprach dem Trockengewicht der einzelnen Großhirnhemisphären.

Anhand des Feucht- und Trockengewichtes konnte der prozentuale Wassergehalt der traumatisierten und nicht-traumatisierten Hemisphäre nach folgender Formel errechnet werden: $\text{Wassergehalt in \%} = (\text{Feuchtgewicht} - \text{Trockengewicht}) / \text{Feuchtgewicht} \times 100$. Um den möglichen Einfluss einiger Störfaktoren, wie zum Beispiel die Verlagerung von Flüssigkeit über die Mittellinie hinweg, auszuschalten errechneten wir auch den Gesamtwassergehalt der Gehirne. Dieser Wert wurde als Gesamtödem bezeichnet und entspricht der Summe aus dem Wassergehalt der traumatisierten und der kontralateralen Hemisphäre eines Gehirns.

Geht man davon aus, dass eine Erhöhung des Wassergehalts direkt auch eine Zunahme des Hemisphärenvolumens bewirkt, so ließe sich durch die Messung des Hemisphärenvolumens eine indirekte Aussage über die Entwicklung des Hirnödems treffen. Wir bezeichneten eine Volumenzunahme einer Hemisphäre als Hirnschwellung. Definiert war die Schwellung als Differenz der Volumina beider zu einem Gehirn gehörigen Hemisphären. Diese Volumina wurden, wie oben beschrieben, histomorphometrisch ermittelt.

2.2.6 Präkonditionierung mit TLR 9 – Agonist

Die Präkonditionierungsversuche mit TLR9-Agonisten wurden an 14 C57/Bl6 Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden 7 Mäusen CpG ODNs, ein TLR9-Agonist, verabreicht. Dabei handelt es sich um synthetische Oligonukleotide, die unmethylierte CpG Dinukleotide in bestimmter Sequenz enthalten (ODN 1826, 5' – tcc atg acg ttc ctg acg tt –3', InvivoGen, San Diego, CA, USA) und selektiv TLR9 aktivieren. CpG Motive sind in bakterieller DNA 20 mal häufiger enthalten als im Erbgut von Säugetieren. Die Vergleichsgruppe erhielt ein Oligonukleotid mit veränderter Sequenz, (ODN 1826 Control, 5'tcc atg agc ttc ctg agc tt –3', InvivoGen, San Diego, CA, USA) das GpC statt CpG Dinukleotide enthält und somit als Negativkontrolle dient. 200 µg Oligonukleotide wurden kurz vor Verwendung in 1,5ml endotoxinfreiem Wasser gelöst. 72 Stunden vor Trauma erhielt jedes Versuchstier eine intraperitoneale Injektion von 150µl der Lösung, dies entspricht also 20µg ODNs pro

Versuchstier. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma wurden die Tiere geopfert und die Gehirne nach oben beschriebenem Schema histomorphometrisch untersucht.

2.3 Tabelle der Versuchsgruppen

Zunächst wurden an ca. 30 Tieren Vorversuche durchgeführt. Deren Ziel war das Erlernen der Operationstechnik, die Verkürzung der Operationsdauer und das Erreichen einer möglichst niedrigen Standardabweichung bei den primären Nekrosevolumina.

Im Anschluss wollten wir den Einfluss der toll-like Rezeptoren auf das sekundäre Nekrosewachstum quantifizieren. Für diese Versuche wurden insgesamt 53 Mäuse, davon 43 C57Bl6 Wildtyp Tiere, 5 TLR9 knockout und 5 TLR2/4 doppelknockout Tiere verwendet.

Zur Ermittlung des Gehirnwassergehaltes operierten wir 13 Wildtyp Mäuse, 6 TLR2/4 doppelknockout und 5 TLR9 knockout Mäuse (siehe Abbildung 3).

Versuchsreihe	Gesamtzahl	Stamm	Untersuchung
1	15	TLR2/4 KO, C57Bl6	Bestimmung des sekundären Nekrosewachstums
2	15	TLR9 KO, C57Bl6	Bestimmung des sekundären Nekrosewachstums
3	23	C57Bl6	Bestimmung des Nekrosewachstums nach Vorbehandlung mit TLR9 Agonist
4	14	TLR2/4 KO, C57Bl6	Quantifizierung des Hirnwassergehalts
5	10	TLR9 KO, C57Bl6	Quantifizierung des Hirnwassergehalts

Abbildung 3: Zusammenfassung der jeweiligen Versuchsreihen mit Zahl der untersuchten Tiere, den dabei verwendeten Stämmen und dem Ziel der Untersuchung.

2.4 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (standard deviation, SD) dargestellt.

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Sigmastat (Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Zum Vergleich zweier Gruppen verwendeten wir, unter Annahme einer Normalverteilung, einen unpaired t-test. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

Um die Auswirkungen des Fehlens oder der Minderaktivierung von toll-like Rezeptoren auf pathologische Prozesse nach experimentellem SHT zu untersuchen, ermittelten wir das Nekrosevolumen, den Hirnwassergehalt sowie die Hirnschwellung zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma.

3.1 Nekrosevolumen

Ziel dieser Untersuchungen war es den Einfluss der toll-like Rezeptoren auf das sekundäre Nekrosewachstum histomorphometrisch sichtbar zu machen. Aus diesem Grund untersuchten wir sowohl an den TLR2/4 und TLR9 knockout Mäusen als auch an den mittels CpG ODNs konditionierten Mäusen das Nekrosevolumen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma. Um Aufschluss über das Wachstum der Nekrose zu erlangen wurden in jeder Versuchsreihe Wildtyp Mäuse traumatisiert, deren Gehirne zum Zeitpunkt 15 Minuten und 24 Stunden nach Trauma ausgewertet wurden. Das Nekrosevolumen der Tiere, die nach 15 Minuten geopfert wurden, definierte den Primärschaden. Im Folgenden ist mit ipsilateraler Hemisphäre immer die traumatisierte Hemisphäre bezeichnet.

3.1.1 Nekrosewachstum der TLR2/4 knockout Mäuse

Das Nekrosevolumen der Wildtyp Tiere stieg bis 24 Stunden nach Trauma auf $33,51 \pm 1,68 \text{ mm}^2$ bzw. $152,20\% \pm 5,0\%$ des Primärschadens, der $22,04 \pm 1,23 \text{ mm}^2$ betrug. Nach der gleichen Zeit ergab sich in der TLR2/4 doppelknockout Gruppe lediglich eine Ausweitung der Nekrose auf $29,65 \pm 1,52 \text{ mm}^2$ bzw. $134,52\% \pm 5,1\%$ des Primärschadens. Dies entspricht einer signifikanten Reduktion des Nekrosewachstums um $33,87\%$ ($p < 0,01$).

Nekrosevolumen in % des Primärschadens 24 Stunden nach Trauma

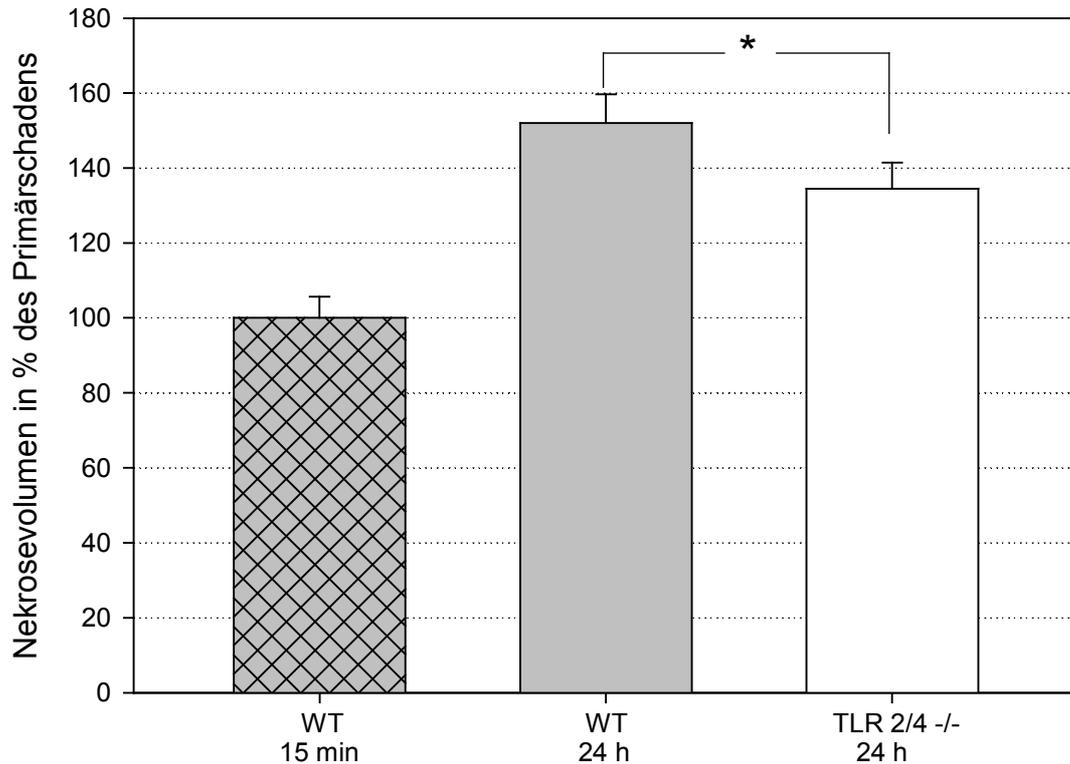


Abbildung 4: Dargestellt ist der $MW \pm SD$ des Nekrosewachstums zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma der Wildtyp Mäuse und TLR2/4 knockout Mäuse in Prozent des Primärschadens, der als Nekrosevolumen zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Trauma definiert wurde ($n=5$). Es ergibt sich eine signifikante Reduktion des Nekrosewachstums um 33,87% bei den TLR2/4 knockout Mäusen (*) ($p < 0,01$).

3.1.2 Nekrosewachstum der TLR9 knockout Mäuse

Wie schon für die Defizienz der TLRs 2 und 4 ließ sich eine Protektion bei fehlendem TLR9 demonstrieren. Das Nekrosevolumen der Wildtyp Mäuse wuchs nach 24 Stunden auf $26,85 \pm 1,38 \text{ mm}^2$ bzw. $160,01\% \pm 5,1\%$ des primär verursachten Schadens, der in dieser Versuchsreihe $16,78 \pm 1,12 \text{ mm}^2$ betrug. Dabei erreichte die Nekrose bei den TLR9 knockout Mäusen lediglich einen Wert von $23,56 \pm 1,37 \text{ mm}^2$ bzw. $140,04\% \pm 5,8\%$ des Primärschadens. Das entspricht 33,28% Reduktion des sekundären Nekrosewachstums in der TLR9 knockout Gruppe, die bei einem p-Wert kleiner als 0,01 signifikant ausfiel.

Nekrosevolumen in % des Primärschadens 24 Stunden nach Trauma

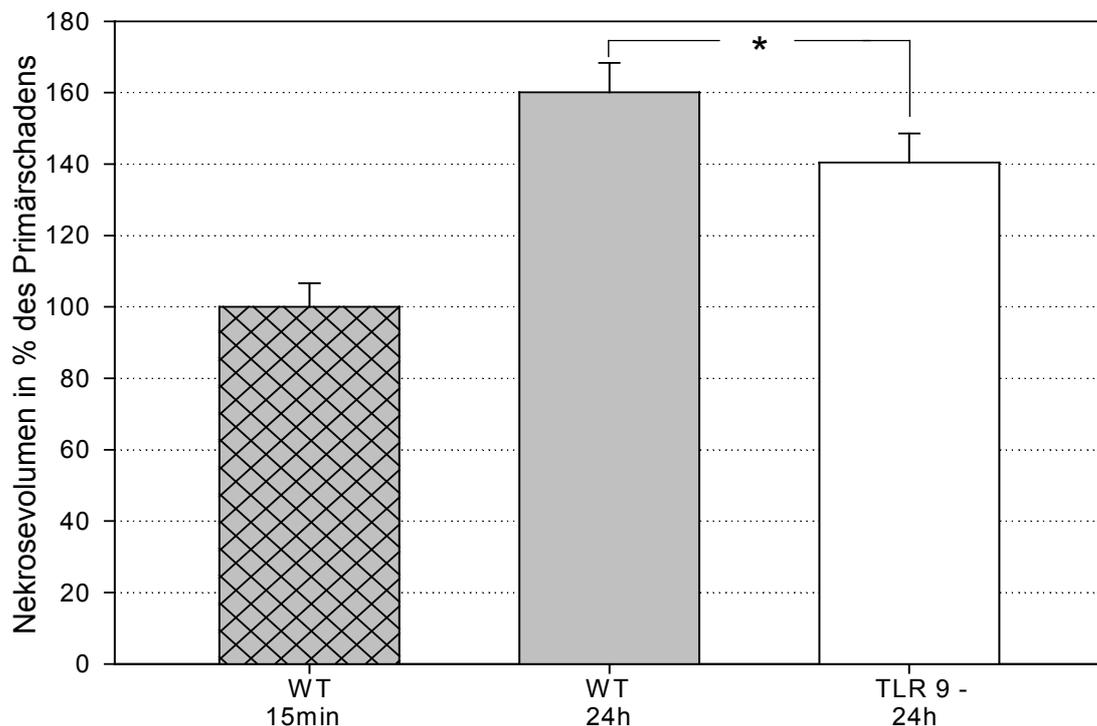


Abbildung 5: Dargestellt ist der MW±SD des Nekrosewachstums zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma der Wildtyp Mäuse und TLR9 knockout Mäuse in Prozent des Primärschadens, der als Nekrosevolumen zum Zeitpunkt 15 Minuten definiert wurde (n=5). Es ergibt sich eine signifikante Reduktion des Nekrosewachstums um 33,28% bei den TLR9 knockout Mäusen (*) ($p < 0,01$).

3.1.3 Nekrosewachstum nach Toleranzinduktion durch TLR9 Agonisten

In einer weiteren Versuchreihe untersuchten wir die Auswirkungen der Applikation von TLR9-stimulierenden CpG ODNs auf pathophysiologische Parameter des Schädel-Hirn-Traumas. Da die Vorbehandlung mit TLR-Agonisten in Studien anderer Arbeitsgruppen an Ischämie-Modellen Hinweise auf eine verminderte Aktivierung von toll-like Rezeptoren nach akuter Hirnverletzung erbrachte, wollten wir dieses Konzept anhand des experimentellen Hirntraumas untersuchen. Dazu wurde den Mäusen 72 Stunden vor Trauma ein TLR9-Agonist oder eine Kontrollsubstanz intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse traumatisiert und die Gehirne 24 Stunden nach Trauma histomorphometrisch ausgewertet.

Bei der Berechnung des Nekrosevolumens zeigte sich ein protektiver Effekt bei den mit CpG ODNs präkonditionierten Tieren gegenüber den Kontrollen. Dieser fiel sogar noch deutlicher aus als bei den beiden knockout Gruppen. Der Primärschaden betrug in dieser Versuchsreihe $21,55 \pm 0,55 \text{ mm}^2$. In der CpG ODN-Gruppe ergab sich ein sekundäres Nekrosewachstum auf $29,44 \pm 1,51 \text{ mm}^2$ bzw. $136,6\% \pm 5,1\%$ des Primärschadens. Die Tiere, die eine Kontrolllösung erhielten, erreichten ein Nekrosevolumen von $34,32 \pm 1,12 \text{ mm}^2$ $159,3\% \pm 3,3\%$ des Ausgangsschadens. Dies entspricht einer Reduktion des sekundären Nekrosewachstums um $38,6\%$. Wie schon für die TLR9 und TLR2/4 knockout Tiere ist diese Reduktion signifikant ($p < 0,0001$).

Nekrosevolumen in % des Primärschadens 24 Stunden nach Trauma

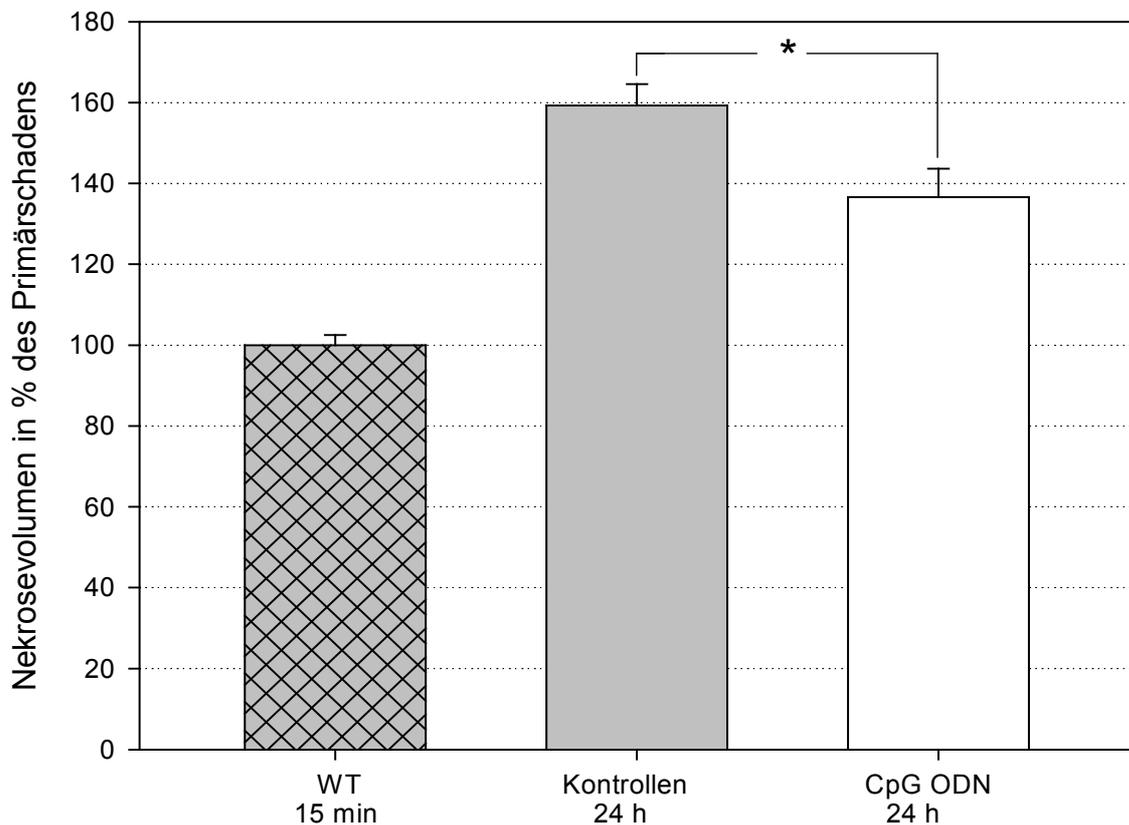


Abbildung 6: Dargestellt ist der $MW \pm SD$ des Nekrosewachstums zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma der Kontrollgruppe und der CpG ODN Gruppe in Prozent des Primärschadens, der als Nekrosevolumen zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Trauma definiert wurde ($n=5$). Die Reduktion des sekundären Nekrosewachstums fiel hier mit $38,6\%$ noch deutlicher aus als in den TLR knockout Versuchsreihen (*) ($p < 0,0001$).

3.2 Hirnödem

3.2.1 Hirnödem der TLR 2/4 knockout Mäuse

Wie schon in der Einleitung beschrieben kann es nach traumatischen Hirnverletzungen zu einem intrakraniellen Ödem kommen. Als Auslöser der Ödembildung sind mehrere Mechanismen denkbar. Beispielsweise die rein mechanische Schädigung von Gefäßen oder an der Blut-Hirn-Schranke beteiligten Zellen. Auch die für Entzündungsreaktionen typische Extravasation von Flüssigkeit könnte einen potentiellen Beitrag zur Entstehung eines Hirnödems nach traumatischer Hirnverletzung leisten. Inwieweit diese entzündlich vermittelte Störung der Blut-Hirn-Schranke durch toll-like-Rezeptoren beeinflusst wird, war Gegenstand unserer folgenden Untersuchungen. Hierzu bestimmten wir gravimetrisch den Hirnwassergehalt nach experimentellem SHT. Beide Hemisphären wurden 24 Stunden nach Trauma getrennt mit der zuvor beschriebenen Feucht-Trocken-Gewicht Methode untersucht. Erwartungsgemäß lag der Wassergehalt der traumatisierten Hemisphären signifikant über dem der nicht traumatisierten Hemisphären. Dies liegt daran, dass sich die Ödemflüssigkeit nicht frei über beide Hemisphären ausbreiten kann. Eine mögliche Verteilung des Wassers von einer Hemisphäre zur anderen ist jedoch prinzipiell über die Mittellinie durchtretende Strukturen, wie zum Beispiel den Balken, möglich.

Eine Aussage über den Einfluss der TLRs auf die Entwicklung des Hirnödems ergibt sich beim Vergleich der entsprechenden Hemisphären der Wildtyp mit den knockout Gruppen. So lag der Wassergehalt der ipsilateralen Hemisphären bei den Wildtyp Tieren mit $80,89\% \pm 1,20\%$ um $0,61\%$ nicht signifikant ($p=0,2837$) über dem der TLR2/4 knockout Tiere mit $80,28\% \pm 0,65\%$. Auch für die kontralateralen Hemisphären ergab sich einen Tag nach Trauma keine signifikante Differenz des Wasseranteils (Wildtyp: $78,54 \pm 0,65\%$ und TLR 2/4 knockout: $78,26 \pm 1,02\%$) ($p > 0,6830$).

Da die Möglichkeit besteht, dass das Trauma leicht zur Mitte verschoben ist oder ein verstärkter Abfluss von Extravasat aus der traumatisierten in die nicht traumatisierte Hemisphäre das Ergebnis beeinflusst, haben wir aus den Daten für die einzelnen Hemisphären das Gesamtödem beider Hemisphären berechnet.

Hirnödem TLR 2/4 KO vs. WT

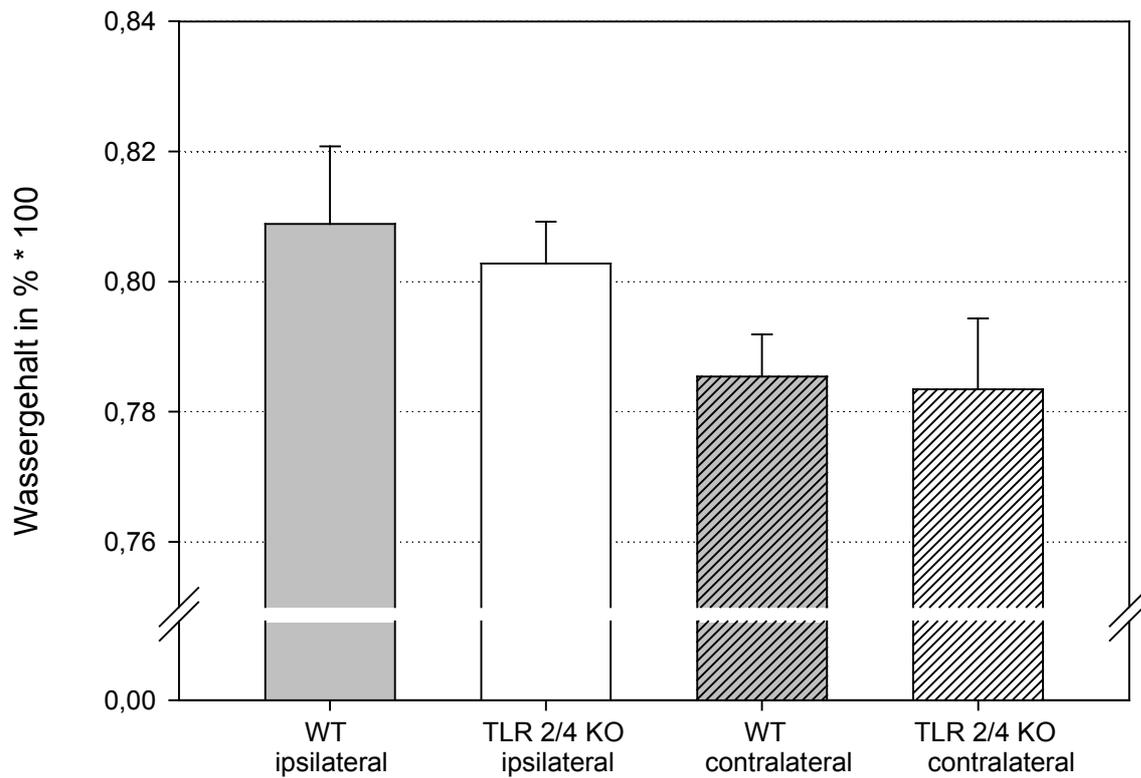


Abbildung 7: MW±SD des Hirnwassergehalts der einzelnen Hemisphären von Wildtyp und TLR2/4 knockout Mäusen 24 Stunden nach Trauma (n=6-8). Die ipsilateralen bzw. traumatisierten Hemisphären wiesen einen signifikant höheren Wassergehalt auf als die jeweiligen kontralateralen, nicht traumatisierten Hemisphären. Der Wassergehalt der ipsilateralen Hemisphären der Wildtyp Gruppe wies bei einem Mittelwert von 80,89%±1,20% keinen signifikanten Unterschied zum Mittelwert der ipsilateralen Hemisphären der TLR 2/4 knockout Gruppe von 80,28%±0,65% auf (p=0,2837). Auch die kontralateralen Hemisphären unterschieden sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (p=0,6830).

Gesamtödem TLR 2/4 KO vs. WT

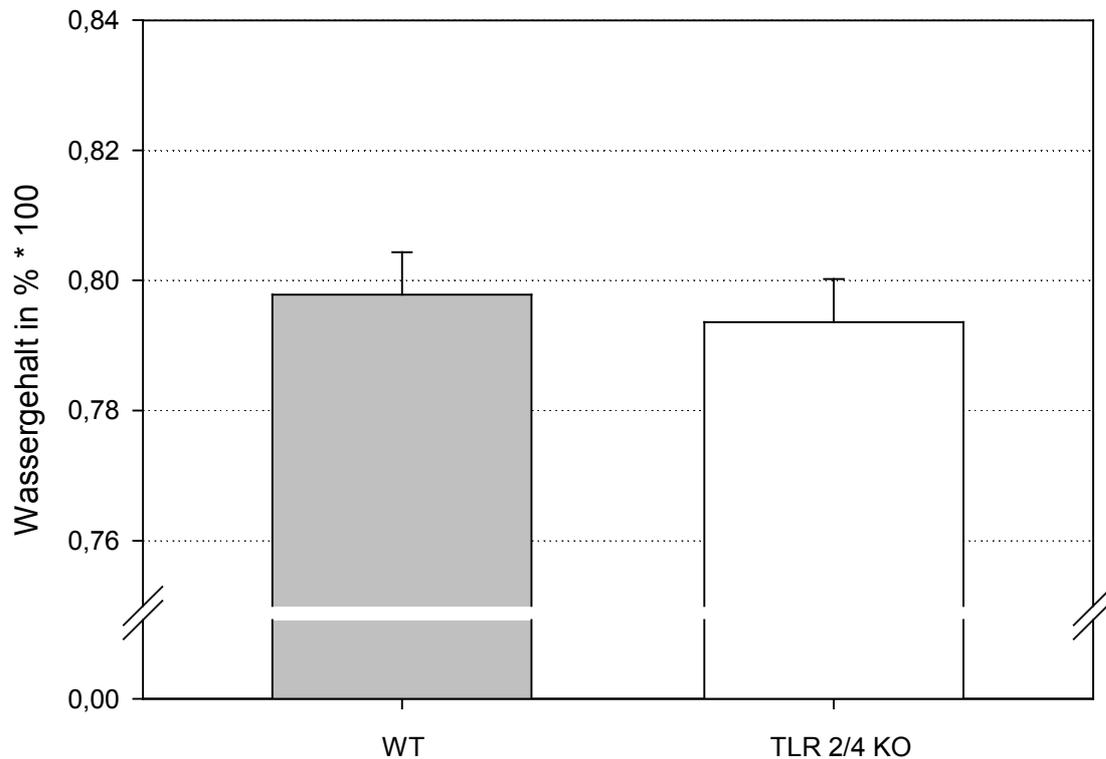


Abbildung 8: Der hier dargestellte $MW \pm SD$ des Gesamtwassergehalts beider Hemisphären wies 24 Stunden nach Trauma keine signifikante Differenz zwischen Wildtyp und TLR 2/4 knockout Gruppe auf ($n=6-8$; $p=0,2609$).

Doch auch für das Gesamtödem ergab sich bei den TLR 2/4 knockout Mäusen keine signifikante Reduktion des Wasseranteils gegenüber der Vergleichsgruppe. Die Wildtyp Gruppe hatte einen mittleren Wasseranteil von $79,78\% \pm 0,65\%$ während bei den TLR 2/4 defizienten Tiere der Wasseranteil bei $79,36\% \pm 0,66\%$ lag ($p=0,2609$).

3.2.2 Hirnödem der TLR9 knockout Mäuse

Wie für die TLR 2/4 doppelknockout Tiere ermittelten wir für die TLR 9 knockout Tiere gravimetrisch den Hirnwassergehalt 24 Stunden nach Trauma. Beim Vergleich der traumatisierten Hemisphären der Wildtyp Gruppe mit denen der TLR9 knockout Gruppe ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Hier lag der Wassergehalt der Wildtyp Mäuse bei $81,16\% \pm 0,54\%$ und der der knockout Mäuse bei $80,69\% \pm 0,83\%$ ($p=0,3255$). Vergleicht man jedoch den Hirnwassergehalt der kontralateralen, nicht traumatisierten

Hemisphären der Wildtyp Mäuse von $79,81\% \pm 0,47\%$ mit dem der TLR9 knockout Mäuse von $78,64\% \pm 0,58\%$, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0078$).

Hirnödem TLR 9 KO vs. WT

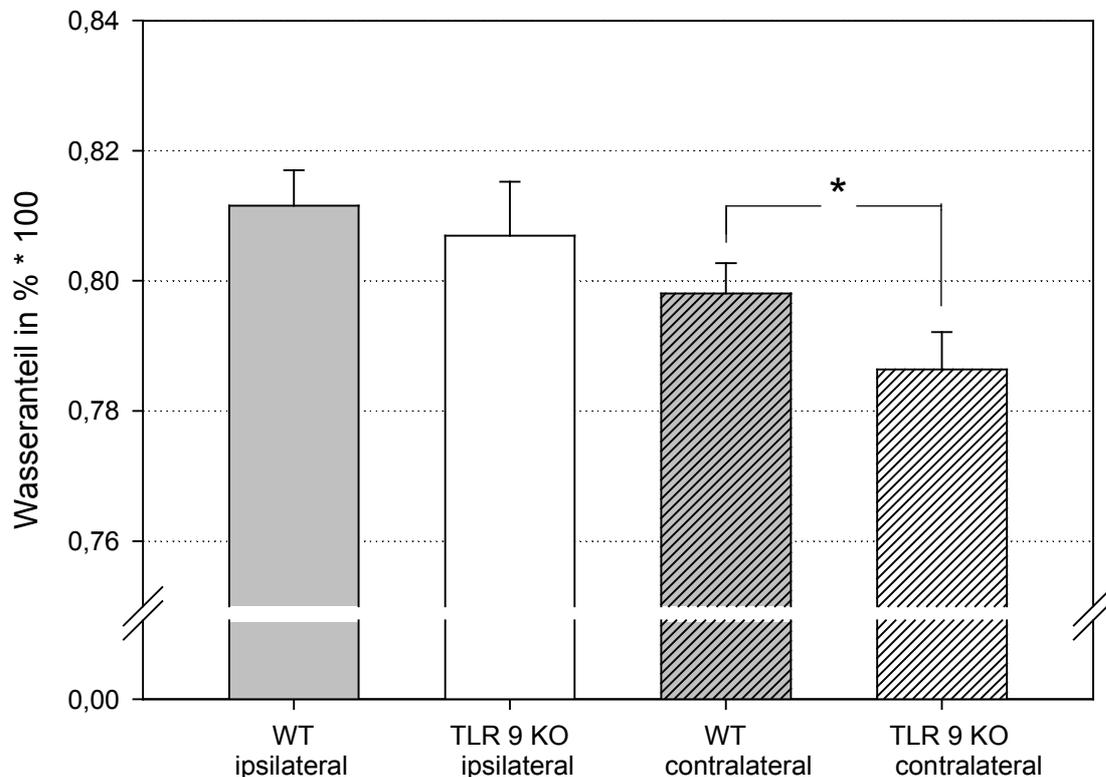


Abbildung 9: Dargestellt ist der $MW \pm SD$ des Hirnwassergehalts der einzelnen Hemisphären von Wildtyp Mäusen und TLR9 knockout Mäusen 24 Stunden nach Trauma ($n=5$). Wie schon bei den TLR2/4 knockout Tieren ergibt sich kein signifikanter Unterschied für die ipsilateralen Hemisphären ($p > 0,3255$). Beim Vergleich der kontralateralen Hemisphären zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied von 1,17 Prozentpunkten (*) ($p < 0,0078$). Als wahrscheinlichste Ursache sehen wir eine leicht zur Mittellinie verschobene Lokalisation des Traumas, die nach Berechnung des Gesamtdödem vernachlässigt werden kann.

Die signifikante Differenz in der Ödementwicklung der beiden kontralateralen Hemisphären lassen sich nur über einen methodischen Fehler erklären. Wie bereits weiter oben angesprochen, ist eine Verschiebung des Traumadefekts über die Mittellinie hinweg die wahrscheinlichste Ursache für diesen Effekt. In diesem Fall ist die Berechnung des Gesamtwassergehalts am aussagekräftigsten, da sie nicht von der Traumalokalisation oder Wasserverschiebungen über die Mittellinie beeinflusst wird.

Fasst man also beide Hemisphären zusammen und berechnet daraus den Gesamtwassergehalt des Gehirns so ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Der Gesamtwasseranteil

der Wildtyp Mäuse betrug 24 Stunden nach Trauma $80,51\% \pm 0,39\%$ während bei den TLR 9 knockout Tieren lediglich ein Wert von $79,70\% \pm 0,61\%$ erreicht wurde ($p < 0,05$).

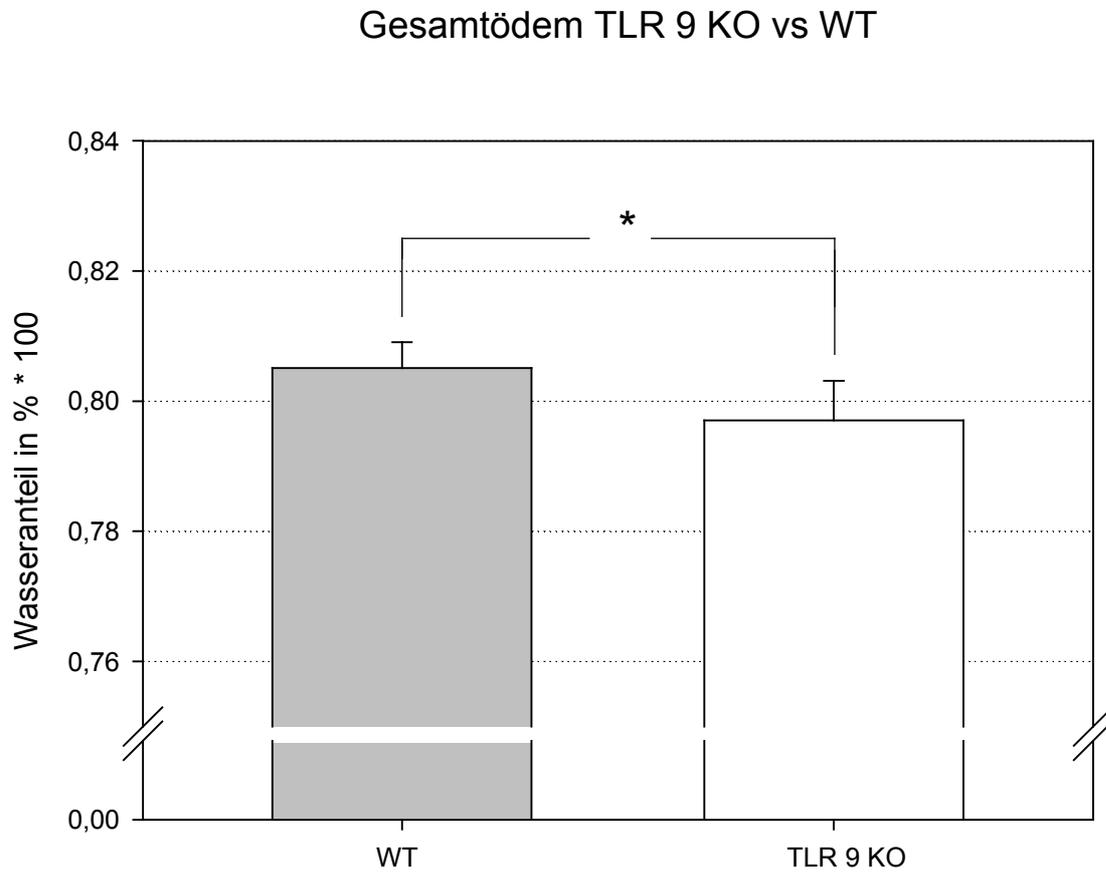


Abbildung 10: Dargestellt ist der $MW \pm SD$ des Gesamtwassergehalts der Gehirne von Wildtyp und TLR9 knockout Mäusen 24 Stunden nach Trauma ($n=5$). Der Wasseranteil lag bei den TLR9 knockout Mäusen um 0,81 Prozentpunkte signifikant unter dem der Wildtyp Mäuse (*) ($p < 0,05$).

3.3 Schwellung des Hirns

Da eine verstärkte Extravasation von Flüssigkeit auch eine Ausdehnung des Hirngewebes nach sich zieht, bestimmten wir histomorphometrisch die Größe des Hirnvolumens 24 Stunden nach Trauma. Annäherungsweise lässt sich damit die Ausdehnung der traumatisierten Hemisphäre als Differenz der Volumina beider Hemisphären ermitteln.

3.3.1 Hirnschwellung der TLR2/4 knockout Mäuse

Da sich bei den TLR2/4 knockout Mäusen bereits bezüglich des Hirnödems keine signifikante Differenz zur Wildtyp Vergleichsgruppe ermitteln ließ, erwarteten wir auch für die Volumenausdehnung der traumatisierten Hemisphäre keinen signifikanten Unterschied. Während die ipsilateralen Hemisphären der Wildtyp Tiere in Schnitt um $16,21\text{mm}^3 \pm 3,60\text{mm}^3$ größer als die entsprechenden kontralateralen Hemisphären waren, lag dieser Wert bei der TLR2/4 knockout Gruppe bei $18,90\text{mm}^3 \pm 6,47\text{mm}^3$. Demnach konnte auch für die Schwellung der traumatisierten Hemisphäre zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma keine signifikante Differenz zwischen TLR2/4 knockout und Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden ($p=0,4404$).

Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre in mm^3

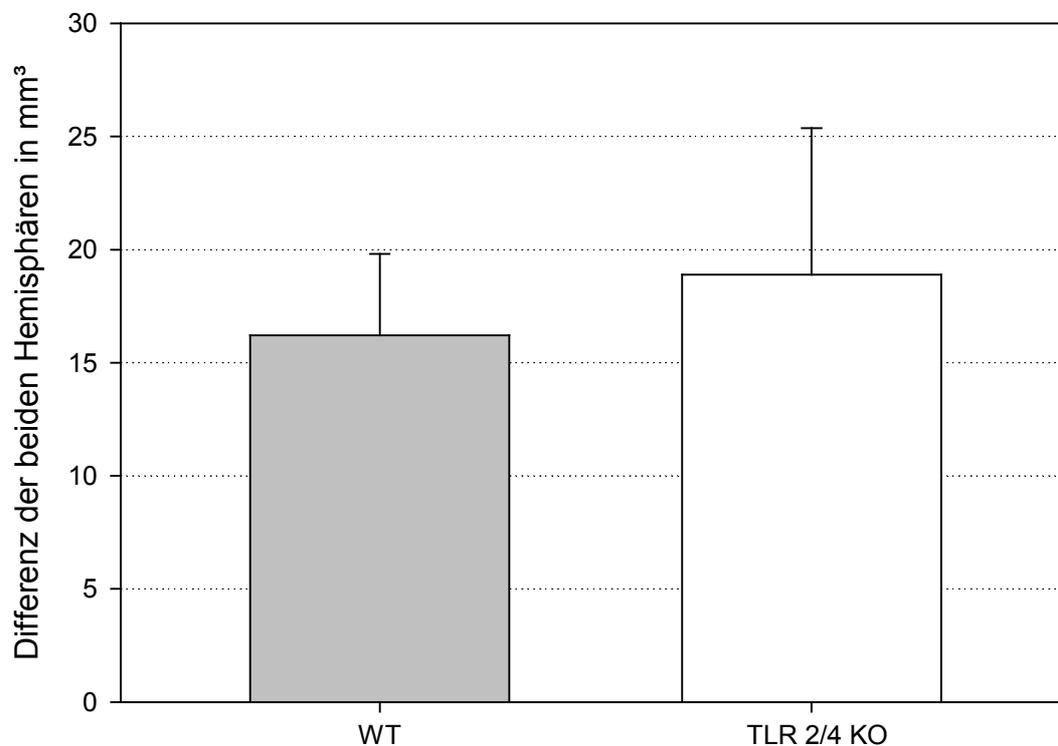


Abbildung 11: Die Schwellung der traumatisierten Hemisphäre wurde als Differenz der Volumina der beiden Hemisphären errechnet und ist hier in mm^3 als $\text{MW} \pm \text{SD}$ dargestellt ($n=5$). Beim Vergleich der Hemisphärenschwellung der Wildtyp Mäuse mit den TLR2/4 knockout Mäusen ergab sich keine Signifikanz ($p=0,4404$).

Vergleicht man die Volumina der gesamten Hirne, also die Summation beider Hemisphären, so ergibt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Das mittlere Volumen lag in der TLR2/4 Knockout-Gruppe bei $321,186 \pm 5,047 \text{ mm}^2$ und in der Wildtyp-Gruppe bei $323,724 \pm 17,611 \text{ mm}^2$ (p-Wert = 0,765).

3.3.2 Hirnschwellung der TLR9 knockout Mäuse

Falls sich ein größerer Anteil an Wasser im Hirngewebe direkt auf das Volumen des Gehirns auswirkt, würden wir, in Analogie zu unseren Versuchen zum Hirnödem, eine signifikant größere Schwellung der traumatisierten Hemisphären der TLR9 knockout Mäuse gegenüber den wildtyp Mäusen erwarten. Dies lässt sich aber mit unseren Resultaten nicht bestätigen. Für die Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre der wildtyp Mäuse ergibt sich ein Wert von $16,80 \text{ mm}^3 \pm 5,99 \text{ mm}^3$ und für die TLR9 knockout Mäuse $15,03 \text{ mm}^3 \pm 4,28 \text{ mm}^3$ (p=0,6380). Damit lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen prozentualem Wasseranteil des Hirns und Schwellung der traumatisierten Hemisphäre darstellen.

Im vorigen Abschnitt zeigte sich für die Bestimmung des Hirnwassergehaltes ein signifikanter Unterschied zwischen TLR 9 knockout und Wildtyp Tieren erst bei Betrachtung der gesamten Hirne, also nach Summation des Wassergehaltes der traumatisierten und nicht traumatisierten Hemisphäre. In Analogie zu diesen Ergebnissen erwarteten wir für die Schwellung der gesamten Hirne ebenfalls einen signifikanten Unterschied.

Die TLR 9 knockout Tiere hatten 24 Stunden nach Trauma ein mittleres Hirnvolumen von $284,08 \pm 9,26 \text{ mm}^2$ während die Wildtyp-Gruppe ein Volumen von $294,24 \pm 4,42 \text{ mm}^2$ erreichte. Bei einem p-Wert von 0,058 entspricht dies einer klaren Tendenz ohne einen eindeutig signifikanten Unterschied darzustellen.

Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre in mm³

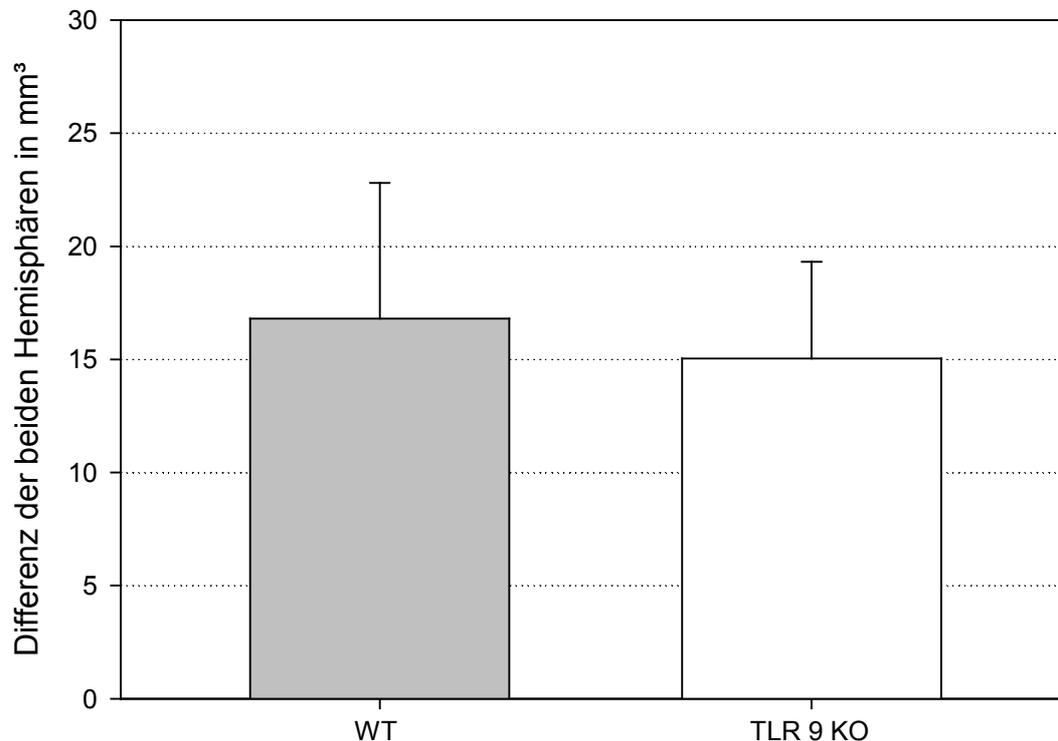


Abbildung 12: Die Schwellung der traumatisierten Hemisphäre wurde als Differenz der Volumina der beiden Hemisphären errechnet und ist hier in mm³ als MW±SD dargestellt (n=5). Beim Vergleich der Hemisphärenschwellung der Wildtyp Mäuse mit den TLR9 knockout Mäusen ergab sich keine Signifikanz (p=0,6380).

3.3.3 Hirnschwellung der mit CpG ODNs konditionierten Mäuse

In einer weiteren Versuchreihe untersuchten wir die Auswirkung der Applikation von TLR9-stimulierenden CpG ODNs auf pathophysiologische Parameter des Schädel-Hirn-Traumas. Da die Vorbehandlung mit TLR-Agonisten in Studien anderer Arbeitsgruppen an Ischämie-Modellen Hinweise auf eine verminderte Aktivierung von toll-like Rezeptoren nach akuter Hirnverletzung erbrachte, wollten wir dieses Konzept anhand des experimentellen Hirntraumas untersuchen. Dazu wurde den Mäusen 72 Stunden vor Trauma ein TLR9-Agonist intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse traumatisiert und die Hirne 24 Stunden nach Trauma histomorphometrisch ausgewertet.

Bei den Tieren, die mit Kontroll-ODNs vorbehandelt wurden, ergab sich eine Volumenzunahme der ipsilateralen Hemisphäre um $22,78\text{mm}^3 \pm 3,13\text{mm}^3$ während nach

Vorbehandlung mit ODNs lediglich eine Zunahme um $19,86\text{mm}^3 \pm 4,14\text{mm}^3$ zu verzeichnen war. Diese Differenz war jedoch nicht signifikant ($p=0,1749$).

Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre in mm^3

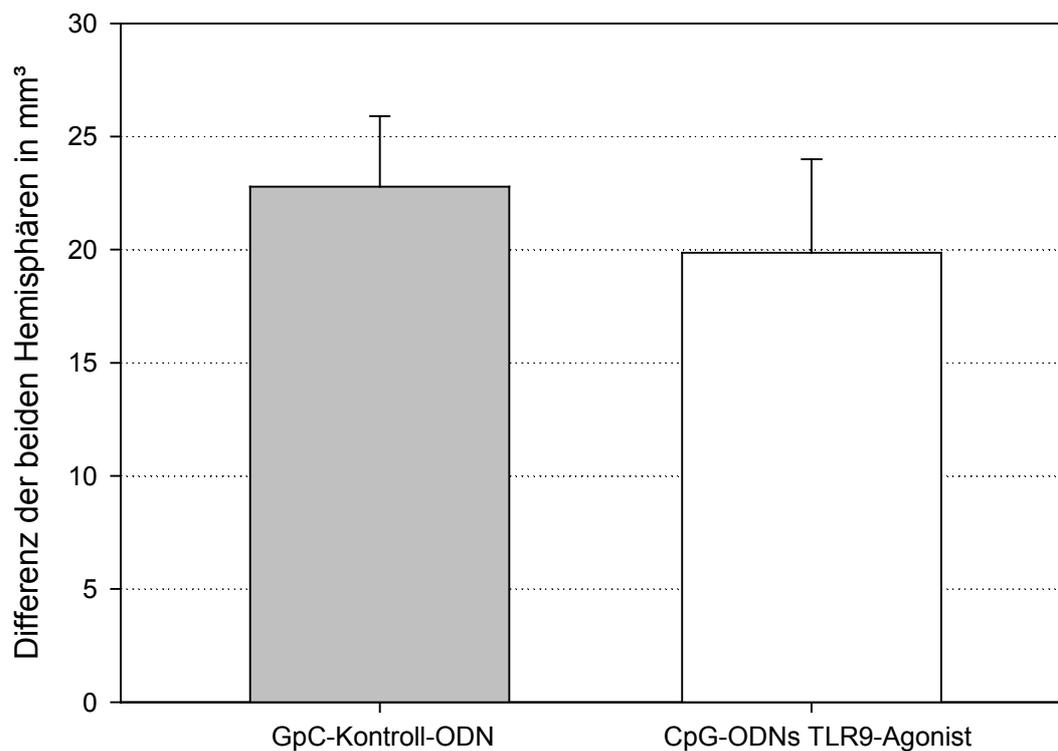


Abbildung 13: Die Schwellung der traumatisierten Hemisphäre wurde als Differenz der Volumina der beiden Hemisphären errechnet und ist hier in mm^3 als $\text{MW} \pm \text{SD}$ dargestellt ($n=6-7$). Beim Vergleich der Hemisphärenschwellung der mit Kontrollen vorbehandelten Mäuse mit den mit CpG ODNs stimulierten Mäusen ergab sich keine Signifikanz ($p=0,1749$).

Vergleicht man wieder die Schwellung beider Hemisphären der verschiedenen Gruppen, so ergibt sich auch hier kein signifikanter Unterschied. In der Kontrollgruppe belief sich das mittlere Volumen des gesamten Hirns 24 Stunden nach Trauma auf $283,30 \pm 14,90$ während die Gruppe, die mit dem TLR 9 Agonisten vorbehandelt wurde sogar ein leicht höheres Volumen von $289,45 \pm 7,30$ aufwies ($p=0,379$).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss der TLRs auf die Pathologie des experimentellen Schädel-Hirn-Traumas

Bezüglich des neuronalen Überlebens sprechen unsere Ergebnisse eine eindeutige Sprache. Sowohl das Fehlen der toll-like Rezeptoren 2 und 4 sowie 9 als auch eine Toleranzinduktion mittels TLR9 stimulierenden CpG ODNs stellten einen signifikanten Schutz des Hirnparenchyms dar. Diese Protektion war nach Stimulierung des TLR9 drei Tage vor Trauma am stärksten und resultierte in einer relativen Reduktion des sekundären Nekrosewachstums von bis zu 38,6%. Die Frage nach dem Einfluss der TLRs auf die Entwicklung des Hirnödems konnten wir jedoch nicht eindeutig beantworten. Während die TLR9 knockout Mäuse eine signifikante Reduktion des Gehirnwassergehalt 24 Stunden nach Trauma aufwiesen war ein solcher Effekt für die TLR 2/4 doppelknockout Tiere nicht nachweisbar.

Bei der Untersuchung der ipsilateralen Hemisphärenschwellung zeigte sich in keiner der drei Versuchsreihen eine signifikante Beeinflussung durch eine veränderte Aktivierung von toll-like Rezeptoren.

4. Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine posttraumatische TLR-Aktivierung negativen Einfluss auf neuronales Überleben nimmt. Im folgenden sollen die Zusammenhänge zwischen Neuroprotektion und einer veränderten Immunantwort näher beleuchtet werden.

4.1 Experimentelles Modell

In den letzten Jahrzehnten wurden eine Vielzahl verschiedener Modelle zur Untersuchung des Schädel-Hirn-Traumas entwickelt. Das fluid percussion Modell (FP), bei dem zur Erzeugung des Traumas ein Wasserstrahl verwendet wird, und das controlled cortical impact Modell (CCI), welches von uns verwendet wurde, sind die am häufigsten genutzten Modelle.

Wir entschieden uns für das CCI Modell, da das FP Modell entscheidende Nachteile hat. In detaillierten Untersuchungen zeigte sich, dass der Wasserstoß, der beim FP Modell verwendet wird, nach Auftreffen auf der Hirnoberfläche in den epiduralen Raum eindringt und damit die genaue Berechnung des verdrängten Hirngewebes erschwert und somit eine schlechte Standardisierbarkeit zur Folge hat (Dixon et al. 1988). Zusätzlich sind die histopathologischen Veränderungen, die durch den Wasserpuls verursacht werden, unterschiedlich zu denen, die typischerweise bei schweren Hirnverletzungen an Menschen gesehen werden.

Beim CCI findet sich eine weitaus größere Übereinstimmung zwischen den durch das Trauma simulierten und den an verunfallten Menschen beobachteten histopathologischen Veränderungen (Dixon et al. 1991). Der größte Vorteil des CCI liegt jedoch in der Biomechanik der Traumaapplikation. Das Prinzip des pneumatisch bewegten Bolzens erlaubt eine genaue Festlegung von Geschwindigkeit und Kontaktzeit. Außerdem verwendeten wir in unseren Versuchen ein eigens für die Traumatisierung von Mäusen gefertigtes Gerät, welches sich durch eine sehr präzise Steuerbarkeit der Eindringtiefe auszeichnet (Zweckberger et al. 2003). Auf diese Weise war es möglich Läsionen zu erzeugen, deren Abmessungen eine geringe Standardabweichung aufwiesen. Folglich lässt sich eine nahezu identische Hirnschädigung reproduzieren. Nach sorgfältigem Verschluss des knöchernen Operationsdefektes stellt dieses Modell also ein effektives Werkzeug zur Erforschung des schweren, geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas dar.

Ein weiterer entscheidender Parameter bei der Untersuchung des Schädel-Hirn-Traumas ist die Zeitspanne, die zwischen Traumaapplikation und Opferung des Versuchstieres liegt.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass innerhalb der ersten 24 Stunden nach Applikation des Traumas ein kontinuierliches Wachstum der Nekrose stattfindet, während nach 24 Stunden kein weiteres, signifikantes Wachstum der Nekrosezone mehr festzustellen war (Eriskat et al. 1994) ; (Zweckberger et al. 2003). Auch für die Entwicklung des posttraumatischen Hirnödems ergaben sich in anderen Studien nach 24 Stunden bereits signifikante Unterschiede (Chen et al. 2009). Deshalb erschien uns die Untersuchung der pathophysiologischen Parameter zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma als sinnvoll. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch relevante äußere Faktoren zu minimieren wurden nur Mäuse männlichen Geschlechts und einem klar definierten Gewichtsbereich von 20-25 Gramm verwendet. Die Vergleichstiere waren C57/Bl6 Mäuse, da sowohl die TLR2/4 knockout als auch die TLR 9 knockout Mäuse mehrmals mit C57/Bl6 Mäusen rückgekreuzt wurden. Alle Tiere innerhalb einer Versuchreihe wurden in kurzen zeitlichen Abständen operiert. Die dabei verwendete Operationstechnik, das Material und die postoperative Haltung waren bei allen Mäusen identisch. Das Modell des controlled cortical impact (CCI) ist in unserer Arbeitsgruppe gut etabliert. Nach Erlernen des Modells konnten zufriedenstellende Standardabweichungen für die Nekrosevolumina erzielt werden. Zur Anästhesie wurde bei allen Versuchen ein Gasgemisch nahezu gleicher Zusammensetzung verwendet. Während der Narkose wurde die Körpertemperatur aller Tiere, unter Überwachung mittels einer rektalen Sonde, durch eine Heizmatte konstant gehalten. Die histomorphometrische Bestimmung der Nekrose- und Hirnvolumina wurden von der gleichen Person ausgeführt. Die dabei gewonnenen Bilder konnten effektiv über eine Computersoftware ausgewertet werden und ergaben eindeutig beurteilbare Ergebnisse. Die Bestimmung des Hirnwassergehalts ließ ebenfalls keinen Spielraum für Interpretation, da Feucht- auch Trockengewicht der Gehirne mittels einer elektronischen Waage ausgelesen wurden. All dies führte zu einer hohen Standardisierung der Versuchsergebnisse.

4.2 TLRs im ZNS

4.2.1 Grundlagen

In Drosophilafliegen wurde ein Protein beschrieben, welches die Embryogenese der wirbellosen Lebewesen beeinflusst. Dieses Protein wurde als toll-protein bezeichnet (Anderson et al. 1985).

Später zeigte sich, dass das toll-Protein große Ähnlichkeit mit dem Interleukin-1 Rezeptor, der in Vertebraten vorkommt, hat (Gay and Keith 1991). Dies war eine überraschende Erkenntnis, da man dem toll-Protein bisher nur eine Rolle in der dorsoventralen Polarisation der Drosophilafliegen zugeschrieben hatte (Anderson et al. 1985). Weitere Studien zeigten dann, dass eine Mutation im toll-Protein zu einer Beeinträchtigung der Abwehr von Pilzinfektionen führte (Lemaitre et al. 1996).

Taguchi et al. gelang der erste Nachweis eines zum toll-Protein homologen Proteins in Säugetieren. Dieses Protein ist heute bekannt als TLR1 (Taguchi et al. 1996).

Anschließend wurden noch weitere dem toll-Protein homologe Moleküle in Säugetieren entdeckt. Medzhitov et al. beschrieben das heute als TLR4 bekannte Protein, dessen Aktivierung zu einer Produktion von bestimmten Transkriptionsfaktoren und im weiteren Verlauf von proinflammatorischen Zytokinen und immunmodulatorischen Molekülen führte (Medzhitov et al. 1997). Bis heute sind 13 verschiedene TLRs bekannt. Davon lassen sich 11 auch im menschlichen Genom nachweisen (Takeda and Akira 2007). Ausser in wirbellosen Tieren und in Säugetieren werden toll-like Proteine auch in Pflanzen exprimiert (Staskawicz et al. 1995). Die strukturelle Ähnlichkeit dieser Rezeptoren über die Grenzen verschiedener Spezies hinweg (Rock et al. 1998) untermauerte die Vermutung, dass diese Proteine Teil der angeborenen Immunabwehr sind.

In Vertebraten gibt es zwei verschiedene Systeme zur Abwehr von Krankheitserregern. Die angeborene und die lernfähige Immunabwehr. Die lernfähige Abwehr erzeugt über Antikörperbildung eine spezifische Antwort gegen ganz bestimmte Oberflächenstrukturen von Eindringlingen und generiert einen lebenslangen Schutz durch Gedächtniszellen. Dahingegen reagiert das angeborene Immunsystem unspezifisch und ohne Gedächtnisbildung. Der große Vorteil ist jedoch die rasche Geschwindigkeit dieser Abwehr, da keine Ausreifung von Zellen oder Produktion von Antikörpern nötig ist (Medzhitov and Janeway, Jr. 2000b). Zusätzlich hat die angeborene Immunität noch eine weitere erstaunliche Fähigkeit. Sie reagiert nämlich nicht nur auf körperfremde, sondern auch auf körpereigene Strukturen.

Diese Fähigkeit ist für unsere Versuche von großem Interesse. Denn bei einer traumatischen Zellschädigung wird eine Vielzahl von zelleigenen Stoffen freigesetzt, die eine bevorstehende Störung der Gewebshomöostase anzeigen und so zu einer Antwort der angeborenen Immunität führen. Welche Stoffe das im einzelnen sind soll im nächsten Kapitel ausgeführt werden.

4.2.2 Lokalisation, Liganden und Signalkaskade der TLRs

Will man die Rolle der TLRs bei den Prozessen untersuchen, die nach einer akuten Hirnschädigung ablaufen, so stellen sich zunächst ein paar grundsätzliche Fragen. Im folgenden Kapitel soll geklärt werden, wo TLRs lokalisiert sind, auf welche Signale TLRs reagieren und wie diese Signale verarbeitet werden.

In einer Reihe von Forschungsarbeiten gelang in Zellen der Mikroglia der Nachweis von für TLRs kodierender mRNA und/oder der Proteine selbst. Unter anderem konnte dort die Präsenz von TLR2 (Kielian et al. 2002); (Rasley et al. 2002), TLR4 (Olson and Miller 2004) und TLR9 (Dalpke et al. 2002) bewiesen werden. Diese Tatsache erscheint wenig verwunderlich, da Mikrogliazellen die im ZNS lokalisierte Variante der ubiquitär vorhanden zellulären Immunabwehr sind.

Aber auch andere Vertreter der Gliazellen, denen man ursprünglich keine Rolle bei Immunprozessen zugesprochen hatte, besitzen toll-like-Rezeptoren.

In Kulturen mit mausspezifischen Astrozyten konnte eine geringe jedoch stetige Expression von mRNA nachgewiesen werden, die für TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9 kodiert (Bowman et al. 2003; Bsibsi et al. 2002; Carpentier et al. 2005; Esen et al. 2004; Jack et al. 2005). Die Expression dieser Toll-like-Rezeptoren wird nach Kontakt mit ihren spezifischen Liganden rasch hochreguliert (Bowman et al. 2003; Carpentier et al. 2005). Außerdem wiesen Bsibsi et al. TLR2 und TLR3 auch in Oligodendrozyten nach (Bsibsi et al. 2002).

In den letzten Jahren gelang in mehreren Studien der Nachweis von TLRs auch in Neuronen. Mishra et al. beschrieben die Expression von TLR2 und TLR6 in Neuronen von Mäusen unter physiologischen Bedingungen in vivo. Nach parasitärer Infektion war sogar die Expression von TLR2, 4, 6, 7 und 8 detektierbar (Mishra et al. 2006). In in vitro Versuchen exprimieren Nervenzellen von Ratten mRNA der TLRs 1 bis 9 (Tang et al. 2007).

Natürlich besitzen auch nicht ZNS-spezifische Zellen TLRs. Von großer Bedeutung sind Endothelzellen, die als wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke ebenfalls über toll-like-Rezeptoren verfügen (Gibson, III et al. 2008) .

Welche Moleküle im einzelnen erkannt werden, ist vor allem für die TLRs 2, 4 und 9 gut bekannt. TLR2 und TLR4, die sich an der Zelloberfläche befinden, detektieren eine Vielzahl von unterschiedlichen Pathogenen, darunter Membranlipide von gram-positiven Bakterien, Mykoplasmen und Spirochäten (Aliprantis et al. 1999; Aliprantis et al. 2000; Hirschfeld et al. 1999; Lien et al. 1999) sowie Bestandteile gram-negativer Bakterien (Schwandner et al. 1999). TLR4 hat ausserdem eine starke Affinität zu LPS (lipopolysacharid), einem Molekül der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien (Hirschfeld et al. 2000; Lien et al. 2000). TLR9, der sich an intrazellulären Strukturen wie Endosomen befindet, aktiviert das Immunsystem bei Kontakt mit viraler oder bakterieller Einzelstrang-DNA oder –RNA, die unmethylierte CpG-Motive enthält (Takeda et al. 2003). Außerdem lässt sich TLR9 mittels synthetischer Oligonukleotide stimulieren, wie wir sie in unseren Präkonditionierungs-Versuchen verwendet haben.

Die Liste der Liganden von TLRs beinhaltet jedoch auch eine Vielzahl körpereigener Substanzen. TLR2 und TLR4 können endogene Moleküle binden, die bei Gewebsschäden anfallen und als eine Art Warnsignal dienen (Miyake 2007). Zu diesen Liganden gehören beispielsweise Hitzeschockproteine, Fibronectin, Hyaluronsäure, Heparansulfate, Fibrinogen und einige weitere körpereigene Moleküle. Auch TLR9 kann durch endogene Moleküle aktiviert werden. In Endosomen eingeschleubte zelleigene DNA oder RNA führt zu einer TLR9 vermittelten Entzündungsreaktion (Wagner 2006).

Entscheidend für die Spezifität der Bindung zwischen TLR und Ligand ist nicht nur die Struktur des Rezeptors sondern auch die Kooperation zwischen verschiedenen Rezeptorgruppen. Beispielsweise ist TLR2 in der Lage mit TLR1, TLR6 oder auch mit Proteinen anderer Rezeptorfamilien wie CD36 zu heterodimerisieren. Diese Komplexe befähigen einen Rezeptor zwischen verschiedenen Liganden zu unterscheiden (Akira et al. 2006).

Allen TLRs gemein ist die Erkennung dieser Liganden mittels einer leucinreichen, extrazellulären Domäne und die Signaltransduktion über eine intrazelluläre TIR-Domäne (Toll/IL1-Rezeptor), die strukturell mit dem IL1-Rezeptor verwandt ist (Takeda et al. 2003). Nach Aktivierung bindet die TIR-Domäne der TLRs an sogenannte Adaptermoleküle. Dieser Schritt stellt einen weiteren wichtigen Faktor in der Spezifität der Immunantwort auf die jeweiligen Liganden dar. Je nach Ligand und TLR wird eines oder mehrere der Adaptermoleküle MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR domain–

containing adaptor protein; oder MAL), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β ; oder TICAM1) oder TRAM (TRIF-related adaptor molecule oder TICAM2) rekrutiert (Akira and Takeda 2004).

Dabei nimmt MyD88 eine zentrale Rolle ein. Alle TLRs ausser TLR3 sind in der Lage MyD88 zu rekrutieren und somit einen MyD88 abhängigen Signalweg zu beschreiten. Wird TLR4 oder die Rezeptorkomplexe TLR1/2 oder TLR2/6 aktiviert, so binden sie das Adaptermolekül TIRAP, welches MyD88 aktiviert. Im weiteren Verlauf interagiert MyD88 mit Enzymen der IRAK-Familie, speziell IRAK4 ist essentiell für die Aktivierung des MyD88 Weges. Nach Phosphorylierung dissoziieren die IRAKs von MyD88 und aktivieren TRAF6, eine E3 Ligase. TRAF6 bildet seinerseits einen Komplex mit Ubc13 und Uev1A. Dieser Komplex führt zur Aktivierung einer MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) namens TAK1 (Chen 2005).

TAK1 aktiviert zwei Aufzweigungen des MyD88 Weges. Zum einen kommt es durch den IKK-Komplex, bestehend aus IKK α , IKK β und NEMO, zur Phosphorylierung von I κ B Proteinen, zur Degradierung von I κ Bs und letztendlich zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Zum anderen aktiviert der TAK1-Komplex Moleküle der MAPKK-Familie, die wiederum Moleküle der MAPK-Familie (p38, JNK) aktivieren und schließlich das Protein AP-1 (activator protein-1) phosphorylieren. Sowohl NF- κ B als auch AP-1 sind Transkriptionsfaktoren, die zur Expression von inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-6, IL-1, IL-12 führen. Eine weitere Möglichkeit zur Induktion dieser Zytokine stellt die direkte Phosphorylierung und Translokation in den Zellkern von IRF5 (Interferon-regulatory-factor 5) durch den MyD88-TRIF6-IRAK4-Komplex dar (Kawai and Akira 2007b).

Die innerhalb der Zellen lokalisierten TLR7 und TLR9 besitzen ebenfalls einen MyD88-abhängigen Signalweg. Dabei spielt ein weiteres Molekül der IRF-Familie eine Rolle, nämlich IRF7. IRF7 wird in pDC (plasmacytoid dendritic cells) dauerhaft exprimiert, und auch andere Zellen sind in der Lage die Expression dieses Proteins rasch hochzuregulieren (Ito et al. 2005). Ein Komplex aus MyD88, TRAF3, TRAF6, IRAK1 und IRAK4 aktiviert IRF7, der dann in den Zellkern transloziert wird und Typ I Interferon induzierende Gene aktiviert (Honda et al. 2005). (siehe Abb.14).

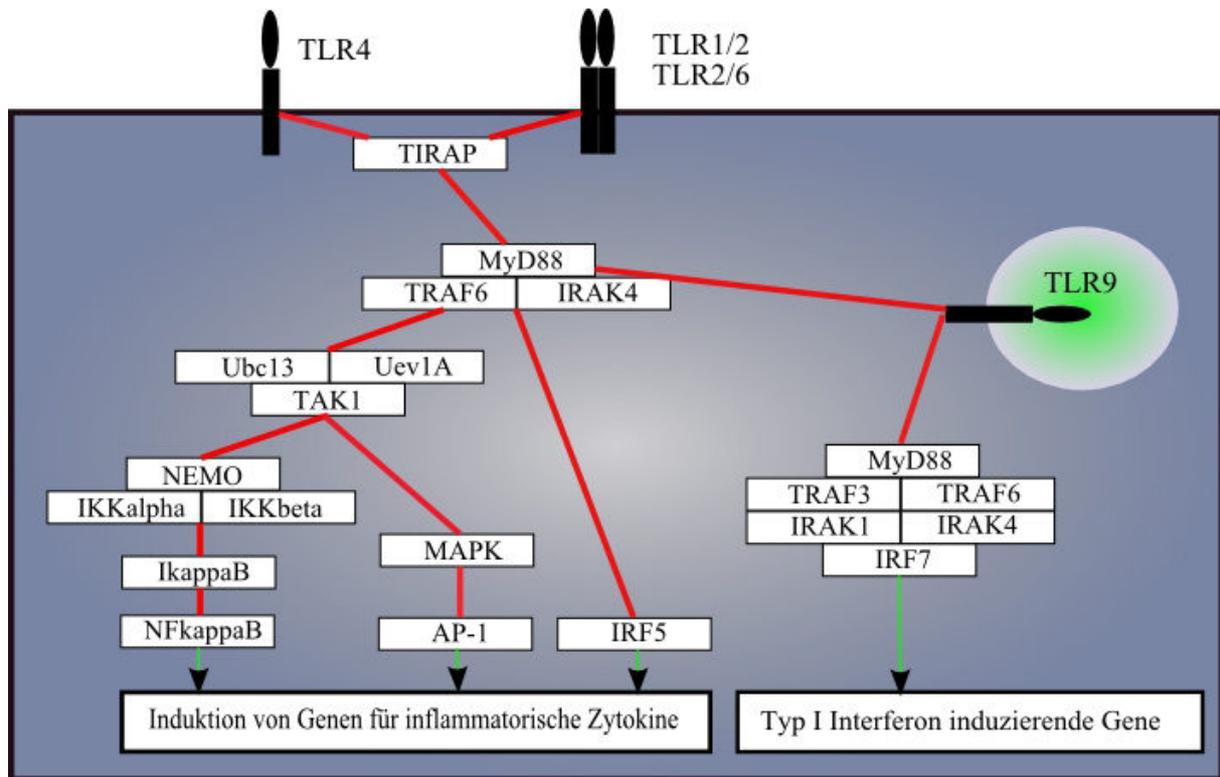


Abb.14: Schema der MyD88-abhängigen Signaltransduktion für TLR2, TLR4 und TLR9. TLR2 und TLR4 befinden sich an der Zelloberfläche, während TLR9 an Membranen intrazellulärer Kompartimente zu finden ist. Alle genannten TLRs rekrutieren den MyD88, IRAK4 und TRAF6 Komplex um dann den Ubc13, Uev1A, TAK1 Signalweg zu beschreiten. Von hier aus werden zwei verschiedene Wege durchlaufen, die zur Translokation von NFκB in den Zellkern und zur Aktivierung von AP-1 führen. Der MyD88, IRAK4 und TRAF6 Komplex phosphoryliert ausserdem IRF5, welches im Anschluss in den Zellkern übertritt. IRF5, NFκB und AP-1 sind Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Genen für inflammatorische Zytokine induzieren. TLR9 rekrutiert zusätzlich einen Komplex bestehend aus MyD88, TRAF3, TRAF6, IRAK4 und IRAK1. IRAK1 phosphoryliert daraufhin IRF7, der nach Translokation in den Zellkern Typ I Interferon induzierende Gene aktiviert.

Bei MyD88 knockout Mäusen kommt es jedoch nach Stimulation mit Liganden von TLR3 oder TLR4 zu einer ungestörten Induktion von IFNβ (Kawai et al. 2001) Außerdem zeigen MyD88 knockout Mäuse eine verzögerte Aktivierung von MAPK und NF-κB (Kawai et al. 1999).

Eine Erklärung hierfür bietet ein zweiter, MyD88-unabhängiger, TRIF-abhängiger Signalweg. TLR3 und TLR4 können TRIF rekrutieren. N- und C- terminales Ende von TRIF besitzen unterschiedliche Funktionen. Die N-terminale Region ist in der Lage einen Komplex mit TRAF3, IKKi und TBK1 zu bilden, welcher wiederum IRF3 phosphoryliert (Sharma et al. 2003). Phosphoryliertes IRF3 bildet Dimere, die in den Zellkern wandern und dort Interferon-induzierende Zielgene aktivieren. Die späte Aktivierung von MAPK und NF-κB erfolgt über

Komplexbildung des N-terminalen Endes von TRIF mit TRAF6 und RIP1 (Cusson-Hermance et al. 2005). RIP1 und TRAF6 aktivieren TAK1, ein Molekül, welches ebenfalls am MyD88 Signalweg partizipiert, und am Ende zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen führt.

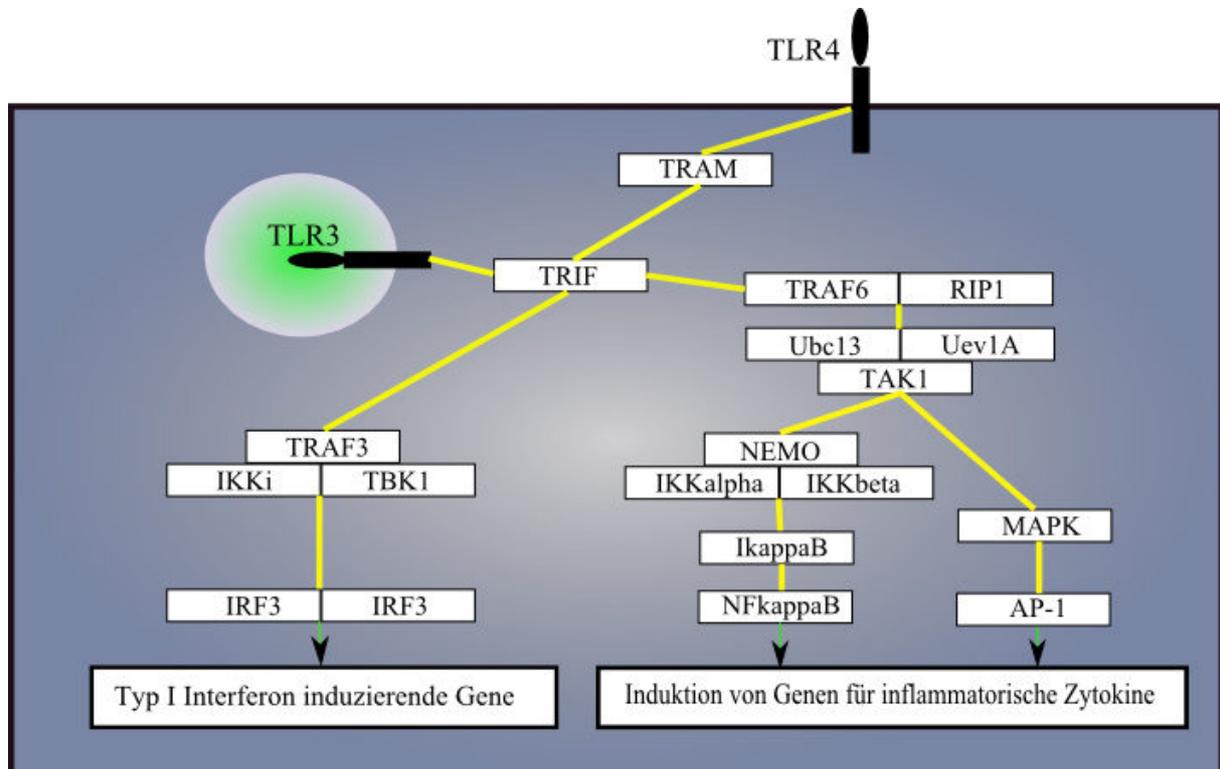


Abb.15: Schematische Darstellung des MyD88-unabhängigen Signalweges von TLR3 und TLR4. TLR3 ist intrazellulär, TLR4 an der Zelloberfläche lokalisiert. Beide Rezeptoren rekrutieren TRIF und führen so über einen Komplex aus TRAF3, IKKi und TBK1 zur Phosphorylierung von IRF3. Phosphoryliertes IRF3 dimerisiert und transloziert in den Zellkern wo es Typ I Interferon induzierende Gene aktiviert. TRIF ist weiterhin in der Lage einen Komplex aus TRAF6 und RIP1 zu rekrutieren, der wiederum den bereits aus der MyD88-abhängigen Signalverarbeitung bekannten Komplex aus Ubc13, Uev1A und TAK1 aktiviert. Die daraus resultierende Induktion von Genen für inflammatorische Zytokine geschieht jedoch, im Vergleich zur MyD88-abhängigen Aktivierung, zeitlich verzögert.

Zusammenfassend signalisieren TLRs über zwei verschiedene Signalwege. Den MyD88 abhängigen, der von allen TLRs außer TLR3 genutzt wird und den TRIF-abhängigen Signalweg, der durch TLR3 und TLR4 gestartet werden kann. Am Ende der Signalkaskade steht die vermehrte Expression von Genen, die für Typ I Interferone sowie für eine Vielzahl inflammatorischer Faktoren kodieren.

4.2.3 Bedeutung der TLRs im ZNS

Das angeborene Immunsystem, welches in den meisten Lebewesen zur Abwehr von Mikroorganismen vorhanden ist, erkennt eine begrenzte Anzahl von konservierten Epitopen, sogenannten pathogen associated molecular patterns (PAMPs) um anschließend eine auf das Pathogen abgestimmte Gegenwehr zu organisieren (Medzhitov and Janeway, Jr. 2000a). Das Eindringen körperfremder Moleküle ist jedoch nicht unbedingte Voraussetzung für die Aktivierung von TLRs. Toll-like-Rezeptoren sind in der Lage endogene Signale zu detektieren, die nach Gewebeschäden, z.B. durch Ischämie oder Schädel-Hirn-Trauma, auftreten. Die konsekutive Aktivierung der angeborenen Immunität erfolgt somit auch als Folge von endogenen Stimuli, die im Sinne von Warnsignalen eine bevorstehende Störung der Zell- und Gewebshomöostase anzeigen (Matzinger 1994).

Während sich unsere Versuche auf die traumatische Schädigung des Gehirns beziehen, wurden die Auswirkungen der TLR-induzierten Immunabwehr auch an anderen Organen untersucht. So scheinen TLRs auch einen bedeutenden Einfluss in verschiedenen Krankheiten des kardiovaskulären Systems zu haben (Vallejo 2011). Ebenfalls Gegenstand von Untersuchungen ist der Einfluss von TLRs bei Erkrankungen des Pankreas (Bollyky et al. 2009) oder des hepatobiliären Systems (Katsargyris et al. 2009), um nur einige Studien zu nennen.

Einen wichtigen Hinweis, dass solche Signale von toll-like Rezeptoren erkannt werden, lieferten Ziegler und Kollegen. Sie wiesen eine verstärkte Expression von TLR2-, TLR4- und TLR9-mRNA in Wildtyp Mäusen nach fokaler, zerebraler Ischämie mit anschließender Reperfusion nach. Dabei war die stärkste Expression für TLR2 zu beobachten, die ihr Maximum 24 Stunden nach Reperfusion hatte (Ziegler et al. 2007). Auch einige Moleküle, die der intrazellulären Signalverarbeitung von TLRs dienen, so zum Beispiel MyD88, wiesen nach Ischämie eine verstärkte Expression auf. Diese Induktion scheint hauptsächlich in Zellen der Mikroglia stattzufinden, aber auch Neurone, Astrozyten und Endothelzellen waren beteiligt (Lehnardt et al. 2007). Beide zuvor genannten Studien untersuchten außerdem die Funktion von TLR2 im Hinblick auf neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung. Hierzu wurden die Infarktgrößen von TLR2 knockout Mäusen und C57Bl6 Mäusen verglichen. Die Nekrosevolumina waren bei den TLR2 knockout Tieren zwei Tage nach Ischämie annähernd um die Hälfte (Lehnardt et al. 2007), beziehungsweise drei Tage nach Ischämie um etwa 30 Prozent kleiner als bei den Wildtyp Vergleichstieren (Ziegler et al. 2007).

Neben TLR2 wird nach globaler Ischämie auch TLR4 überexprimiert. Hua et al. beschrieben eine gesteigerte Expression von TLR4 auf Proteinebene in Gehirnen von Wildtyp Mäusen nach globaler Ischämie. Diese Reaktion blieb erwartungsgemäß in TLR4-defizienten Tieren aus und ging dort mit einer verminderten Aktivität von NF κ B und niedrigeren Spiegeln an IL-6 und TNF α einher. Als mögliches Resultat dieser Veränderungen wiesen TLR4 knockout Mäuse 72 Stunden nach globaler Ischämie eine geringere Zahl untergehender Neurone sowie eine geringere Apoptoserate auf (Hua et al. 2007).

Immunprozesse spielen also eine entscheidende Rolle in den komplexen Vorgängen, die nach ischämischer Hirnschädigung ablaufen. Und auch nach traumatischer Schädigung finden sich Hinweise auf eine Beteiligung von toll-like Rezeptoren.

Park et al. erbrachten anhand eines kortikalen Stichwunden-Modells den immunhistochemischen Nachweis einer unterdrückten Aktivierung von Gliazellen in TLR2 knockout Mäusen gegenüber Wildtyp Mäusen (Park et al. 2008). Eine weitere Arbeitsgruppe beschrieb nach Durchtrennung entorhinaler Axone eine rasche Leukozyteninfiltration infolge Zytokin und Chemokinausschüttung aus Mikrogliazellen im Sinne einer angeborenen Immunreaktion. Gleichzeitig wurde TLR2 nicht jedoch TLR4 hochreguliert. Fünf Tage nach Axotomie war die Mobilisation von Immunzellen sowohl bei TLR2 knockout Mäusen als auch bei Mäusen mit Defizienz des Adaptermoleküls MyD88 vermindert (Owens et al. 2005). Einen protektiven Effekt gegenüber kälteinduziertem, kortikalem Trauma demonstrierten Koedel et al. an MyD88 knockout Mäusen. Dabei ergab sich 24 Stunden nach Trauma bei den MyD88 knockout Mäusen eine Reduktion des Nekrosevolumens um 25%, ein signifikant besserer neurologischer Status sowie erniedrigte Konzentrationen an Entzündungsparametern, wie IL-1 β und IL-6 gegenüber der Vergleichsgruppe. Überraschenderweise zeigten Mäuse mit einer Defizienz der TLRs 2 und 4 keine signifikanten Unterschiede zu Wildtyp Mäusen (Koedel et al. 2007).

In einigen Studien ließ sich für Simvastatin, ein Medikament welches vor allem in der Therapie der Arteriosklerose zur Senkung der Blutfettwerte eingesetzt wird, ein neuroprotektiver Effekt nach traumatischer Hirnschädigung nachweisen. Dabei ließen sich unter anderem Verbesserungen bezüglich Hirndurchblutung, Lernfähigkeit und Zellregeneration darstellen (Chen et al. 2008; Wu et al. 2008).

Da die Ursache dieser Neuroprotektion unklar war, untersuchte eine weitere Studie den Einfluss von Simvastatin auf das sekundäre Nekrosewachstum nach kortikalem Trauma an Ratten im Hinblick auf eine veränderte TLR-Aktivierung. Die Ratten erhielten 37,5mg/kg

Simvastatin per os zu den Zeitpunkten eine und sechs Stunden nach Trauma. Die Tiere, die das Medikament bekommen hatten, wiesen eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression an TLR4, NF κ B, IL-1 β , TNF α , IL-6 und ICAM-1 gegenüber der Placebo-Gruppe auf. Außerdem hatte die Simvastatin-Gruppe zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma ein geringer ausgeprägtes Hirnödem, eine verminderte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und eine niedrigere Apoptoserate als ihre Vergleichsgruppe. Diese Befunde legen den Verdacht nahe, dass Simvastatin durch Suppression eines TLR4 abhängigen Signalweges neuroprotektiv wirkt (Chen et al. 2009).

Toll-like-Rezeptoren spielen wahrscheinlich auch in einem Phänomen eine wichtige Rolle, das bereits seit vielen Jahrzehnten bekannt ist, und als Endotoxintoleranz bezeichnet wird. Mäuse, die mit einer niedrigen Dosis an LPS vorbehandelt werden, zeigen einen Überlebensvorteil, wenn ihnen später eine eigentlich tödliche Dosis verabreicht wird (Brooke 1965; Neter 1969). Dieses Phänomen wird allgemein als Endotoxintoleranz bezeichnet. Interessanterweise lässt sich mittels Injektion von LPS auch eine Protektion gegen ischämische Zellschäden induzieren. Im Gehirn konnte durch Applikation von LPS 3 Tage vor vollständiger Okklusion der mittleren Hirnarterie eine Reduktion des Infarkt volumens um ca. 25 Prozent erzielt werden (Tasaki et al. 1997). Auch mittels Stimulierung von TLR9 lässt sich eine solche Präkonditionierung von Geweben erzeugen. Hierzu dienen die oben genannten, synthetischen Oligonukleotide. Wie schon nach Toleranzinduktion durch TLR4 mit LPS zeigte sich ein protektiver, dosis- und applikationszeitpunktabhängiger Effekt für TLR9. Bei Vorbehandlung mit 20 μ g CpG ODNs (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Oligonukleotiden) 3 Tage vor Ischämie ließ sich eine maximale Reduktion der Infarktgröße um bis zu 61 Prozent demonstrieren (Stevens et al. 2008). Mögliche Wege, wie eben diese Toleranzentwicklung zustandekommt, werden im Kapitel 4.2.5 aufgeführt.

Ob jedoch die posttraumatische Entzündungskaskade grundsätzlich den neuronalen Zelltod verstärkt, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Durch Immunstimulation konnten auch neuroprotektive Effekte erreicht werden. Leon et al. verbesserten durch posttraumatische, intraokuläre Injektion von Zymosan, einem TLR2-Agonisten, das Wiedereinwachsen des proximalen Nervenstumpfes nach Axotomie des Nervus opticus bei Ratten (Leon et al. 2000), und wiederholte Injektion von TLR4 stimulierendem LPS bewirkt eine raschere Phagozytose von Myelinresten nach halbseitiger Durchtrennung des Rückenmarks bei Mäusen (Vallieres et

al. 2006). Beide Gruppen beschrieben eine Erhöhung der Zahl aktivierter Monozyten am Ort der Schädigung. In weiteren Studien führte die Stimulierung von transplantierten Oligodendrozyten mit dem TLR2-Liganden Zymosan zu einer beschleunigten Remyelinisierung (Setzu et al. 2006). Möglicherweise hat die Präsenz von TLR2 in Oligodendrozyten demnach eine Bedeutung bei Reperaturvorgängen im ZNS. Bei der Erforschung TLR-vermittelter Prozesse nach akuter Schädigung des Gehirns steht man also einem sehr komplexen Modell gegenüber. Dabei ist zu beachten, dass die oben genannten Ergebnisse mit einer Vielzahl verschiedener Modelle erzeugt wurden und die Resultate vermutlich nicht nur von der Art der Schädigung sondern auch von der Art des geschädigten Gewebes abhängen.

4.2.4 Mögliche Wege der Vermittlung neurotoxischer Wirkung durch TLRs

Wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, kommt es nach traumatischer Verletzung des Gehirns zu einer Entzündung. Im Bereich der Schädigung kommt es zur raschen Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten (Amat et al. 1996). Dass dieser Prozess durch toll-like-Rezeptoren beeinflusst wird, erscheint wenig verwunderlich. Nach Zellschädigung werden alle intrazellulären Bestandteile freigesetzt, die, wie oben geschildert, Liganden der verschiedenen toll-like-Rezeptoren sind.

Lehnardt et al. zeigten *in vitro*, dass Mikrogliazellen nach Applikation von LPS toxisch auf Oligodendrozyten wirken. Bei Verwendung von TLR4 knockout Zellen gab es keine derartige Neurodegeneration (Lehnardt et al. 2002). Entzündungsprozesse spielen also eine wichtige Rolle beim neuronalen Überleben. Die genauen Mechanismen, über die TLRs neuronalen Schaden vermitteln, sind nicht vollständig bekannt.

Possel et al. konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass Stimulation mit LPS und Interferon γ zu erhöhten Spiegeln an Stickstoffmonoxid (NO) führt. Dieser Effekt konnte durch weitere Zugabe von IL-1 β oder TNF α verstärkt werden. Die vermehrte Produktion von NO ist auf die Aktivierung von iNOS (inducible NO Synthase) vor allem in Zellen der Mikroglia zurückzuführen (Possel et al. 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass iNOS über einen TLR4-abhängigen Weg induziert werden kann. Weiteren Anhalt hierfür bietet eine Studie, die NF κ B, welches auch TLR-vermittelt in den Zellkern transloziert wird, als einen Schlüsselfaktor für die Aktivierung von iNOS beschreibt (Hur et al. 1999). Unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. während Ischämie, wenn nicht genug NADPH zur

Verfügung steht, wird die Herstellung von NO auch von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) begleitet. Aktivierte Mikrogliazellen erzeugen diese freien Radikale aber auch enzymvermittelt über die NADPH Oxidase (Ellis et al. 1989) oder die Cyclooxygenasen (COX) (Pourcyrous et al. 1993). Weitere Quellen für ROS stellt die mitochondriale Energieerzeugung (Piantadosi and Zhang 1996) dar. Knockout Mäuse mit einer Defizienz der NADPH Oxidase, iNOS oder COX-2 zeigten alle eine Neuroprotektion gegenüber exogenen, neurotoxischen Substanzen (Teismann and Ferger 2001) bzw. gegenüber LPS-induzierter Neurotoxizität (Wang et al. 2004).

In Ischämie modellen von Ratten verursachen ROS bereits Minuten bis Stunden nach Ischämie Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS (Li et al. 1995) und in geringerem Maße auch NO (Nguyen et al. 1992). NO schädigt DNS auch durch Deaminierung und Nitrierung (Nguyen et al. 1992).

Bei Reaktion von Superoxid (O_2^-) mit Stickstoffmonoxid (NO) kommt es zur Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$), einem Radikal mit vielfach höherem toxischen Potential als die beiden Reaktionspartner selbst (Crow and Beckman 1996). Auch Peroxynitrit bedingt Einzelstrangbrüche in DNA sowie Modifikationen in einzelnen Basen des Erbguts (Epe et al. 1996). Für die zuvor genannten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sind noch weitere zelltoxische Reaktionen beschrieben. Darunter die Zerstörung von Elektronenüberträgern und Enzymen der Atmungskette sowie die Oxidation von Lipiden mit Beeinträchtigung der Zellmembranstabilität (Radi et al. 1994). Je nach Ausmaß der Schäden an Erbgut und Makromolekülen der Zellen, kommt es zur Induktion von Apoptose bzw. zum nekrotischen Zelltod (Bonfoco et al. 1995). Wie bereits oben beschrieben stimulieren die frei werdenden Zellbestandteile nekrotischer Zellen wiederum TLRs, die dann Immunprozesse in Gang setzen. Infolge akuter Hirnschädigung besteht somit die Gefahr einer sich teilweise selbst unterhaltenden Neurodegeneration.

Darüber hinaus können ROS die Entwicklung eines Hirnödems begünstigen, welches sich auf verschiedene Weisen negativ auf das neuronale Überleben auswirken kann.

Zum einen führen ROS zu starker Arteriodilatation (Rosenblum 1983; Wei et al. 1985). Zum anderen verursachen ROS vermutlich durch Endothelschädigung eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Wei et al. 1985). Beide Effekte verstärken die Extravasation von Plasma ins Hirnparenchym. Hinzu kommt die vasodilatatorische Wirkung von NO, die vor allem die großen zerebralen Gefäße erweitert. Aoki et al. wiesen beispielsweise eine durch $TNF\alpha$

induzierbare, NO-vermittelte Vasodilatation der Karotiden von Katzen nach (Aoki et al. 1989).

In vitro Versuche mit menschlichen Endothelzellen zeigten, dass auch diese Zellen mit LPS stimuliert werden können. Nach Applikation des TLR4-Liganden war eine starke Induktion von NF κ B nachweisbar (Zhang et al. 1999). NF κ B induzierte Expression von TNF α veranlasst Endothelzellen zur Produktion von NO via iNOS (MacNaul and Hutchinson 1993) und von ROS via NADPH-Oxidase (Sorescu and Griendling 2002). Blabanov et al. zeigten, dass es auch nach leichten Schädel-Hirn-Traumata zur Aktivierung von Endothelzellen kommt. Dabei werden Mediatoren ausgeschüttet, die nicht nur Einfluss auf Vasomotion und Permeabilität haben, sondern auch auf Leukozytenadhäsion und -migration. Bereits zwei Stunden nach Trauma kam es zu einer gesteigerten Expression von intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Balabanov et al. 2001). ICAM-1 fördert die Akkumulation von Leukozyten im Entzündungsgebiet, und die Inaktivierung dieses Moleküls führt bei Ratten zu einer verbesserten motorischen Leistungsfähigkeit nach traumatischer Hirnverletzung (Knoblach and Faden 2002). Die Frage, ob vermehrte Expression chemotaktischer Mediatoren das sekundäre Nekrosewachstum nach traumatischen Verletzung steigern, bleibt jedoch umstritten. Whalen et al. sahen bei ICAM-1 knockout Mäusen gegenüber der Vergleichsgruppe keine signifikanten funktionellen oder histopathologischen Unterschiede nach experimentellem SHT (Whalen et al. 1999). Studien mit Ischämie-Modellen ergaben jedoch Hinweise auf indirekt schädigende Wirkung von Leukozyten durch Okklusionen kleiner Gefäße oder Freisetzung vasokonstriktiver Stoffe sowie direkte Schädigung durch zelltoxische Substanzen wie ROS (del Zoppo et al. 1991; Garcia et al. 1994).

Aktuelle Forschungsarbeiten bewiesen, dass Neuronen ebenfalls zu den TLR exprimierenden Zellreihen gehören. Anhalt für eine aktive Rolle der Nervenzellen selbst bei deren Zelltod ergibt sich aus einer Studie von Tang et al., die TLR-vermittelte Effekte unter ischämischen Bedingungen untersuchten. In neuronalen Zellkulturen, die einer Minderversorgung mit Glukose ausgesetzt wurden, zeigte sich eine verstärkte Expression von TLR2 und TLR4. Gleichzeitig waren erhöhte Spiegel an aktivierter JNK (c-Jun N-terminale Kinase) zu messen. JNK ist, wie weiter oben dargestellt, eine Kinase, die im Signalweg der toll-like Rezeptoren auftaucht und zur Aktivierung von AP-1 führt. Neurone ohne TLR2 oder TLR4 zeigten geringere Spiegel an aktivierter JNK. Der JNK/AP-1 Signalweg führt über Aktivierung von Caspase 3 zur Induktion von Apoptose in ischämischen Zellen (Okuno et al. 2004). Und tatsächlich wiesen sowohl TLR2 knockout Mäuse als auch Mäuse ohne funktionsfähigen TLR4 eine niedrigere Aktivität an Caspase 3 auf. In vitro spricht all dies für eine TLR-

vermittelte, JNK-abhängige Induktion neuronaler Apoptose durch metabolischen Stress, der er auch nach traumatischer Hirnschädigung auftritt.

Überraschenderweise ließ sich jedoch in Neuronen weder TLR2 mit Peptidoglycan noch TLR4 mit LPS aktivieren, während diese Liganden in Kulturen mit Astrozyten zu einer robusten Entzündungsreaktion führten. Die Liganden, die nach akuten Hirnschäden neuronale TLRs aktivieren, sind jedoch noch nicht hinreichend bekannt (Tang et al. 2007).

4.2.5 Mechanismen zur Induktion von Endotoxintoleranz durch TLRs

Beeson beschrieb 1946 erstmalig das Phänomen der Endotoxintoleranz als eine abgeschwächte Fieberentwicklung nach wiederholter Injektion von Typhus-Vakzin. Dennoch sind die molekularen Prozesse, die dieser Adaptation zugrunde liegen, noch immer Gegenstand aktueller Forschung. Da toll-like-Rezeptoren eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Mikroorganismen und Toxinen haben, liegt der Verdacht nahe, dass sie auch zur Induktion von Endotoxintoleranz beitragen. Weil die Toleranzinduktion durch TLR4 stimulierendes LPS am besten untersucht ist, sollen im folgenden einige grundsätzliche Mechanismen anhand dieses Modells aufgeführt werden. Studien über Veränderungen an Rezeptordichte, Proteinen der Signaltransduktion oder Zytokinen bei Auftreten von Endotoxintoleranz ergaben teilweise widersprüchliche Ergebnisse.

Poltorak et al. stimulierten Makrophagen (RAW 264.7) *in vitro* mit LPS und wiesen bei wiederholter Gabe eine vorübergehende Minderexpression von TLR4-mRNA nach (Poltorak et al. 1998). Eine weitere Arbeit von Matsuguchi et al. zeigte keine Veränderung der Expression von TLR4-mRNA trotz Überexpression von TLR2-mRNA nach wiederholter LPS-Stimulation von Mausmakrophagen (Matsuguchi et al. 2000). Menschliche periphere mononukleäre Blutzellen und polymorphkernige Zellen wiesen sogar eine Überexpression an TLR4-mRNA nach mehrmaliger LPS-Applikation auf (Muzio et al. 2000). Endotoxintoleranz kann also nicht einfach durch Minderexpression von Membranständigen Rezeptoren erklärt werden.

Medvedev et al. zeigten, dass LPS zu keiner verstärkten mRNA- oder Proteinexpression von MyD88 bzw. TRIF führt. Diese beiden Moleküle sind, wie weiter oben genauer dargestellt, zentrale Elemente in der frühen Signaltransduktion mehrerer TLRs. Dennoch besteht bei Reaplikation von LPS eine verminderte Affinität von MyD88 zu TLR4 (Medvedev et al. 2002). Auch der nächste Schritt in der Signaltransduktion, nämlich die Bindung von IRAK

durch MyD88, war nach wiederholter Stimulation mit LPS in menschlichen peripheren mononukleären Blutzellen abgeschwächt. Gleichzeitig war die Proteinexpression und die enzymatische Aktivität von IRAKs herabgesetzt, die mRNA-Expression von IRAKs jedoch erhöht (dib-Conquy and Cavaillon 2002).

Betrachtet man den weiteren Verlauf der Signaltransduktion von TLRs, so ergeben sich noch weitere mögliche Faktoren, die für die Toleranzentwicklung verantwortlich sein könnten. Makrophagen, die aus peritonealem Exsudat von Mäusen gewonnen wurden, wiesen nach Vorbehandlung mit LPS eine verminderte Aktivierung von MAP (mitogen activated protein) Kinasen auf (Kraatz et al. 1999). Zu dieser Familie gehören beispielsweise die Proteine JNK und p38, die wie oben dargestellt neurotoxisches Potential besitzen.

Wahlstrom et al. beobachteten in Mausmakrophagen während Toleranz erhöhte Spiegel an I κ B α , einem Protein, das die Translokation von NF κ B in den Zellkern hemmt, und schlossen daraus, dass Toleranzentwicklung auch auf einer veränderten Regulation von Transkriptionsfaktoren beruht (Wahlstrom et al. 1999). In der Tat lässt sich eine verminderte Aktivierung von NF κ B nach Restimulierung mit LPS in mehreren Zelllinien nachweisen (Goldring et al. 1998; Wahlstrom et al. 1999). Auch der Transkriptionsfaktor AP-1 bindet in LPS-toleranten RAW 264.7 Zellen schwächer an seine Zielgene (Medvedev et al. 2000). Konsequenz ist die Verminderte Produktion und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und neurotoxischer Faktoren.

Dass wir in unseren Versuchen mit CpG ODNs TLR9 stimuliert haben, basiert auf ähnlichen Studien wie den oben genannten. Yeo et al. stimulierten TLR9 in RAW 264.7 Zellen mit CpG-DNA und fanden eine ausgeprägte Minderaktivierung von AP-1 und NF κ B nach Replikation von CpG-DNA (Yeo et al. 2003).

Neben TLR4 und TLR9 besitzen auch TLR2 (Sato et al. 2000) und TLR5 (Mizel and Snipes 2002) die Fähigkeit zur Induktion von Toleranz nach Stimulation mit ihren spezifischen Liganden.

Ein weiteres Phänomen, nämlich die sogenannte Heterotoleranz, ist vermutlich bedingt durch die Ähnlichkeiten der Signalverarbeitung innerhalb der TLR-Familie. Dabei kommt es nach Toleranzinduktion zu einer verminderten Antwort durch einen von der ersten Stimulierung unterschiedlichen Liganden, der einen anderen TLR bindet. Beispielsweise zeigte sich eine verminderte Produktion von Zytokinen und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch LPS nach vorheriger Applikation von CpG DNA (Yeo et al. 2003), also Heterotoleranz zwischen TLR9 und TLR4. Das Phänomen der Heterotoleranz zeigt wiederum die Komplexität der TLR-vermittelten Prozesse. Nicht alle Kombinationen von TLRs können

Heterotoleranz induzieren, und die Resultate unterscheiden sich auch je nachdem ob in vitro oder in vivo gearbeitet wurde (Dalpke et al. 2005).

Von besonderer Bedeutung für unsere Arbeit ist die Tatsache, dass die Stimulierung von TLRs auch die Antwort auf akute Hirnschäden verändert. In Ischämie/Reperfusionen-Modellen an Ratten erzeugte die Präkonditionierung mit LPS einen protektiven Zustand sowohl in Zellen des Myokards (Rowland et al. 1997) als auch in Neuronen des ZNS (Tasaki et al. 1997). Neuere Daten belegen diese Protektion auch für TLR9. Stevens et al. zeigten für die Applikation von CpG ODNs eine dosis- und zeitpunktabhängige Neuroprotektion. Bei intraperitonealer Injektion von 20 µg gelöster CpG ODNs 72 Stunden vor Okklusion der Arteria cerebri media ergab sich eine signifikante Reduktion des Infarktolumens um ca. 60 % gegenüber der Plazebo-Gruppe (Stevens et al. 2008). Über die molekularen Prozesse, die diese Effekte beeinflussen, ist nur wenig bekannt. Eine wichtige Rolle scheint jedoch das proinflammatorische Zytokin TNF α zu spielen. TNF α wird von vielen toll-like-Rezeptor tragenden Zellen sowohl nach Stimulation mit LPS, als auch mit CpG ODNs exprimiert. In der oben genannten Studie von Tasaki und Kollegen war nach Applikation von LPS ein deutlicher Anstieg an TNF α zu registrieren, der mit Induktion von Toleranz gegenüber ischämischen Zellschäden verbunden war. Bei Ratten, die zusammen mit LPS gleichzeitig TNFbp (TNF binding protein), einen TNF α -Antagonisten, erhielten, war kein protektiver Effekt festzustellen (Tasaki et al. 1997). In einer weiteren Versuchsreihe verglichen Stevens et al. Wildtyp Mäuse mit TNF α knockout Mäusen. Beiden Gruppen wurden 72 Stunden vor Ischämie CpG ODNs verabreicht. Die TNF α knockout Tiere zeigten im Gegensatz zu den Wildtyp Tieren keine Reduktion des Infarktolumens. Die Präsenz von TNF α ist also auch für eine TLR9-abhängige Toleranzentwicklung nötig (Stevens et al. 2008).

4.3 Einfluss der TLRs auf die sekundäre Hirnschädigung nach experimentellem SHT

Das Immunsystem erfüllt wichtige Funktionen. Die Abwehr von Krankheitserregern oder die Einleitung von Reperaturvorgängen und Phagozytose funktionsloser oder beschädigter Zellen oder Moleküle. Kommt es jedoch zu einer überschießenden Aktivierung der Immunität, so kann diese zu einer Spirale von neurodegenerativen Prozessen führen. Zellen der Mikroglia produzieren eine Vielzahl von zelltoxischen Faktoren wie TNF α , IL-1, NO oder ROS, die nur in der richtigen Dosierung ihre physiologische Funktion erfüllen können. Einige Studien bewiesen, dass eine solche überdosierte Immunantwort bei akuter Schädigung des Gehirns für

die Ausweitung des ursprünglichen Schadens sorgt. Die Aktivierung der inflammatorischen Kaskade geschieht unter anderem über die Bindung von exogenen oder endogenen Molekülen durch toll-like Rezeptoren. Welche Rolle die TLRs bei diesen Ereignissen spielen, lässt sich effektiv mit knockout Mäusen erforschen. Bereits für die zerebrale Ischämie bewährten sich Modelle, in denen TLR2 oder TLR4 knockout Mäuse verwendet wurden (Hua et al. 2007; Lehnardt et al. 2007).

Für unsere Forschungen verwendeten wir sowohl TLR2/4 doppelknockout sowie TLR9 einzelknockout Mäuse. Außerdem interessierte uns, wie sich die Induktion von Endotoxintoleranz mittels TLR9-Agonisten auf neuronales Überleben nach SHT auswirkt. Als experimentelles Modell wählten wir ein bereits gut etabliertes Verfahren einer offenen, kontrollierten, kortikalen Schädigung. Damit untersuchten wir die Auswirkung der TLR-Defizienz bzw. der Toleranz auf wichtige inflammatorische Parameter, auf die Entwicklung eines Hirnödems sowie das Wachstum des Nekrosevolumens. Anhand dieser Daten lassen sich Schlüsse für die Bedeutung der toll-like Rezeptoren beim sekundären Wachstum der Nekrose nach Schädel-Hirn-Trauma ziehen.

4.3.1 Hirnödem

Traumatische Verletzungen des Gehirns führen häufig zu einem gesteigerten Wassergehalt des Hirngewebes. Dieses sogenannte Hirnödem lässt sich schon bald nach dem traumatischen Ereignis nachweisen und bildet sich hauptsächlich in den ersten 12 bis 48 Stunden aus. Lange Zeit wurde das posttraumatische Hirnödem als vor allem vasogen verursacht angesehen (Katayama et al. 1990). Dabei spielt nicht nur die mechanische Schädigung von Gefäßen eine wichtige Rolle. Auch die Arteriodilatation und Endothelschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können die Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigen und so ein vasogenes Hirnödem induzieren (Schilling and Wahl 1999). Die Produktion von NO durch NO-Synthasen scheint darüber hinaus an der Entstehung eines Hirnödems, beispielsweise durch Veränderung des Gefäßtonus, beteiligt zu sein (Hara et al. 1996). Wie bereits weiter oben dargestellt führt möglicherweise eine Immunaktivierung über toll-like Rezeptoren zur Bildung von ROS und NO und somit auch zu einem verstärkten Wassereinfluss ins Hirngewebe (Rosenblum 1983; Wei et al. 1985). Weitere Studien sprechen jedoch für ein Überwiegen des zytotoxischen oder zellulären Ödemtyps nach traumatischer Hirnverletzung. Ito et al. zeigten anhand von

magnetresonanztomographischen (MRT) Aufnahmen eine reduzierte Diffusion in Rattenhirnen nach experimentellem Trauma. Abnahme der Diffusion korreliert mit dem Auftreten eines zytotoxischen Ödems und lässt somit auf eine wichtige Rolle von zellulären Prozessen bei der Induktion des posttraumatischen Hirnödems schließen (Ito et al. 1996). Mechanismen, über die TLRs ein zytotoxisches Ödem fördern könnten, sind ebenfalls denkbar. ROS und NO schädigen Makromoleküle, die an der Energieerzeugung beteiligt sind, Lipidperoxidation schädigt die Zellmembran von Mitochondrien und beeinträchtigt somit direkt die Energieerzeugung. Die Bereitstellung von Radikalfängern wie Gluthation ist ebenfalls energieaufwendig. All dies trägt zur raschen Erschöpfung der ATP-Reserven der Hirnzellen bei und somit zu einem Erliegen der Na-K-ATPase. Die intrazelluläre Natriumakkumulation führt zur Zellschwellung und damit zum zytotoxischen Ödem. Unsere Versuche mit TLR9 knockout Mäusen unterstützen diese These. 24 Stunden nach Trauma lag der Gesamtwassergehalt bei den TLR9 knockout Tieren mit einem Wert von $79,70\% \pm 0,61\%$ signifikant unter dem der Vergleichsgruppe von $80,51\% \pm 0,39\%$. Ähnliche Ergebnisse erhielten Chen et al., die nach Simvastatin induzierter Suppression des TLR4 Signalweges, zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma, eine signifikante Ödemreduktion und geringere Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke sahen (Chen et al. 2009). Hua et al. erzeugten bei Mäusen Endotoxintoleranz mittels eines TLR2 Agonisten (PAM3CSK4) und verglichen diese Mäuse mit unbehandelten Tieren nach fokaler Ischämie und Reperfusion des Gehirns. Die präkonditionierten Tiere hatten einen signifikant erniedrigten Hirnwasseranteil und eine geringere Störung der Blut-Hirn-Schranke (Hua et al. 2008). TLRs sind also in der Lage das Hirnödem, sei es zytotoxisch oder vasogen, zu beeinflussen. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse, die wir für die TLR2/4 doppelknockout Tiere erhielten. Für diese Mäuse sahen wir keinen signifikanten Unterschied zu ihrer Vergleichsgruppe. Das Gesamtödem der TLR2/4 knockout Mäuse betrug $79,36\% \pm 0,66\%$, während das der Wildtyp Gruppe bei $79,78\% \pm 0,65\%$ lag.

Katayama et al. beschrieben nach experimenteller Kontusionsverletzung des Gehirns, basierend auf MRT-Studien, eine große Flüssigkeitsansammlung im zentralen Bereich der Nekrose, die einen beträchtlichen Beitrag zum in den ersten 24 Stunden auftretenden, ausgeprägten Ödem mit Masseneffekt leistete (Katayama et al. 1990). Treibende Kraft dieser Wasseransammlung ist eine rasche Erhöhung der Gewebsosmolalität, die durch metabolische Zwischenprodukte, die beispielsweise beim Abbau von Fetten und Proteinen, bei der Glykolyse oder der DNA-Fragmentierung entsteht. Diese Homogenisierung des nekrotischen Gewebes erzeugt eine Erhöhung der Osmolalität, die bereits 30 Minuten nach Auftreten des

schädigenden Ereignisses signifikante Werte erreicht (Kawamata et al. 2007). Dies ist ein Mechanismus zur Induktion eines Hirnödems, der vermutlich wenig durch TLRs und Immunprozesse beeinflusst wird und eine mögliche Erklärung dafür bietet, dass wir bei den TLR2/4 knockout Tieren keine signifikante Ödemreduktion registrieren konnten. Weshalb die Defizienz des TLR9 die posttraumatische Ödembildung reduziert und das Fehlen der TLRs 2 und 4 nicht, lässt sich jedoch nicht eindeutig beantworten. In der Theorie wären beide Genotypen in der Lage das Hirnödem zu beeinflussen. Dennoch gibt es klare Unterschiede in den Signalwegen der einzelnen toll-like Rezeptoren. Wie und ob diese Signalwege unterschiedliche Effekte auf die Entwicklung eines Hirnödems haben, lässt sich hier nicht beantworten.

Dass die vermehrte Extravasation von Flüssigkeit der Wildtyp Mäuse gegenüber den TLR9 knockout Mäusen zu einer Volumenvermehrung und größeren Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre führt, konnten wir mit unseren Studien nicht bestätigen. Die traumatisierten Hemisphären besaßen einen signifikant höheren Wasseranteil und gleichzeitig auch ein signifikant größeres Volumen. Deshalb schlossen wir, dass eine verminderte Ödembildung der TLR9 knockout Tiere auch eine verminderte Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre verursachen würde. Doch unsere Methode zur Bestimmung der Gehirnschwellung beinhaltet eindeutige Kritikpunkte. Auch, wenn das Trauma streng auf eine Hemisphäre beschränkt ist, erhöht sich der Wassergehalt der kontralateralen, nicht traumatisierten Hemisphäre. Dies geschieht beispielsweise über Flüssigkeitsverschiebung entlang von Nervenbahnen, die von einer Hemisphäre zur anderen führen. Definiert man nun die Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre als Differenz der beiden Hemisphären, so besteht die Gefahr, dass diese Schwellung als zu gering berechnet wird. Außerdem muss zur histomorphometrischen Auswertung der Gehirne das Gewebe tiefgefroren werden. Wie sich dieser Vorgang auf das Volumen der Gehirne auswirkt, die sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr im geschlossenen Schädel befinden, lässt sich nicht bestimmen. All diese Faktoren machen die histomorphometrische Auswertung der Hirnschwellung unsicher und verhindern einen verlässliche Rückschluss vom Gehirnwassergehalt auf das Gehirnvolumen zu treffen und umgekehrt.

4.3.2 Nekrosevolumen

Prinzipiell sind verschiedenste Mechanismen, die nach einer akuten Traumatisierung des Gehirns zum sekundären Nekrosewachstum beitragen, denkbar. Dabei könnte, wie im letzten Kapitel erläutert, die Entwicklung eines Hirnödems eine Rolle spielen.

Aber auch über Ödem-unabhängige Prozesse, wie die Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, sind TLRs in der Lage neuronales Überleben zu beeinflussen. Für einige Zytokine wie TNF α und IL-1 gibt es klare Hinweise auf ihr neurotoxisches Potential (Allan and Rothwell 2001; Rothwell and Strijbos 1995). Die molekularen Mechanismen, die dieser Zellschädigung zugrunde liegen, sind jedoch nicht geklärt. Der neuronale Überlebensvorteil von Tieren mit Defizienz des TLR2 oder TLR4 wurde bereits in Studien zu ischämischen Hirnschäden belegt (Hua et al. 2007; Lehnardt et al. 2007). Protektion gegen Ischämie bietet ebenfalls eine Toleranzinduktion über TLR9 durch CpG ODNs (Stevens et al. 2008). Und in Traumamodellen ergaben sich Hinweise darauf, dass TLRs auch hier Neurodegeneration vermitteln (Chen et al. 2009; Koedel et al. 2007).

Unsere Ergebnisse unterstreichen diese Ergebnisse und sprechen klar für die neurodegenerative Wirkung von TLR-vermittelten Prozessen nach traumatischer Hirnverletzung. Sowohl die TLR2/4 doppelknockout Mäuse als auch die TLR9 knockout Mäuse wiesen gegenüber ihren Vergleichsgruppen eine signifikante Reduktion des Nekrosewachstums um ca. ein Drittel auf. Und die Applikation von CpG ODNs 72 Stunden vor Trauma zeigte, in Analogie zu den Versuchen von Stevens et al., eine klare Toleranzinduktion mit positiver Wirkung auf neuronales Überleben nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. Mit einer relativen Reduktion des sekundären Nekrosewachstums um 38,6% fiel der neuroprotektive Effekt nach Applikation des TLR9 Agonisten sogar noch deutlicher aus als beim völligen Fehlen dieses TLRs. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet das weiter oben bereits angesprochene Phänomen der Heterotoleranz. Dabei kommt es nach Stimulierung des TLR9 auch zu Alterationen in den Signalwegen anderer TLRs. Möglicherweise bietet diese kombinierte Suppression mehrerer TLRs einen synergistischen Effekt, der die Produktion neurotoxischer Faktoren noch effektiver hemmt.

4.3.3 Schlussbetrachtung

Wie schon ausführlich dargestellt, lassen sich für toll-like Rezeptoren gegensätzliche Wirkungen bezüglich neuronalem Überleben demonstrieren. Einige Studien sahen positive Effekte durch Stimulierung von TLRs bezüglich Aufräum- und Regenerationsvorgängen nach Schädigung von Nervenzellen (Leon et al. 2000; Setzu et al. 2006; Vallieres et al. 2006). Die überwiegende Mehrheit der Studien sieht jedoch einen protektiven Effekt bei Minderaktivierung von TLR-Signalwegen. Dabei scheinen ischämische und traumatische Hirnverletzungen ähnliche Prozesse in Gang zu setzen, die in nicht unerheblichem Maße von TLRs abhängen. 72 Stunden nach Ischämie demonstrierten Lenhardt et al. eine Reduktion des Infarktolumens bei TLR2 knockout Mäusen um ca. 30% gegenüber der Vergleichsgruppe (Lenhardt et al. 2007). Toleranzinduktion durch TLR9 reduziert die Infarktgröße sogar um ca. 61% gegenüber der Vergleichsgruppe (Stevens et al. 2008). Nach kälteinduziertem Trauma lag das Nekrosevolumen von MyD88 knockout Mäusen 25% unter dem der Vergleichsgruppe (Koedel et al. 2007). Auch unsere Versuche bringen die Aktivierung von TLRs klar mit Zelluntergang in Verbindung. Die Art und Weise, wie durch Immunprozesse Zelltod vermittelt wird, bleibt jedoch nach wie vor unklar. Wahrscheinlich spielen reaktive Moleküle wie NO und ROS eine wichtige Rolle. Auch die fördernde Wirkung auf die Entwicklung eines Hirnödems könnte dabei beteiligt sein. Eine Schädigung könnte auch durch Leukozytenaktivierung oder inflammatorische Zytokine ausgelöst werden. Weitgehend unerforscht ist auch die Bedeutung der neuronalen TLRs. Sie scheinen nicht über die gleichen Liganden aktiviert zu werden wie beispielsweise die TLRs auf Migrogliazellen. Welche Moleküle jedoch neuronale TLRs aktivieren ist bis auf eine Ausnahme nicht bekannt. Neuronaler TLR8 wird durch Resiquimod stimuliert und führt dann zu einem verminderten Wachstum von Neuriten sowie zur Induktion von Apoptose (Ma et al. 2006). Gleichzeitig existieren Hinweise auf eine proapoptotische Wirkung von neuronalen TLRs unter metabolischen Stressbedingungen (Tang et al. 2007).

Die breite Expression von TLRs auf einer Vielzahl verschiedener Zelltypen im ZNS macht diese Rezeptoren zu einem potentiell wirkungsvollen Ziel für neuroprotektive Medikamente.

5. Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und konnten auf einem breiten Spektrum von Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden. Neben ihrer Funktion, körperfremde Organismen wahrzunehmen und eine Abwehrreaktion zu organisieren, binden TLRs auch endogene Moleküle. Diese körpereigenen Liganden stellen eine Art Warnsignal dar, da sie beispielsweise aus sterbenden Neuronen stammen und somit eine Störung der Gewebshomöostase anzeigen. Bei einer schweren traumatischen Verletzung des Gehirns wird das Gewebe mit immunaktivierenden Faktoren überflutet. Die darauf folgende robuste Immunantwort wird unter anderem über toll-like Rezeptoren vermittelt. Es existieren starke Hinweise, dass die Mediatoren, die im Verlauf dieser Immunprozesse synthetisiert und ausgeschüttet werden, neurotoxisch wirken. Dies wurde vor allem in experimentellen Ischämie-Modellen gezeigt. Ziel dieser Arbeit war es die Rolle der toll-like Rezeptoren für die Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach traumatischer Verletzung des Gehirns näher darzustellen.

Um die Bedeutung der TLRs für das sekundäre Wachstum der Nekrose zu untersuchen verwendeten wir TLR knockout Mäuse. Die von uns verwendeten Stämme waren TLR2/4 doppelknockout Mäuse sowie TLR9 einzelknockout Mäuse. Als Vergleichsgruppe dienten C57/Bl6 Mäuse, da diese den genetischen Hintergrund der knockout Mäuse darstellten. Für unsere Versuche zur Endotoxintoleranzinduktion benutzten wir ebenfalls C57/Bl6 Mäuse. Die Traumatisierung erfolgte mittels eines in unserer Arbeitsgruppe gut etablierten Controlled Cortical Impact Models. Zunächst verglichen wir bei den TLR2/4 knockout Tieren sowie den TLR9 knockout Tieren histomorphometrisch das Nekrosewachstum zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma mit ihren Vergleichsgruppen. Anschließend wurde ebenfalls 24 Stunden nach Trauma gravimetrisch der Hirnwassergehalt ermittelt. In einer weiteren Versuchreihe untersuchten wir nach Toleranzinduktion mit CpG ODNs, wie schon zuvor bei den knockout Mäusen das sekundäre Nekrosewachstum der toleranten Tiere gegenüber ihrer Kontrollgruppe.

Obwohl sich bei den TLR2/4 knockout Tieren kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ödemformation ergab ($p=0,2609$), zeigten diese Tiere ein signifikant kleineres Nekrosevolumen ($p<0,01$) als ihre Wildtyp Vergleichstiere. Für das Fehlen des TLR9 konnte

eine signifikante Reduktion der Ödementwicklung ($p < 0,05$) und auch eine Protektion gegen sekundäre Zellschäden demonstriert werden ($p < 0,01$)

Auch durch intraperitoneale Injektion des TLR9-Agonisten waren die Mäuse signifikant vor den Folgen des experimentellen Traumas geschützt. Das Nekrosewachstum lag in dieser Gruppe ca. 39% unter dem der Kontrollen ($p < 0,001$)

Wie schon von anderen Studien für ischämische und mit Einschränkungen auch für traumatische Hirnschädigung gezeigt, bestätigen unsere Ergebnisse das neurodegenerative Potential der toll-like Rezeptor vermittelten Immunaktivierung.

Diese Befunde verdeutlichen den wichtigen Einfluss der TLRs auf die pathologischen Prozesse, die nach einer traumatischen Hirnverletzung stattfinden, und zeigen somit das Potential der selektiven Hemmung dieser Rezeptoren für die Therapie des akuten Schädel-Hirn-Traumas.

Reference List

- Akira S and Takeda K. (2004). *Nat Rev Immunol*, **4**, 499-511.
- Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. (2006). *Cell*, **124**, 783-801.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P and Zychlinsky A. (1999). *Science*, **285**, 736-739.
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P and Zychlinsky A. (2000). *EMBO J*, **19**, 3325-3336.
- Allan SM and Rothwell NJ. (2001). *Nat Rev Neurosci*, **2**, 734-744.
- Amat JA, Ishiguro H, Nakamura K and Norton WT. (1996). *Glia*, **16**, 368-382.
- Anderson KV, Jurgens G and Nusslein-Volhard C. (1985). *Cell*, **42**, 779-789.
- Aoki N, Siegfried M and Lefer AM. (1989). *Am J Physiol*, **256**, H1509-H1512.
- Balabanov R, Goldman H, Murphy S, Pellizon G, Owen C, Rafols J and Dore-Duffy P. (2001). *Neurol Res*, **23**, 175-182.
- Bollyky PL, Bice JB, Sweet IR, Falk BA, Gebe JA, Clark AE, Gersuk VH, Aderem A, Hawn TR and Nepom GT. (2009). *PLoS One*, **4**, e5063.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P and Lipton SA. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7162-7166.
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL and Marriott I. (2003). *Glia*, **43**, 281-291.
- Brooke MS. (1965). *Nature*, **206**, 635-636.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D and van Noort JM. (2002). *J Neuropathol Exp Neurol*, **61**, 1013-1021.
- Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ and Miller SD. (2005). *Glia*, **49**, 360-374.
- Chen G, Zhang S, Shi J, Ai J, Qi M and Hang C. (2009). *Exp Neurol*, **216**, 398-406.
- Chen XR, Besson VC, Beziaud T, Plotkine M and Marchand-Leroux C. (2008). *J Pharmacol Exp Ther*, **326**, 966-974.
- Chen ZJ. (2005). *Nat Cell Biol*, **7**, 758-765.
- Crow JP and Beckman JS. (1996). *Adv Exp Med Biol*, **387**, 147-161.
- Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA and Kelliher MA. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 36560-36566.
- Dalpke AH, Lehner MD, Hartung T and Heeg K. (2005). *Immunology*, **116**, 203-212.

- Dalpke AH, Schafer MK, Frey M, Zimmermann S, Tebbe J, Weihe E and Heeg K. (2002). *J Immunol*, **168**, 4854-4863.
- del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR and Chang CM. (1991). *Stroke*, **22**, 1276-1283.
- dib-Conquy M and Cavaillon JM. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 27927-27934.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA and Hayes RL. (1991). *J Neurosci Methods*, **39**, 253-262.
- Dixon CE, Lighthall JW and Anderson TE. (1988). *J Neurotrauma*, **5**, 91-104.
- Ellis JA, Cross AR and Jones OT. (1989). *Biochem J*, **262**, 575-579.
- Epe B, Ballmaier D, Roussyn I, Briviba K and Sies H. (1996). *Nucleic Acids Res*, **24**, 4105-4110.
- Eriskat J, Schurer L, Kempfski O and Baethmann A. (1994). *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, **60**, 425-427.
- Esen N, Tanga FY, DeLeo JA and Kielian T. (2004). *J Neurochem*, **88**, 746-758.
- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S and del Zoppo GJ. (1994). *Am J Pathol*, **144**, 188-199.
- Gay NJ and Keith FJ. (1991). *Nature*, **351**, 355-356.
- Ghajar J. (2000). *Lancet*, **356**, 923-929.
- Gibson FC, III, Ukai T and Genco CA. (2008). *Front Biosci*, **13**, 2041-2059.
- Goldring CE, Reveneau S, Pinard D and Jeannin JF. (1998). *Eur J Immunol*, **28**, 2960-2970.
- Graham DI GTMT. (2002). eds. *Greenfield's Neuropathology, vol 1, 7th edn. London. Hodder Arnold*: pp. 823-898.
- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC and Moskowitz MA. (1996). *J Cereb Blood Flow Metab*, **16**, 605-611.
- Hashimoto C, Hudson KL and Anderson KV. (1988). *Cell*, **52**, 269-279.
- Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM and Weis JJ. (1999). *J Immunol*, **163**, 2382-2386.
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN and Weis JJ. (2000). *J Immunol*, **165**, 618-622.
- Honda K, Yanai H, Takaoka A and Taniguchi T. (2005). *Int Immunol*, **17**, 1367-1378.
- Hua F, Ma J, Ha T, Kelley J, Williams DL, Kao RL, Kalbfleisch JH, Browder IW and Li C. (2008). *J Neuroimmunol*, **199**, 75-82.
- Hua F, Ma J, Ha T, Xia Y, Kelley J, Williams DL, Kao RL, Browder IW, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH and Li C. (2007). *J Neuroimmunol*, **190**, 101-111.

- Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH and Lee JH. (1999). *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 917-922.
- Ito J, Marmarou A, Barzo P, Fatouros P and Corwin F. (1996). *J Neurosurg*, **84**, 97-103.
- Ito T, Wang YH and Liu YJ. (2005). *Springer Semin Immunopathol*, **26**, 221-229.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A and Antel JP. (2005). *J Immunol*, **175**, 4320-4330.
- Katayama Y, Tsubokawa T, Miyazaki S, Kawamata T and Yoshino A. (1990). *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, **51**, 308-310.
- Katsargyris A, Klonaris C, Alexandrou A, Giakoustidis AE, Vasileiou I and Theocharis S. (2009). *Expert Opin Ther Targets*, **13**, 427-442.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K and Akira S. (1999). *Immunity*, **11**, 115-122.
- Kawai T and Akira S. (2007b). *Semin Immunol*, **19**, 24-32.
- Kawai T and Akira S. (2007a). *Trends Mol Med*, **13**, 460-469.
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K and Akira S. (2001). *J Immunol*, **167**, 5887-5894.
- Kawamata T, Mori T, Sato S and Katayama Y. (2007). *Neurosurg Focus*, **22**, E5.
- Kielian T, Mayes P and Kielian M. (2002). *J Neuroimmunol*, **130**, 86-99.
- Knoblauch SM and Faden AI. (2002). *J Neurotrauma*, **19**, 1039-1050.
- Koedel U, Merbt UM, Schmidt C, Angele B, Popp B, Wagner H, Pfister HW and Kirschning CJ. (2007). *Am J Pathol*, **171**, 200-213.
- Kraatz J, Clair L, Rodriguez JL and West MA. (1999). *J Surg Res*, **83**, 158-164.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ and Vartanian T. (2002). *J Neurosci*, **22**, 2478-2486.
- Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, Krueger C, Nitsch R, Meisel A and Weber JR. (2007). *J Neuroimmunol*, **190**, 28-33.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM and Hoffmann JA. (1996). *Cell*, **86**, 973-983.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N and Benowitz LI. (2000). *J Neurosci*, **20**, 4615-4626.
- Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F and Zaloga C. (1995). *J Cereb Blood Flow Metab*, **15**, 389-397.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR and Golenbock DT. (2000). *J Clin Invest*, **105**, 497-504.

- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD and Golenbock DT. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 33419-33425.
- Ma Y, Li J, Chiu I, Wang Y, Sloane JA, Lu J, Kosaras B, Sidman RL, Volpe JJ and Vartanian T. (2006). *J Cell Biol*, **175**, 209-215.
- Maas AI, Steyerberg EW, Murray GD, Bullock R, Baethmann A, Marshall LF and Teasdale GM. (1999). *Neurosurgery*, **44**, 1286-1298.
- MacNaul KL and Hutchinson NI. (1993). *Biochem Biophys Res Commun*, **196**, 1330-1334.
- Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T and Yoshikai Y. (2000). *J Immunol*, **165**, 5767-5772.
- Matzinger P. (1994). *Annu Rev Immunol*, **12**, 991-1045.
- Medvedev AE, Kopydlowski KM and Vogel SN. (2000). *J Immunol*, **164**, 5564-5574.
- Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, Golenbock DT and Vogel SN. (2002). *J Immunol*, **169**, 5209-5216.
- Medzhitov R and Janeway C, Jr. (2000b). *N Engl J Med*, **343**, 338-344.
- Medzhitov R and Janeway C, Jr. (2000a). *Immunol Rev*, **173**, 89-97.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway CA, Jr. (1997). *Nature*, **388**, 394-397.
- Mishra BB, Mishra PK and Teale JM. (2006). *J Neuroimmunol*, **181**, 46-56.
- Miyake K. (2007). *Semin Immunol*, **19**, 3-10.
- Mizel SB and Snipes JA. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 22414-22420.
- Muizelaar JP, Wei EP, Kontos HA and Becker DP. (1983). *J Neurosurg*, **59**, 822-828.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't VC, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P and Mantovani A. (2000). *J Immunol*, **164**, 5998-6004.
- Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, Bullock MR, Choi SC, Clifton GL, Contant CF, Coplin WM, Dietrich WD, Ghajar J, Grady SM, Grossman RG, Hall ED, Heetderks W, Hovda DA, Jallo J, Katz RL, Knoller N, Kochanek PM, Maas AI, Majde J, Marion DW, Marmarou A, Marshall LF, McIntosh TK, Miller E, Mohberg N, Muizelaar JP, Pitts LH, Quinn P, Riesenfeld G, Robertson CS, Strauss KI, Teasdale G, Temkin N, Tuma R, Wade C, Walker MD, Weinrich M, Whyte J, Wilberger J, Young AB and Yurkewicz L. (2002). *J Neurotrauma*, **19**, 503-557.
- Neter E. (1969). *Curr Top Microbiol Immunol*, **47**, 82-124.
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS and Tannenbaum SR. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3030-3034.
- Okuno S, Saito A, Hayashi T and Chan PH. (2004). *J Neurosci*, **24**, 7879-7887.
- Olson JK and Miller SD. (2004). *J Immunol*, **173**, 3916-3924.

- Owens T, Babcock AA, Millward JM and Toft-Hansen H. (2005). *Brain Res Brain Res Rev*, **48**, 178-184.
- Park C, Cho IH, Kim D, Jo EK, Choi SY, Oh SB, Park K, Kim JS and Lee SJ. (2008). *Neurosci Lett*, **431**, 123-128.
- Piantadosi CA and Zhang J. (1996). *Stroke*, **27**, 327-331.
- Polderman KH, van de KG, Dixon JM, Vandertop WP and Girbes AR. (2003). *Crit Care Med*, **31**, 584-590.
- Polinder S, Meerding WJ, van Baar ME, Toet H, Mulder S and van Beeck EF. (2005). *J Trauma*, **59**, 1283-1290.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B and Beutler B. (1998). *Science*, **282**, 2085-2088.
- Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G and Sies H. (2000). *Glia*, **32**, 51-59.
- Pourcyrous M, Leffler CW, Bada HS, Korones SB and Busija DW. (1993). *Pediatr Res*, **34**, 366-369.
- Radi R, Rodriguez M, Castro L and Telleri R. (1994). *Arch Biochem Biophys*, **308**, 89-95.
- Rasley A, Anguita J and Marriott I. (2002). *J Neuroimmunol*, **130**, 22-31.
- Relton JK and Rothwell NJ. (1992). *Brain Res Bull*, **29**, 243-246.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA and Bazan JF. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 588-593.
- Rosenblum WI. (1983). *Am J Physiol*, **245**, H139-H142.
- Rothwell NJ and Strijbos PJ. (1995). *Int J Dev Neurosci*, **13**, 179-185.
- Rowland RT, Meng X, Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Harken AH and Brown JM. (1997). *Am J Physiol*, **272**, H2708-H2715.
- Rudehill A, Bellander BM, Weitzberg E, Bredbacka S, Backheden M and Gordon E. (2002). *J Neurotrauma*, **19**, 855-868.
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K and Akira S. (2000). *J Immunol*, **165**, 7096-7101.
- Schilling L and Wahl M. (1999). *Adv Exp Med Biol*, **474**, 123-141.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M and Kirschning CJ. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 17406-17409.
- Setzu A, Lathia JD, Zhao C, Wells K, Rao MS, Ffrench-Constant C and Franklin RJ. (2006). *Glia*, **54**, 297-303.

- Sharma S, Tenover BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R and Hiscott J. (2003). *Science*, **300**, 1148-1151.
- Sorescu D and Griendling KK. (2002). *Congest Heart Fail*, **8**, 132-140.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG and Jones JD. (1995). *Science*, **268**, 661-667.
- Stevens SL, Ciesielski TM, Marsh BJ, Yang T, Homen DS, Boule JL, Lessov NS, Simon RP and Stenzel-Poore MP. (2008). *J Cereb Blood Flow Metab*, **28**, 1040-1047.
- Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F and Kraus J. (2006). *Acta Neurochir (Wien)*, **148**, 255-268.
- Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE and Testa JR. (1996). *Genomics*, **32**, 486-488.
- Takeda K and Akira S. (2007). *Curr Protoc Immunol*, **Chapter 14**, Unit.
- Takeda K, Kaisho T and Akira S. (2003). *Annu Rev Immunol*, **21**, 335-376.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S and Mattson MP. (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13798-13803.
- Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H and Hallenbeck JM. (1997). *Brain Res*, **748**, 267-270.
- Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J and Zavala F. (1993). *J Neuroimmunol*, **42**, 177-185.
- Teismann P and Ferger B. (2001). *Synapse*, **39**, 167-174.
- Toulmond S and Rothwell NJ. (1995). *Brain Res*, **671**, 261-266.
- Vallejo JG. (2011). *Clin Sci (Lond)*, **121**, 1-10.
- Vallieres N, Berard JL, David S and Lacroix S. (2006). *Glia*, **53**, 103-113.
- Wagner H. (2006). *Adv Immunol*, **91**, 159-173.
- Wahlstrom K, Bellingham J, Rodriguez JL and West MA. (1999). *Shock*, **11**, 242-247.
- Wang T, Qin L, Liu B, Liu Y, Wilson B, Eling TE, Langenbach R, Taniura S and Hong JS. (2004). *J Neurochem*, **88**, 939-947.
- Wei EP, Christman CW, Kontos HA and Povlishock JT. (1985). *Am J Physiol*, **248**, H157-H162.
- Whalen MJ, Carlos TM, Dixon CE, Schiding JK, Clark RS, Baum E, Yan HQ, Marion DW and Kochanek PM. (1999). *J Neurotrauma*, **16**, 299-309.
- Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, Mahmood A, Zhou D and Chopp M. (2008). *J Neurotrauma*, **25**, 130-139.
- Yeo SJ, Yoon JG, Hong SC and Yi AK. (2003). *J Immunol*, **170**, 1052-1061.

Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M and Arditi M. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 7611-7614.

Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, Hoffmann O, Rohr C, Prinz V, König J, Lehrach H, Nietfeld W and Trendelenburg G. (2007). *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 574-579.

Zweckberger K, Stoffel M, Baethmann A and Plesnila N. (2003a). *J Neurotrauma*, **20**, 1307-1314.