

Aus dem
Department für Anatomie Tübingen
Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik

**Altersabhängige Veränderungen im Plexus choroideus
des Gehirns**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Deffner, Felix Johannes

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Beschorner

Tag der Disputation: 02.12.2022

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Tabellenverzeichnis.....	IV
II. Abbildungsverzeichnis	IV
III. Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Anatomie des Plexus choroideus.....	1
1.2 Funktionen des Plexus choroideus	5
1.2.1 Bildung der Blut-Liquor-Schranke (BLS)	5
1.2.2 Sekretion des Liquor cerebrospinalis.....	5
1.2.3 Metabolische Funktion und Sekretion von Proteinen.....	6
1.2.4 Beitrag zur Immunschranke zum ZNS und Abwehr von Erregern.	7
1.3 Entwicklung, Proliferation und Altern	7
1.4 Transportproteine und Rezeptoren	9
1.4.1 Aquaporine	9
1.4.1.1 <i>AQP1</i>	9
1.4.1.2 <i>AQP4</i>	10
1.4.2 Weitere Transportproteine	10
1.4.3 ACE2- und TMPRSS2-Rezeptor	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Mäuse	13
2.1.2 Körperspender.....	13
2.1.3 Puffer und Chemikalien für die Immunhistochemie.....	14
2.1.4 Antikörper für die Immunhistochemie	15
2.1.5 Kits für die Molekularbiologie	16
2.1.6 Puffer und Chemikalien für die Molekularbiologie.....	16
2.1.7 TaqMan®-Sonden.....	17

2.1.8	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.9	RNase-freies Präparationsbesteck	18
2.1.10	Geräte	18
2.1.11	Software.....	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Organentnahme und Präparation	20
2.2.1.1	<i>Präparation der Maus</i>	20
2.2.1.2	<i>Präparation der Körperspender</i>	21
2.2.2	Histologische Methoden.....	22
2.2.2.1	<i>Fixierung</i>	22
2.2.2.2	<i>Einbettung</i>	22
2.2.2.3	<i>Kryostatschnitte</i>	22
2.2.2.4	<i>Immunfluoreszenzmarkierung</i>	23
2.2.2.5	<i>Mikroskopische Analyse der Immunfluoreszenzmarkierung</i> 23	
2.2.3	Molekulare Methoden.....	24
2.2.3.1	<i>Homogenisierung</i>	24
2.2.3.2	<i>RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA</i>	24
2.2.3.3	<i>Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)</i>	25
2.2.3.4	<i>RT-qPCR Datenevaluation</i>	26
2.2.3.5	<i>Kapillarelektrophorese</i>	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Immunhistochemische Lokalisation	28
3.1.1	Aquaporine	28
3.1.1.1	<i>Mensch</i>	28
3.1.1.2	<i>Maus</i>	34
3.1.2	NKCC1.....	36
3.1.3	Na ⁺ /K ⁺ - ATPase.....	37
3.1.4	Proliferationsmarker (KI-67, PCNA).....	38
3.1.4.1	<i>Mensch</i>	38

3.1.4.2	<i>Maus</i>	40
3.1.5	ACE2 und TMPRSS2.....	41
3.2	Molekularbiologische Analyse des Plexus choroideus.....	45
3.2.1	Human	45
3.2.1.1	RT-qPCR.....	45
3.2.1.2	Kapillarelektrophorese	46
3.2.2	Maus	47
3.2.2.1	RT-qPCR.....	47
3.2.2.2	Kapillarelektrophorese	48
4	Diskussion	50
4.1	AQP4 im Plexus choroideus.....	50
4.2	Verwertbarkeit der humanen qPCR-Daten.....	51
4.3	Abhängigkeit der RNA-Integrität auf die RT-qPCR	52
4.4	Prozess des Alterns.....	52
4.5	Unterschiede der AQP4-Expression zwischen Mensch und Maus.....	53
4.6	AQP4-Expression als Kompensationsmechanismus	54
4.7	Übertragung der ependymalen und astrozytären Funktion von AQP4 auf den PC.....	55
4.8	Einfluss auf den „glymphatic pathway“	56
4.9	Proliferation post mortem im Epithel des Plexus choroideus.....	57
4.10	Neuroinvasion von SARS-CoV2	58
4.11	Schlussfolgerung	59
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Erklärung zum Eigenanteil	70
8	Veröffentlichungen	72
9	Danksagung	73

I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Körperspender.....	14
Tabelle 2: Primäre Antikörper	15
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper	16
Tabelle 4: Humane TaqMan®-Sonden.....	17
Tabelle 5: Murine TaqMan®-Sonden.....	17
Tabelle 6: qPCR Körperspender.....	25
Tabelle 7: qPCR Maus	25
Tabelle 8: Zyklusparameter für qPCR	26

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Intracerebrale Lokalisation des humanen PCs.....	2
Abbildung 2: Schematischer histologischer Aufbau des PCs.....	4
Abbildung 3: Übersichtsaufnahme des humanen PCs und Ependyms.....	29
Abbildung 4: Hochauflösende Vergrößerung mit DIC einer PC-Zotte	30
Abbildung 5: Humane PC-Zotte im lateralen Ventrikel.....	31
Abbildung 6: Verteilungsmuster von AQP1 und AQP4 im humanen PC ...	34
Abbildung 7: Muriner PC im Seitenventrikel.....	35
Abbildung 8: Immunfärbung für AQP1 (rot), AQP4 (grün) und NKCC1 (gelb)	36
Abbildung 9: Immunfärbung für AQP1 (rot), AQP4 (grün) und Na/K-ATPase (gelb)	38
Abbildung 10: Proliferierende Zellen im Epithel des Plexus choroideus ..	40
Abbildung 11: Proliferation in der subependymalen Zone in der Maus	40
Abbildung 12: Expression von ACE2 und TMPRSS2 im humanen PC	42
Abbildung 13: Unterschiedliche Expression von ACE2 im humanen PC ..	43
Abbildung 14: Expression von ACE2 und TMPRSS2 an der Taenia choroidea.....	44
Abbildung 15: Genexpressionsanalyse für AQP1, AQP4 und NKCC1 im Plexus choroideus.....	45

Abbildung 16: Genexpressionsanalyse für AQP1, AQP4 und NKCC1 im Striatum	46
Abbildung 17: Gelbild der humanen RT-PCR-Produkte.....	47
Abbildung 18: Quantitative RT-PCR-Analyse für AQP4 bei der Maus	48
Abbildung 19: Gelbild der murinen RT-PCR-Produkte.....	49
Abbildung 20: Grafische Darstellung der Hypothesen	56

III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
AQP	Aquaporin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
Bp	Basenpaare
cLSM	confokale Laser-Scan-Mikroskopie
COVID-19	Coronavirus disease 2019
Cq	Quantification cycle
CSF	Cerebrospinal fluid
Ct	Threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differential interference contrast
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H ₂ O	Wasser
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
miRNA	microRNA
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
OPK	orthogonale Partikelkomplexe
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PC	Plexus choroideus
PFA	Paraformaldehyd (Fixierlösung)
PMI	post mortem Intervall
RIS	RNA Integrity Score
rpm	Umdrehungen pro Minu
RT-PCR	Real-Time PCR
SARS-CoV2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SEM	Standard Error of the Mean
TJ	Tight Junction
ZNS	Zentrales Nervensystem
µm	Mikrometer

1 Einleitung

Im Gehirn sind Parenchym, Blut und Liquor durch verschiedene Barrieren voneinander abgegrenzt. Diese Barrieren dienen der Aufrechterhaltung eines Milieus, welches essentiell für die Funktion und das Zusammenspiel der einzelnen Kompartimente ist (1). Neben der Blut-Hirn-Schranke gehört hierzu auch die Blut-Liquor-Schranke (BLS), die sich in eine äußere und innere BLS gliedert. Die äußere BLS wird von Zellen der Arachnoidea mater gebildet, welche den Subarachnoidalraum begrenzen. Die innere BLS setzt sich aus Zellen des Plexus choroideus (PC) zusammen (2). Der PC ist maßgeblich an der Produktion und Sekretion des Liquor cerebrospinalis beteiligt und bildet aufgrund seiner Lokalisation und seines anatomischen Aufbaus eine Grenze im Gehirn zwischen Blut und Liquor (3). Zusätzlich werden ihm Funktionen im Bereich der Homöostase, Metabolisation und Neuroregulation zugeschrieben (4). Für die Aufrechterhaltung dieser zentralen Aufgaben bedarf es einer Vielzahl an Schranken- und Transportproteinen.

1.1 Anatomie des Plexus choroideus

Die *Plexus choroidei* (PC) befinden sich beim Menschen und bei der Maus in jedem der vier Hirnventrikel. Sie setzen sich aus einer *Lamina epithelialis* (*Plexusepithel*) und einer *Lamina propria* (*Lamina propria* und *Lamina epithelialis* bilden zusammen die *Tela choroidea*), die mit den Blutgefäßen ins Innere des Gehirns einzieht, zusammen. Die Aufhängung und Befestigung der Plexus an der *Pia mater* wird *Taenia choroidea* genannt. Der PC besitzt zur Ventrikelseite hin eine durch Falten und Zotten vergrößerte Oberfläche. In den beiden Seitenventrikel erstreckt sich der PC vom *Unternhorn* und der *Pars centralis* bis zum *Foramen interventriculare*, bei dem er in den PC des III. Ventrikels übergeht (**Abb. 1**) und von dessen Dach in den Ventrikel hineinragt. Der PC des IV. Ventrikels befindet sich ventral des *Cerebellums* in der Rautengrube. Als *Bochdalek-Blumenkorbchen* werden Teile des PCs

bezeichnet, die im Bereich der *Aperturae laterales* in den *Subarachnoidalraum* hineinragen (5).

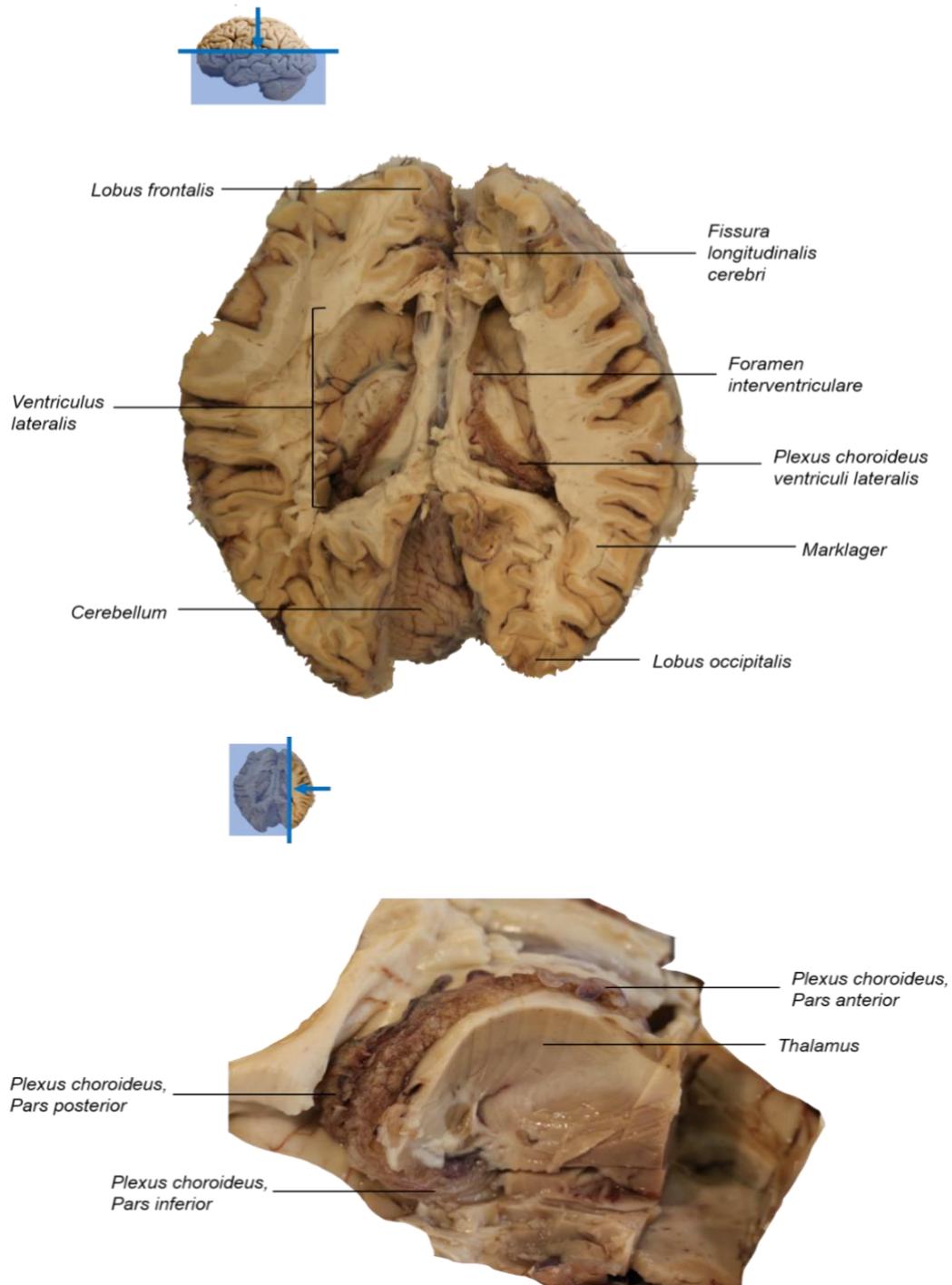


Abbildung 1: Intracerebrale Lokalisation des humanen PCs

Humanes Gehirn fixiert mit Formalin.

Oben: Horizontalschnitt mit Blick von oben auf die eröffneten Seitenventrikel.

Unten: Blick von lateral auf den eröffneten rechten Seitenventrikel.

Mikroskopisch besteht der PC aus einem einschichtigen, isoprismatischen Epithel (**Abb. 2**, übernommen aus (6)). Die Plexusepithelzellen liegen basolateral einer Basalmembran auf und besitzen apikal Mikrovilli. Sie bilden dichte Zellkontakte aus Tight Junctions (TJ) und besitzen apikal sowie basolateral zahlreiche Transportproteine und Ionenkanäle. Stellenweise sind sie mit Kinozilien ausgestattet und an der ventrikulären Oberfläche befinden sich Makrophagen, die als Kolmerzellen oder Epiplexuszellen bezeichnet werden (5). Reife Plexusepithelzellen weisen eine hohe Dichte (bis zu 15 % des Zellvolumens) an Mitochondrien auf (7). Das Bindegewebe unterhalb der Basalmembran besteht aus vielen Kollagenfasern und ist sehr vaskularisiert. Die Kapillaren in der *Tela choroidea* enthalten ein fenestriertes Endothel mit kontinuierlicher Basallamina im Gegensatz zu Gehirnkapillaren mit dichtem Endothel (3). Im Bereich der *Taenia choroidea* geht das Epithel des PCs direkt in Ependym über (5). Die Ependymzellen sind mit *Gap junctions* und undichten Tight Junctions miteinander verbunden. Sie stellen somit keinen dichten Verbund zwischen Gehirnparenchym und Liquor dar (8).

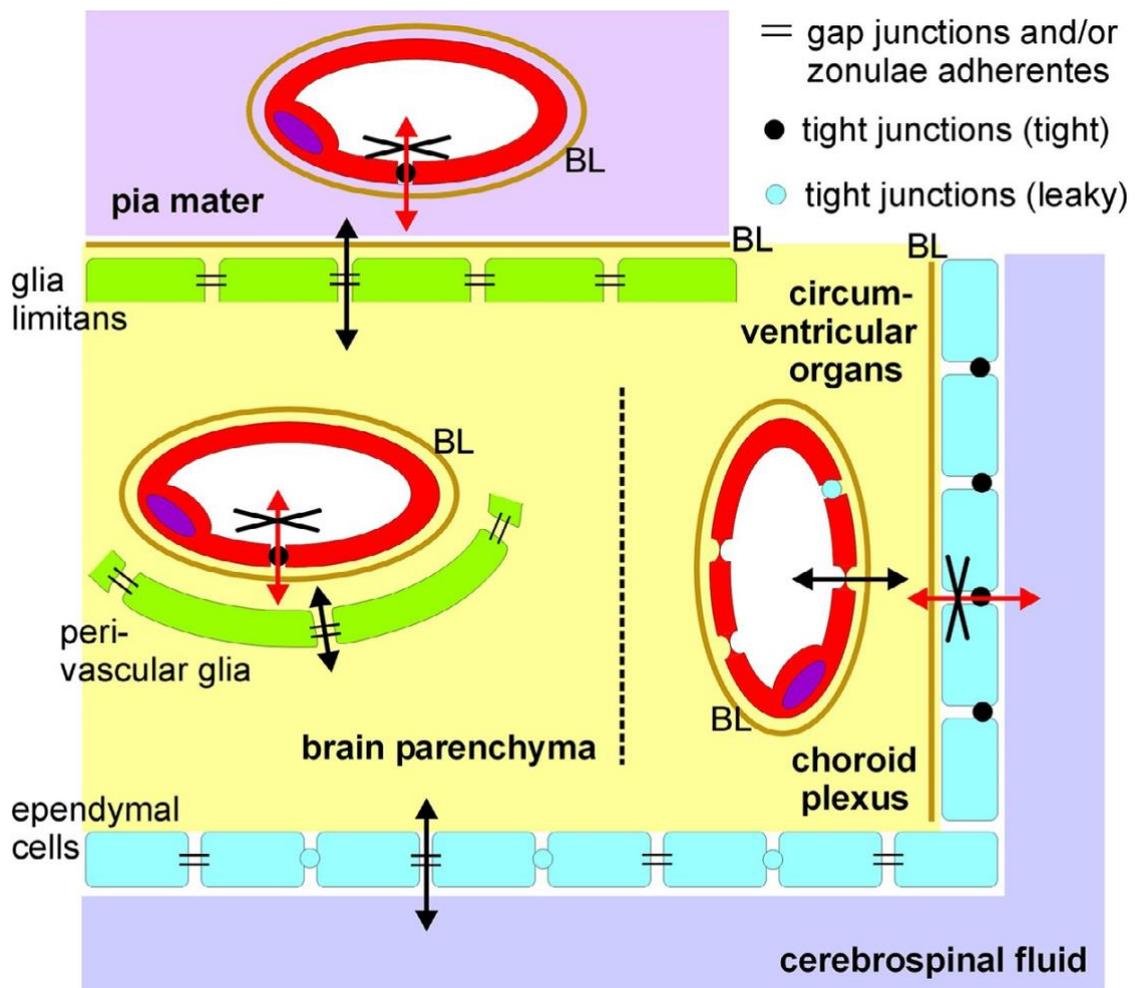


Abbildung 2: Schematischer histologischer Aufbau des PCs

Abbildung übernommen aus *Ependymal Cells* (Wolburg et al., 2015). Schematische Darstellung der an die Ventrikel angrenzenden Gewebe. Das Epithel des PCs besitzt undurchlässige Tight Junctions und eine Basallamina und geht fließend in das Ependym mit durchlässigen Tight Junctions über. Die Blutgefäße im Gehirn werden von Endfüßen der Astrozyten umgeben und sind nicht durchlässig. Im Gegensatz dazu sind die Blutgefäße in den zirkumventrikulären Organen wie der PC durchlässig.

Bei Mäusen zeigt sich der PC des Seitenventrikels als dünnes, wellenförmiges Häutchen, während hingegen der PC des IV. Ventrikels gelappter und größer erscheint. Der PC im III. Ventrikel befindet sich größtmäßig zwischen diesen beiden Plexus (9).

1.2 Funktionen des Plexus choroideus

Dem PC werden folgende essenzielle Funktionen zugeordnet:

- Bildung der Blut-Liquor-Schranke
- Sekretion des Liquor cerebrospinalis
- Metabolische Funktion und Sekretion von Proteinen (5)
- Beitrag zur Immunschranke zum ZNS und Abwehr von Erregern

1.2.1 Bildung der Blut-Liquor-Schranke (BLS)

Der PC stellt eine Grenze zwischen dem Blut und Liquor dar, welche im Vergleich zur Blut-Hirn-Schranke (BHS) weniger Dichtigkeit aufweist (10). Diese innere BLS besteht aus den Plexusepithelzellen, der Basallamina des PCs, der Basallamina der Blutgefäße im Stroma des PCs und dem fenestrierten Endothel dieser Gefäße. Die Plexusepithelzellen sind untereinander mit *Zonulae occludentes (Tight Junctions)* verbunden und bilden somit eine kaum für parazellulären Transport durchlässige Grenze zwischen Blut und Liquor (5). Die Basallamina und Tight Junctions sind Zeichen für ein sehr stark polarisiertes Epithel (11). Während Blut und Liquor durch die BLS getrennt werden, ist der Liquor in den Hirnventrikeln vom Gehirnparenchym und von der interstitiellen Hirnflüssigkeit durch die Ependymzellen, die Pia mater und die *Glia limitans superficialis* abgeschieden (12).

1.2.2 Sekretion des Liquor cerebrospinalis

Der PC ist für ~70% der Liquorproduktion verantwortlich (13). Der Liquor cerebrospinalis umfasst ca. 150 ml und wird 3-4 Mal am Tag erneuert, sodass von einer Liquorproduktion von ca. 500-600ml ausgegangen werden kann (14). Der restliche extrachoroidale Anteil des Liquors entsteht von einem Austausch zwischen Gehirnkapillaren und interstitieller Flüssigkeit (15, 16). Der genaue Mechanismus für die Liquorproduktion ist bis heute nicht vollständig geklärt und es existieren verschiedene Hypothesen (17, 18). Na^+ , Cl^- und HCO_3^- werden über den basalen Pol der Zelle ins Zytoplasma transportiert (19). Ein $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter und eine Na^+/K^+ -ATPase, die beide apikal lokalisiert sind (20),

sorgen für einen starken osmotischen Gradienten. Unterstützt wird dies durch einen ebenfalls apikal gelegenen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Cotransporter, der zusätzlich K^+ und Cl^- aus der Zelle nach luminal schleust (21). Diesem Gradienten folgt ein Wasserfluss (22), welcher vorwiegend über den Wasserkanal AQP1 stattfindet (21). Man geht davon aus, dass die erhöhte Mitochondriendichte in den Plexusepithelzellen dabei die Energieversorgung der Zelle und damit die Sicherstellung der Liquorproduktion gewährleistet (23). Der Liquor fließt von den Seitenventrikeln über den dritten Ventrikel und das *Aquaeductus mesencephali* in den vierten Ventrikel, von wo aus er die inneren Liquorräume über die *Apertura mediana* und die *Aperturales laterales* verlässt und in den Subarachnoidalraum gelangt. Die Resorption erfolgt über die *Granulationes arachnoideae* in die venösen Sinus und über Hirnnerven. Wahrscheinlich sind vor kurzem beschriebene Lymphgefäße innerhalb der Meningen ebenfalls in der Resorption von Liquor beteiligt (24). Insgesamt sorgt der Liquor durch die Zirkulation über die inneren und äußeren Liquorräume für eine Auftriebsfunktion des Gehirns und damit auch zu dessen Schutz vor Erschütterungen (20).

1.2.3 Metabolische Funktion und Sekretion von Proteinen

Der Liquor sorgt für einen Abtransport von katabolischen Abfallprodukten, die bei Metabolisierung im Gehirn und synaptischer Aktivität anfallen. Er unterstützt die Kommunikation innerhalb des ZNS, indem er Hormone und Wachstumsfaktoren in unterschiedliche Regionen des Gehirns transportiert (25, 26). Es wird davon ausgegangen, dass der PC am Eisentransport ins Gehirn mitbeteiligt ist, da er Proteine wie Ferritin und den divalenten Metalltransporter 1 enthält sowie Transferrin-Rezeptoren an seiner Oberfläche aufweist (27, 28). Des Weiteren exprimiert er eine Fülle an Rezeptoren für Hormone wie Prolactin (29), Vasopressin (30), Leptin (31) und Corticotropin-Releasing-Hormon (32). Außerdem ist er für die Sekretion von mehreren Wachstumsfaktoren verantwortlich wie beispielsweise Insulin-like growth factor II (33), Vascular endothelial growth factor (34) oder Fibroblast growth factor 2 (35). Somit ist der PC weitaus mehr als lediglich Produktionsstätte des Liquors, sondern er ist auch an der Wasser- und Ionenhomöostase des gesamten Gehirns beteiligt (3).

1.2.4 Beitrag zur Immunschranke zum ZNS und Abwehr von Erregern

Als weitere, bisher nur wenig untersuchte Funktionen des PC stellen sich dessen Rolle bei der Immunschranke zum ZNS (36) und bei der Abwehr von Erregern dar (37). Apikal auf den PC Epithelzellen werden Zelladhäsionsmoleküle exprimiert, die in Zusammenhang mit der Migration von Immunzellen stehen. So konnte nachweislich die Migration von TH-Zellen (TH17) über den PC in das ZNS gezeigt werden (38, 39). Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Des Weiteren ist der PC als Teil der Blut-Liquor-Schranke mitverantwortlich für das Abwehren von möglichen krankheitsauslösenden Pathogenen, die über den Liquor in das ZNS gelangen könnten (40). Dennoch können bestimmte Erreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten dieses Abwehrsystem umgehen und letztendlich eine Krankheit verursachen (41) wie z.B. *Toxoplasma gondii* die cerebrale Toxoplasmose (42). Die während dieser Arbeit aufkommende Coronapandemie führte zur Untersuchung der für den Zelleintritt des SARS-CoV2-Virus benötigten Rezeptoren (siehe Kapitel „ACE2 und TMPRSS2“) am PC.

1.3 Entwicklung, Proliferation und Altern

Der PC setzt sich aus Anteilen zusammen, die sowohl vom Ektoderm als auch vom Mesoderm hervorgehen. Das Epithel des PCs stammt embryologisch wie das Ependym von multipotenten Stammzellen des ZNS ab, dem sogenannten Neuroepithel. Dagegen entsteht das Stroma aus mesenchymalen Zellen (43). Der PC entwickelt sich entlang der dorsalen Achse des Neuralrohrs in Richtung der späteren Hirnventrikel (44). In den Bereichen, in denen das Neuralrohr nicht zu einer mehrschichtigen Wand gewachsen ist, sprießen Blutgefäße in das Venrikellumen hinein. Diese Blutgefäße ziehen Pia mater-Gewebe, von dem sie umgeben sind und welches sich zur bindegewebigen *Tela choroidea* differenziert, mit sich. Sie formen sich zu einem komplexen Gefäßbündel; bedeckt von neuroektodermalem Epithel, das ursprünglich aus Ependymzellen

bestand (3). Als erstes erscheint der PC im vierten Ventrikel, gefolgt von den Seitenventrikeln und zuletzt im dritten Ventrikel. Bei der Maus startet diese Entwicklung am 11. Tag nach der Befruchtung (45), beim Menschen in der 9. Gestationswoche. Die Entwicklung des humanen PCs lässt sich anhand der Histologie in vier Stufen einteilen. In der ersten Stufe sind die Epithelzellen groß und pseudostratifiziert mit zentralem Nukleus und enthalten kein Glykogen. In der zweiten Stufe zeigen sie sich als säulenförmig mit apikalem Nukleus und reichlich Glykogen. Die dritte Stufe zeichnet sich durch kubische Zellen mit zentralem oder apikalem Nukleus und gemäßigtem Glykogengehalt aus. Die letzte Stufe enthält kubische oder schuppenförmige Zellen mit zentralem oder basalem Nukleus ohne Glykogen (46).

Im ausgewachsenen Gehirn verringert sich die Proliferationsrate im PC drastisch, da ausgereifte Plexusepithelzellen als postmitotisch angesehen werden (47). Während Plexusepithelzellen von embryonischen Stammzellen die Fähigkeit zeigten, sich in den PC eines Wirts zu integrieren (48), wiesen postnatale Plexusepithelzellen wenig bis keine Proliferation auf (49). Beim Menschen zeigte sich Proliferation im Plexuspapillom, einem gutartigen Tumor des PCs (50). Bei in Kultur genommene postnatale Plexusepithelzellen von Mäusen konnte Proliferation durch extrinsische Signale wie Kratzverletzungen und Gabe von IGF-1 und EGF hervorgerufen werden (51).

Es zeigte sich, dass der PC im gealterten Gehirn zahlreichen morphologischen Veränderungen ausgesetzt ist. Dazu zählen verminderte Liquorproduktion, generelle Zellatrophie wie verminderte Länge von Mikrovilli und erhöhte Permeabilität (52). Bei neurodegenerativen Erkrankungen können Veränderungen ebenfalls eine Rolle spielen. So zeigte sich bei Morbus Alzheimer eine erhöhte β -Amyloid-Akkumulation im PC (53) oder bei der Multiplen Sklerose der Eintritt von Immunzellen über den PC in das Gehirn (54). Lokal finden sich im humanen PC sogenannte Psammom-Körperchen im Bindegewebe des PCs, die sich als perlenartige, verkalkte Strukturen darstellen (55).

1.4 Transportproteine und Rezeptoren

1.4.1 Aquaporine

Wasser kann nur bis zu einem begrenzten Ausmaß durch die Membran von Zellen diffundieren. Aquaporine können eine deutlich größere Anzahl an Wassermolekülen entlang einem osmotischen und hydrostatischen Gradienten durch Diffusion passieren lassen (56). Bisher sind insgesamt 13 Aquaporine bekannt, die sich in klassische Aquaporine, unorthodoxe Aquaporine und Aquaglyceroporine einteilen lassen. Zu den klassischen AQPs zählen AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 und 8. AQP 3, 7 und 9 sind Aquaglyceroproteine und AQP11 und 12 werden als unorthodoxe AQPs bezeichnet. Die klassischen AQPs lassen lediglich Wassermoleküle passieren mit Ausnahme von AQP6 (durchlässig für Anionen) und AQP8 (durchlässig für Harnstoff). Aquaglyceroproteine sind zusätzlich zu Wasser für kleine Moleküle (Glycerin, Harnstoff, Ammonium) permeabel. Die unorthodoxen Aquaporine sind heterogener und weniger charakterisiert was ihre Permeabilität betrifft (57, 58). Sie setzen sich aus 6 transmembranären Untereinheiten (Helices) zusammen. Der Amino- und Carboxylterminus befindet sich jeweils auf der intrazellulären Seite (59). Die Helices sind mit Loops untereinander verbunden, von denen Loop B (zwischen zweiter und dritter Helix) und Loop E (zwischen fünfter und sechster Helix) in die Membran hineinragen (60, 61). Diese sogenannten „half-pore helices“ enthalten eine Asparagin-Prolin-Alanin Verbindung, welche die Kanalpore definieren und die Selektivität des Kanals bestimmen (61, 62).

1.4.1.1 AQP1

AQP1 kommt in vielen Bereichen des Körpers vor. Es wird sehr stark auf den meisten mikrovaskulären Endothelien exprimiert wie beispielsweise Herz- oder Skelettmuskulatur. Auf den Endothelien der Gefäße im ZNS wird es dagegen nicht exprimiert (63). Die Plexusepithelzellen exprimieren AQP1 vor allem auf der apikalen Membran, jedoch in geringerer Häufigkeit auch basolateral (21, 64). AQP1 spielt eine wesentliche Rolle in der Produktion von Liquor. Es konnte gezeigt werden, dass bei AQP1 Knock-out Mäusen die Liquorproduktion um

25% verringert war und die Plexusepithelzellen 80% weniger permeabel für H₂O waren (65).

1.4.1.2 AQP4

AQP4 findet sich intracerebral vor allem in den perivaskulären Endfüßen von Astrozyten und in Ependymzellen (66). In Astrozyten wird dieser Wasserkanal entlang des Kaliumkanals Kir4.1 exprimiert, sodass bei neurogener Aktivität eine verantwortliche Rolle in der Wasser- und Kaliumhomöostase vermutet wird (67). Ultrastrukturell bilden mehrere AQP4-Wasserkanäle sogenannte orthogonale Partikelkomplexe (OPKs), welche elektronenmikroskopisch in Gefrierbrüchen identifiziert wurden (68). Diese OPKs konnten im Rattengehirn in hoher Dichte in Ependymzellen nachgewiesen werden, während sie im PC komplett fehlten. In deutlich geringerer Dichte ließen sie sich in Übergangsbereichen zwischen Ependym und PC identifizieren (69).

1.4.2 Weitere Transportproteine

Die Na⁺/K⁺-ATPase ist ein in der Zellmembran verankertes Transportprotein, welches unter der Hydrolyse von ATP drei Na⁺-Moleküle im Austausch für zwei K⁺-Moleküle aus der Zelle schleust und auf diese Weise einen elektrochemischen Gradienten für weitere Transportsysteme aufbaut. Bei Gabe eines Herzglykosids (Ouabain), welches zur luminalen Plexusoberfläche in die Ventrikel verabreicht wurde, zeigte sich eine deutliche Reduktion von 50% im Na⁺-Transport und der Liquorsekretion (70, 71). Dies impliziert eine apikale Lokalisation dieses Transporters im Epithel des PCs im Gegensatz zur basolateralen Lage in den meisten anderen Transportepithelien (72).

NKCC1 entstammt der Solute Carrier Family und sorgt für einen Transport von 1 Na⁺, 1 K⁺ und 2 Cl⁻ über die Plasmamembran von Zellen. NKCC1 befindet sich im PC in der apikalen Membran im Unterschied zur ansonsten typischen basolateralen Lage in Zellen (21). Die Transportrichtung und damit Funktion von NKCC1 in den Plexusepithelzellen ist unklar. Normalerweise ist NKCC1 ein einwärts gerichteter Kanal und transportiert Na⁺ und Cl⁻ entlang ihrem Gradienten in eine Zelle hinein (73). Jedoch zeigte die Inhibition dieses

Transporters bei Gabe von Bumetanid eine Abnahme von ~50% der Liquorsekretion (74). Dagegen wiederum deutet eine weitere Studie über isolierte PC Zellen daraufhin, dass durch den Einstrom von NKCC1 in die Zellen das für die Liquorsekretion benötigte Zellwasservolumen aufrechterhalten wird (75).

1.4.3 ACE2- und TMPRSS2-Rezeptor

Im Zuge der Verbreitung der COVID-19 Pandemie seit November 2019, welche durch das severe acute respiratory syndrome corona virus 2 (SARS-CoV2) verursacht wurde, fallen bei Blick auf die epidemiologischen Daten Auffälligkeiten bei der Altersverteilung auf. So erleiden Menschen älteren Lebensalters (≥ 60 Jahre), basierend auf Daten zur ersten COVID-19 Welle in Deutschland, gehäuft schwere Verläufe, werden intensivpflichtig oder versterben mit oder an COVID-19 (76). Außerdem zeigten sich bei etwa 30% aller an COVID-19 erkrankten Personen neurologische Symptome wie Anosmie, Dysgeusie, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Neuralgie, Desorientierung, epileptische Anfälle, pyramidale Zeichen, Übelkeit oder Erbrechen (77-79). Durch das Binden des Spike-Protein (S-Protein) an ACE2 und das Priming der S-Proteine mithilfe der Serin Protease TMPRSS2 gelangt SARS-CoV2 in das Innere der Zelle (80). Die bisherigen Proteinexpressionen dieser Rezeptoren finden sich meist auf Epithelien, insbesondere auf Enterozyten des Dünndarms, alveolären Epithelzellen der Lunge, vaskulären Endothelzellen, proximalen Tubuluszellen und glomerulärem Epithel in der Niere (79, 81).

In bisherigen Arbeiten konnte bei Patienten mit neurologischen Symptomen gezeigt werden, dass sowohl Coronaviren selbst in den Liquor gelangen konnten (82) als auch dass die RNA von SARS-CoV2 im Liquor nachgewiesen werden konnte (83). Jedoch ist bisher wenig bekannt, wie diese Viren in den Liquorraum gelangen. Meist steht hierbei der Weg über die BHS im Vordergrund (82), jedoch führt die Route aus der anatomischen Perspektive über die BLS in den zirkumventrikulären Organen und damit auch im Bereich des PC (79). Durch diese strukturellen Überlegungen sowie der Tatsache, dass COVID-19 vor allem in älteren Personen stark symptomatisch wird, wurden diese zwei Rezeptoren mit in dieser Arbeit herangezogen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Erste Vorarbeiten zeigten Aquaporin-4 positive Zellen im Plexusepithel von humanen Körperspendern, welche sonst nur auf Ventrikel auskleidenden Ependymzellen vorkommen. Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass alternde Plexusepithelzellen ein Expressionsmuster aufzeigen, welches dem der Ependymzellen entspricht. Da die erwartenden Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit der Blut-Liquor-Schranke stehen, wurden weitere Transportproteine und Rezeptoren, die auf den vorherigen Seiten beleuchtet wurden, mit hinzugezogen. Im Rahmen dieser Studie sollen diese verschiedenen Proteine auf zellulärer Ebene mittels konfokaler Laserscan Mikroskopie und auf molekularer Ebene mittels quantitativer RT-PCR untersucht werden. Hierfür stehen uns Gewebeproben von Körperspendern aus dem Anatomischen Institut Tübingen zur Verfügung. Die Untersuchungen an humanem Material gestalten sich sowohl aufgrund von ethischen Leitlinien als auch wegen mangelnder Umsetzbarkeit von kontrollierten Studienbedingungen als schwierig. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu den humanen Proben ein Mausmodell hinzugezogen, welches anhand von verschiedenen Alterskohorten eine durchgängige, objektivierbare Untersuchung zulässt. Ziel dieser Studie soll es sein, altersabhängige Veränderungen im PC aufzudecken und Erklärungsansätze für damit in Zusammenhang stehende Veränderungen der Liquorproduktion zu geben. Im Hintergrund steht hierbei das Problem der Ergebnisübertragung von der Maus zum Menschen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

C57BL/6 Mäuse (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) wurden in einer hauseigenen Tierhaltung des Instituts für Klinische Anatomie und Zellanalytik gehalten. Freier Zugang zu Futter und Wasser sowie weißes zyklisches Licht wurde während der gesamten Zeit gewährleistet. Die Organentnahme erfolgte anhand der vor Beginn der Experimente festgelegten Alterskohorten. Für die Histologie wurden die Mäuse in ein Stadium „jung“ (2-12 Monate) und ein Stadium „alt“ (20-30 Monate) eingeteilt, bei der molekularen Biologie wurden die Mäuse in 3 Alterskohorten (2 Monate, 12 Monate, 30 Monate) eingeteilt. Die Haltung der Tiere wurde entsprechend der Leitlinien der Universität Tübingen durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß §4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes vom 18. Februar 2019 für die Experimente von Dr. rer. nat. Peter Neckel. Die Organe (Gehirne) der dabei getöteten Mäuse wurden uns überlassen. Die hierfür benötigte Mitteilung (AT 01/19 M) mit dem Titel „Charakterisierung von neuronalen Progenitor- und Stammzellen des enterischen Nervensystems“ wurde am 18.02.16 vom Regierungspräsidium Tübingen unterzeichnet (84).

2.1.2 Körperspender

Die durchgeführten Handlungen erfolgen nach §42 Abs. 1-4 des Bestattungsgesetzes des Landes Baden-Württemberg vom 21. Juli 1970. Nach dem Tod des Körperspender wird dieser so schnell wie möglich in das Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik in Tübingen gebracht. Hier findet unmittelbar die Gewebeentnahme statt. In einer zu Lebzeiten schriftlichen Vereinbarung erklärt sich der Körperspender dazu bereit, seinen Körper für medizinische und medizintechnische Wissenschaft zur Verfügung zu stellen. Hierbei können Körper, Körperteile, Gewebe oder Zellen wissenschaftlich

untersucht werden. Der Name des Körperspenders wird durch eine Nummer ersetzt, um eine stetige Pseudonymisierung zu gewährleisten. Dieses Vorgehen wurde am 18.10.2010 von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen unter der Projektnummer 237/2007BO1 genehmigt (84). In Tabelle 1 sind die untersuchten Körperspender mit weiteren Informationen gelistet.

Tabelle 1: Körperspender

Nummer	Alter	Geschlecht	post-mortem Zeit in Stunden	Molekularbiologie	Todesursache*
H38	85	m	11	x	Nierenversagen
H65	83	w	15	x	Lungenkarzinom
H70	89	m	12	x	Nierenversagen
H74	91	w	19	x	Exsikkose, GI- Blutung
H75	93	m	11	Ja (Nr. 1)	Pneumonie
H77	75	w	8	Ja (Nr. 2)	Schlaganfall
H78	74	w	9	Ja (Nr. 3)	Multiorganversagen
H84	94	w	11	x	Herzstillstand

*Todesursache übernommen aus der ärztlichen Todesbescheinigung

2.1.3 Puffer und Chemikalien für die Immunhistochemie

PBS – Phosphatgepufferte Salzlösung:

In 1 Liter destilliertem Wasser werden 7g NaCl (VWR International, Darmstadt, Deutschland), 2,86g Na₂HPO₄ x 2H₂O (Merck Chemicals, Darmstadt) und 0,4g KH₂PO₄ (Merck Chemicals) gelöst. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

PFA 4%ige Paraformaldehydlösung (Fixierlösung):

4g Paraformaldehyd (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) wird bei 60°C in 0,1

I PBS eingerührt. Nach dem Abkühlen wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung filtriert.

Eindeckelmedium – MOWIOL® 4-88:

Wird nach Anleitung des Herstellers (Merck Chemicals) mit Glycerol und TRIS-Puffer angesetzt.

30% Saccharose-Lösung:

30g Saccharose (AppliChem) werden in 100ml 1x PBS gelöst.

Präinkubationslösung/Blockierungspuffer:

4% NGS, 1% BSA, 0,25% Triton, 0,1% NaN₃ in 1x PBS

Fettstift: DAKO Pen (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark)

Immersionsöl: Immersol™ 518F (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)

2.1.4 Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Wirt	Verdünnung
AQP1	Santa Cruz Biotechnology, USA	Maus	1:100
AQP1	Thermo Fisher Scientific, USA	Kaninchen	1:100
AQP4	Santa Cruz Biotechnology, USA	Kaninchen	1:100
PCNA	Sigma-Aldrich, St. Louis, CA, USA	Maus	1:500
KI-67	DCS, Hamburg, Deutschland	Kaninchen	1:400
NKCC1	Abcam, Cambridge, England	Kaninchen	1:100
NA/K-ATPase	Hybridoma Bank, Iowa, USA	Maus	1:100
Laminin	Abcam, Cambridge, England	Kaninchen	1:50
ACE2	Abcam, Cambridge, England	Kaninchen	1:100
TMPRSS2	Abcam, Cambridge, England	Kaninchen	1:500

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Wirt	Verdünnung
Anti-mouse Alexa 488	Invitrogen, CA, USA	Ziege	1:400
Anti-mouse Alexa 546	Invitrogen, CA, USA	Ziege	1:400
Anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen, CA, USA	Ziege	1:400
Anti-rabbit Alexa 546	Invitrogen, CA, USA	Ziege	1:400

2.1.5 Kits für die Molekularbiologie

PerfeCTa qPCR ToughMix (Quantabio, Beverly, MA, USA)

Precellys® Lysing Kit CK28-R, hard tissue homogenizing (VWR International, Radnor, PA, USA)

QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAxcel RNA Quality Control Kit v2.0 (Qiagen)

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)

Qubit™ ssDNA Assay Kit (Life Technologies von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen)

TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

2.1.6 Puffer und Chemikalien für die Molekularbiologie

Natriumhypochlorid (1%):

Wird aus 12%igem Natriumhypochlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durch Verdünnung hergestellt.

DEPC-Wasser:

1ml Diethylpyrocarbonat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wird mit 1l demineralisiertem, nicht keimfreiem Wasser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe,

Deutschland) über Nacht mittels Magnetprüher vermischt und anschließend bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland)

2.1.7 TaqMan®-Sonden

Die Sonden wurden aus dem TaqMan® Gene Expression Assay von Applied Biosystems der Firma Thermo Fisher verwendet. Sie sind jeweils gegen humane und murine cDNA-Abschnitte spezifisch.

Tabelle 4: Humane TaqMan®-Sonden

Name	Gen-Name	Assay-Nummer	Amplicon-Länge (bp)
Hypoxanthinphosphoribosyltransferase	HPRT	Hs02800695_m1	82
TATA-Box bindendes Protein	TBP	Hs00427620_m1	91
Ubiquitin C	UBC	Hs00824723_m1	71
Aquaporin 1	AQP1	Hs01028916_m1	96
Aquaporin 4	AQP4	Hs00242342_m1	92
Solute Carrier Family 12 Member 2	NKCC1	Hs00169032_m1	97

Tabelle 5: Murine TaqMan®-Sonden

Name	Gen-Name	Assay-Nummer	Amplicon-Länge (bp)
Hypoxanthinphosphoribosyltransferase	HPRT	Mm00446968_m1	65
TATA-Box bindendes Protein	TBP	Mm01277045_m1	138
Ubiquitin C	UBC	Mm01201237_m1	92
Aquaporin 1	AQP1	Mm01326466_m1	94
Aquaporin 4	AQP4	Mm00802131_m1	69

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser: Glasdicke 0,13-0,17 mm (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland)

Mikroreaktionsgefäß: Eppendorf Tubes®: 2 ml Safe Lock und 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Mikrotiterplatten: PCR Consumables 0,2ml 96 Well Semi-Skirted (VWR International, Radnor, PA, USA)

Objektträger: SuperFrost® Plus (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland)

Petrischale: Cellstar® (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)

Skalpelle: Bruno Baya GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Spitzen: TipOne (STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.1.9 RNase-freies Präparationsbesteck

Präparationsbesteck wurde bei 180°C für 3 Stunden gebacken. Bei notwendiger Reinigung während der Präparation wurde Ethanol und RNase-freies DEPC-Wasser verwendet.

2.1.10 Geräte

Binokularlupe: Leica 125M (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)

Fluorometer: Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Homogenisator: Minilys personal homogenizer (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich)

Konvokales Mikroskop: LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Kryotom: Leica CM3050 S (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)

Pipette: ErgoOne (STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland)

Real-Time PCR Thermocycler: Applied Biosystems Step One™ (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, CA, USA)

RNA/DNA-Messung: QIAxcel Advanced System (Qiagen, Hilden, Deutschland)

RNA-Isolation: QIAcube (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Thermoblock: Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Thermocycler: peqSTAR 96X Universal Gradient (VWR International, Radnor, PA, USA)

Vortexmischer: Vortex Genie® 2™ (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)

Zentrifuge: Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

2.1.11 Software

Bildbearbeitung: Adobe Photoshop CS2 (Adobe Inc., Mountain View, CA, USA)

Datenauswertung: Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmon, WA, USA)

cLSM: Aufnahme durch Zen black 2009

Bearbeitung durch Zen blue 2012 (beide Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)

RT-qPCR: StepOne™ Software v2.3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

RT-qPCR Datenevaluation: qbase + (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien)

Kapillarelektrophorese: QIAxcel ScreenGel Software (Qiagen)

Statistik: GraphPad Prism 6.07 (GraphPadSoftware, San Diego, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Organentnahme und Präparation

Alle nachfolgend beschriebenen Präparationsschritte wurden mit RNase-freiem Präparationsbesteck durchgeführt. Die Arbeitsfläche wurde zuerst mit Ethanol, dann mit 1%iger Natriumhypochlorid-Lösung gesäubert und anschließend mit DEPC-Wasser abgewischt. Bei dem PBS-Puffer handelte es sich um einen in DEPC-Wasser gelösten RNase-freien Puffer. Bei der Präparation für die Molekularbiologie wurde jeweils nach der Überführung des Gehirns in PBS und Eröffnung der Ventrikel das Besteck gewechselt.

2.2.1.1 Präparation der Maus

Die Maus wurde mittels CO₂ bis zur Bewusstlosigkeit narkotisiert und durch einen Genickbruch getötet. Die Dekapitation erfolgte mit Hilfe einer Schere auf Höhe der Halswirbelsäule. Das Fell des Kopfes wurde mit Ethanol bespritzt und bis zur Schnauze nach vorne über den Kopf gezogen. Unter einer Binokularlupe wurde die Nacken- und Kopfmuskulatur entfernt und der Schädel median-sagittal vom *Foramen magnum* bis auf Höhe des *Bulbus oculi* mit einer Schere aufgeschnitten. Mittels einer Pinzette wurde dann die Schädeldecke aufgebrochen und das Gehirn freigelegt. Es folgte die Durchtrennung der *Medulla oblongata* sowie das Abtrennen der einzelnen Hirnnerven. Das Gehirn als Ganzes wurde dann in eine Petrischale mit PBS-Puffer überführt.

Mit einer feinen Schere wurde das *Cerebellum* abgetrennt und das Gehirn in seine beiden Hemisphären geteilt. Für die Histologie wurden die Seitenventrikel von dorsal-kränial und der IV. Ventrikel von ventral mit einer kleinen Schere eröffnet. Für die Proben der Molekularbiologie wurden die Seitenventrikel mit einer feinen Schere von dorsal-kränial und der IV. Ventrikel von dorsal-kaudal eröffnet. Der PC wurde aufgesucht und von umliegendem Gewebe befreit, sodass dieser möglichst frei zum Vorschein kam. Zuletzt wurde dieser dann jeweils an seiner Aufhängung abgeschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass lediglich Gewebe des PC entnommen wurde. Leider lässt sich jedoch keine saubere CP Epithelpräparation durchführen ohne dass umliegendes Gewebe mitentnommen wird. Aus diesem Grund wurde Parenchym aus dem Striatum

als Vergleichsgewebe für humane und murine Gehirne verwendet. Für jede einzelne Maus wurde der PC aus dem rechten und linken Ventrikel als Probe zusammengeführt. Zusätzlich wurde der PC aus dem vierten Ventrikel als einzelnen Probe erfasst, sodass zwei PC Proben von jeder Maus erhalten wurden. Korrespondierend zu jeder Maus wurde das Parenchym aus dem Bereich des *Striatums* mit einer feinen Schere herausgeschnitten.

2.2.1.2 Präparation der Körperspender

Das Gewebe der Körperspender wurde 8-19 Stunden *post mortem* präpariert. Der Körperspender lag hierbei auf dem Rücken, der Kopf wurde auf einen Kasten gelegt. Zu Beginn wurden die Kopfhaare des Körperspenders mit einem Rasierapparat entfernt. Dann wurde mit dem Skalpell auf Höhe der *Sutura coronalis* ein coronarer Schnitt bis zum Ansatz der Ohren auf beiden Seiten gesetzt. Das Gewebe wurde bis auf den Schädelknochen durchtrennt und die Haut mitsamt dem Unterhautfettgewebe und der Muskulatur vom Schädel nach dorsal bis zum unteren Ende des *Os occipitale* abgezogen. Der Schädelknochen wurde mit einer Säge bis zur Dura mater eröffnet und entfernt. Die *Medulla oblongata* und die Hirnnerven wurden mit einem Skalpell durchtrennt und das gesamte Gehirn wurde aus der Kalotte entnommen.

Für die Präparation des PC im Seitenventrikel wurde das *Corpus callosum*, das *Septum pellucidum* und der *Fornix* von kranial mit einem Skalpell durchtrennt und der III. Ventrikel von oben eröffnet. Es wurde der PC im III. Ventrikel aufgesucht und entlang diesem durch das *Foramen interventriculare* in den Seitenventrikel präpariert. Im Seitenventrikel wurde der PC am Ansatz abgetrennt und in eine mit PBS gefüllte Petrischale gegeben. Unter der Binokularlupe erfolgte die weitere Feinpräparation. Für die Histologie wurden Stücke der Länge 1-2 cm abgeschnitten, für die molekulare Biologie wurden Stücke der Größe 5 mm x 5 mm präpariert. Um den PC im IV. Ventrikel zu präparieren, wurde kaudal des Cerebellums auf Höhe der *Apertura mediana ventriculi quarti* der Ventrikel eröffnet und der PC ebenfalls an seiner Aufhängung abgetrennt. Die Feinpräparation erfolgte wie beim PC des Seitenventrikels. Für die Gewinnung von humanem Parenchym wurde jeweils

korrespondierend zu jedem Individuum aus dem Bereich des *Striatums* Gewebe mit einer Schere herausgeschnitten.

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Fixierung

Präparationsmaterial wurde direkt nach Entnahme in Schraubdeckelgläser, gefüllt mit PFA, gegeben und für 30 Minuten auf einen Kleinschüttler (200 rpm) gestellt. Danach wurden diese über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, am nächsten Tag in 30% Sucrose überführt und für weitere 30 Minuten auf einen Kleinschüttler (200 rpm) gestellt. In 30%iger Sucrose wurden die Proben für 1-2 Tage im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt, um anschließend eingefroren zu werden.

2.2.2.2 Einbettung

Das Präparationsmaterial wurde in TissueTek unter einem Binokular mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und ausgerichtet. Mithilfe eines Holzquaders wurden Aluminiumförmchen gefaltet und bis zur Hälfte mit TissueTek gefüllt. Isopentan wurde in einen Metallbecher gefüllt und dieser in eine Schale, die flüssigen Stickstoff enthält, gestellt. Das Präparationsmaterial wurde in die Aluminiumförmchen gegeben und diese mithilfe einer Pinzette kontinuierlich für 1-2 Sekunden in den Becher mit Isopentan getaucht. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das TissueTek vollständig durchgefroren ist. Direkt im Anschluss wurden die eingefrorenen Proben in der Gefriertruhe bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2.3 Kryostatschnitte

Kryostatschnitte wurden an dem Kryomikrotom Leica CM3050 S angefertigt. Es wurden 18 µm dicke Schnitte hergestellt und auf SuperFrost® Plus Objektträger gebracht. Auf jeden Objektträger wurden je nach Größe der Proben 1-2 Schnitte aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann in der Gefriertruhe bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.4 Immunfluoreszenzmarkierung

Die Objektträger mit den Schnitten wurden 1 Stunde lang bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einem Dako Pen (Fettstift) umkreist. Dann wurde 1x 10 min mit PBS zur Renaturierung gespült. Präinkubationslösung (Blockierungspuffer) wurde für 90 Minuten aufgetragen und die Schnitte danach mit der Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Diese Lösung bestand aus der Präinkubationslösung und der jeweiligen verdünnten Konzentration an Primärantikörper. Sie wurde für einige Sekunden gevortext und für 30 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen der Primärantikörperlösung wurde 3x 10 min mit PBS gewaschen und danach die Sekundärantikörper hinzugegeben. Diese wurden ebenfalls in Präinkubationslösung verdünnt, kurz gevortext und bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach 90 min Inkubation mit den Sekundärantikörpern, wurde 3x 10 min mit PBS gewaschen und danach für 10 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt, für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und dann im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Für jede Färbung wurde eine Negativ-Kontrolle ohne Primärantikörper durchgeführt und für die Analyse mit verwendet.

2.2.2.5 Mikroskopische Analyse der Immunfluoreszenzmarkierung

Die Kryostatschnitte wurden an einem Laser-Scan-Mikroskop 510 Meta von Zeiss analysiert. Dieses war ausgestattet mit einem Argon-Laser LGK 7812 ML4 (Carl Zeiss AG) der Wellenlänge 488 nm und zwei HeliumNeon-Laser LGK 7786 P (Carl Zeiss AG) mit einer Wellenlänge von jeweils 543 nm und 633 nm und dem dazugehörigen Filterset. Für die Aufnahmen wurde das Plan-APOCHROMAT 40x/1.3 oil DIC Objektiv (Carl Zeiss AG) verwendet. Alternativ wurden die Aufnahmen an einem Axio Imager Z1 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG) mit einem Apotome-Modul erstellt. Die Bildaufnahme wurde durch die Software Black and Blue Zen aquiriert. Die Bildbearbeitung und Zusammenstellung der Plates erfolgte mit Adobe Photoshop CS2.

2.2.3 Molekulare Methoden

2.2.3.1 Homogenisierung

Präparationsmaterial wurde direkt nach Entnahme in ein mit 900µl QIAzol® Lysis Reagent befülltes Precellys® Lysing Kit gegeben und auf Eis gestellt. Dieses wurde für 10 Sekunden bei 3000rpm in einem Minilys-System homogenisiert. Bei unvollständiger Homogenisierung wurde dieser Vorgang nach 5 Minuten Kühlung auf Eis wiederholt. Die homogenisierten Proben wurden bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.2.3.2 RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA

Das gesammelte Gewebe in dem mit QIAzol® Lysis Reagent befüllten Tube wurde 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl gDNA-Eliminator, wurde das Homogenat in einen MaXtract High Density Tube überführt und 200 µl Chloroform hinzugefügt. Bei 12.000 rpm und 4 °C wurde für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml Safe-Lock) pipettiert und im QIAcube® automatisiert die RNA isoliert. Hierbei wurde das RNeasy® Plus Universal Mini Kit verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt.

Um sowohl die RNA-Integrität also auch RNA-Konzentration zu bestimmen, wurde das QIAxcel Advanced System verwendet. Bei den murinen Proben wurden lediglich RIS-Werte (*RNA integrity score*) von mindestens 6,0 verwendet, bei den humanen Proben RIS-Werte von mindestens 5,8 (siehe **Tab. 6** und **7** für ausführliche Information).

Tabelle 6: qPCR Körperspender

Körperspender	Probe	RIS	Ratio	Totale Konzentration [ng/μl]
Human Nr. 1	Plexus	5,8	0,61	1059,48
	Parenchym	6,1	n/a	187,42
Human Nr. 2	Plexus	8,8	n/a	1374,5
	Parenchym	7	0,68	417,07
Human Nr. 3	Plexus	8,1	1,07	577,31
	Parenchym	7,9	0,55	1093,26

Tabelle 7: qPCR Maus

Maus	Probe	RIS	Ratio	Totale Konzentration [ng/μl]
Maus (2 Monate)	Plexus	6,1-7,5	0,91-1,09	14,72-232,91
	Parenchym	6,3-8,1	0,81-1,27	55-559,92
Maus (12 Monate)	Plexus	6,3-7,1	n/a	11,73-183,28
	Parenchym	6,8-7,7	1-1,01	55,45-241,57
Maus (30 Monate)	Plexus	6,4-6,8	n/a	7,1-54,29
	Parenchym	6,5-8,2	0,9-1,3	10,41-502,91

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcriptase Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die negative Kontrolle wurde die Reverse Transcriptase mit Nuclease-freiem Wasser ersetzt. Mit dem Qubit 2.0 Fluorometer wurde die gesamte cDNA-Konzentration jeder einzelnen Probe gemessen. Die Primer, die für die Messung der mRNA Expression verwendet wurden, wurden von dem TaqMan® Gene Expression assays erworben (siehe Tabelle 4 und 5).

2.2.3.3 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

Mittels quantitativer PCR wurden mRNA-Abschnitte in einem Real-Time PCR System nachgewiesen. Der TaqMan® Gene Expression MasterMix, der dazugehörige TaqMan® Gene Expression Assay und die cDNA mit einer

Konzentration von 5 ng/µl wurden in eine PCR Platte von 20µl Volumen pipettiert. Es wurden für die Negativ-Kontrollen jeweils 2 Replikate und für die einzelnen Gene jeweils 3 Replikate angefertigt. Als Referenzgene zur Normalisierung dienten HPRT, TBP und UBC (84). Als Vergleichsgewebe wurde Parenchym aus dem Striatum verwendet. Die Parameter der Zyklen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Daten wurden mit der StepOne™ Software v2.3 aufgenommen und in Microsoft Excel exportiert.

Tabelle 8: Zyklusparameter für qPCR

Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklus
Holding Stage	50 °C	2 min	1x
	95 °C	10 min	
Cycling Stage	95 °C	15 s	40x
	60 °C	1 min	

2.2.3.4 RT-qPCR Datenevaluation

Für die Analyse der relativen mRNA-Expression wurde die Software qbase + verwendet. Hierbei wurde die relative Häufigkeit (Rq-Werte) mit einer Abfolge von Normalisierungsmethoden auf der Grundlage der Delta-Delta Ct Methode und MIQE-konformen Methoden (85) berechnet. Die in qbase + eingegebenen Daten dienten als RT-qPCR-Zyklussschwellenwerte (Ct). Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte bei 100%iger PCR-Effizienz und ungepaarter Versuchsanordnung.

Für die statistische Analyse der AQP4-Expression der Maus wurde GraphPad Prism 6.07 verwendet. Hierbei wurden die qbase + RQ-Werte mithilfe eines ungepaarten t-Tests verarbeitet. Als signifikant wurden p-Werte < 0,05 angesehen.

2.2.3.5 Kapillarelektrophorese

Nach der Amplifizierung wurden die PCR Produkte durch hochauflösende Kapillarelektrophorese mit dem Qiaxcel DNA High Resolution Kit und der Methode OM800 analysiert. Um die Amplifizierungsmenge zu bestätigen, wurde

der QX Alignment Marker 15 bp/600 bp verwendet. Als Size Marker diente der QX DNA Size Marker 25 bp – 500 bp in einer Verdünnung von 30 ng/μl. Für die Trennung wurden folgende Parameter nach der OM800-Methode des QIAxcel-Systems verwendet:

4 kV und 5 Sekunden für die Injektion des Alignment-Markers, 5 kV und 10 Sekunden für die Injektion der Probe und 3 kV und 800 Sekunden für die Trennung. Die Ergebnisse sind als Gelbilder dargestellt, welche mithilfe der QIAxcel-System-Software erstellt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Lokalisation

3.1.1 Aquaporine

3.1.1.1 Mensch

In einem ersten Schritt wurde der Übergangsbereich zwischen Ependym und PC Epithel untersucht und hierfür mit AQP1 und Laminin gefärbt (**Abb. 3**). Wie bekannt, wurde AQP1 vorwiegend in der apikalen Membrandomäne von Plexusepithelzellen exprimiert, teilweise fand sich in der basolateralen Membrandomäne zusätzlich eine schwache Expression. In einigen wenigen Zellen konnte auch eine Verminderung und teilweise ein komplettes Fehlen von AQP1 festgestellt werden (86).

Laminin zeigte sich als durchgängige Expression, welche die Abgrenzung der Basallamina zum Plexusepithel (epithelial) hin darstellt. Zusätzlich zur Basallamina des Plexusepithels zeigte sich die Laminin-Expression auch in der Endothelschicht der Kapillaren und der Tunica intima größerer Blutgefäße (endothelial). In zahlreichen Zotten des PC konnten so eine epitheliale und eine endotheliale Basallamina nachgewiesen werden, die durch eine dicke Bindegewebsschicht (*Tela choroidea*) voneinander getrennt werden (**Abb. 4**). An der *Taenia choroidea* münden die Blutgefäße als Gefäßstiel in den PC. Hier konnte beobachtet werden, dass die endotheliale Basallamina durchgehend erschien, während die epitheliale Basallamina auf Höhe des Gefäßstiel verschwunden war (86).

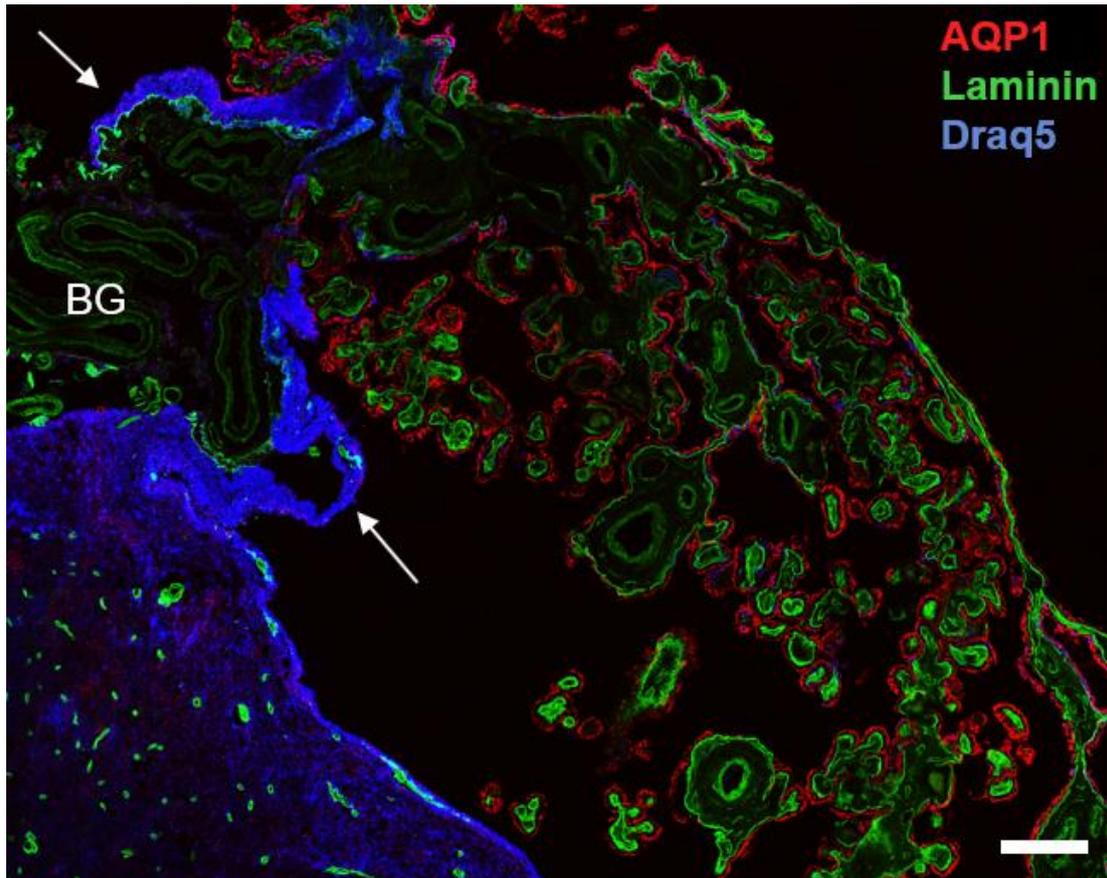


Abbildung 3: Übersichtsaufnahme des humanen PCs und Ependyms

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Humaner PC und Ependym im lateralen Ventrikel immungefärbt für AQP1 (rot) und Laminin (grün), Zellkerne markiert mit DRAQ5 (blau).

Überblick der Übergangszone zwischen dem PC und der ependymalen Auskleidung des Gehirnparenchyms. AQP1 ist auf das Plexusepithel beschränkt und ist in ependymalen Zellen nicht vorhanden. Laminin als Teil der Basallamina (BL) findet sich im PC in der BL des Epithels und in der BL der Blutgefäße (BG) im Stroma des PC und des Gehirnparenchyms. Die ependymale Auskleidung besitzt keine Basallamina (außer dort, wo BG vorhanden sind). BG, die den PC versorgen, sind von Astroglia und Ependym in der Übergangszone umgeben (Pfeile). Maßstab: 200 μm .

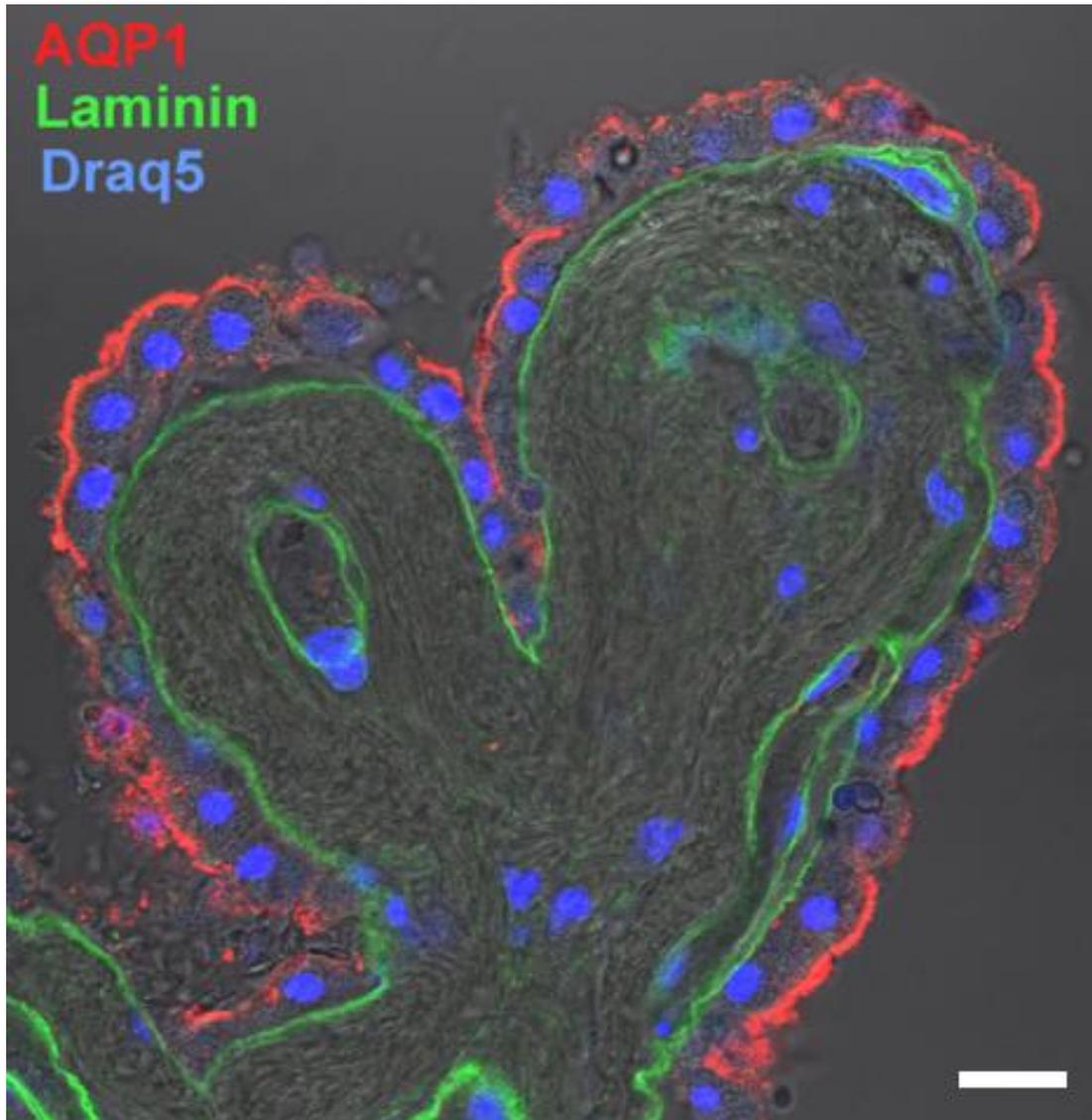


Abbildung 4: Hochauflösende Vergrößerung mit DIC einer PC-Zotte

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). AQP1 (rot) wird kontinuierlich meist auf der apikalen Seite der Plexusepithelzellen exprimiert. Die Färbung mit Laminin (grün) deutet auf eine dicke stromale Bindegewebsschicht zwischen den beiden BLs hin, was auf eine beträchtliche Diffusionsbarriere hinweist. Maßstab: 20 μm .

Ähnlich hierzu zeigte sich auch die AQP1-Expression im Übergang von Plexusepithel zu Ependym. Sie wurde unregelmäßiger und diskontinuierlich und fehlte im Bereich des Ependyms komplett. Dies stimmt mit den bisherigen Ergebnissen eines Fehlens von AQP1 und einer Basallamina im Ependym und deren Vorhandensein im PC überein (86).

Im nächsten Schritt wurde AQP4 im humanen PC und Ependym gefärbt. In jedem der untersuchten Körperspender ließen sich hierbei AQP4-positive Zellen im PC darstellen (**Abb. 5**). Diese Expression zeigte sich vor allem in der basolateralen Membrandomäne der Plexusepithelzellen. Teilweise zeigte sich zusätzlich eine schwächere zytoplasmatische Expression (86).

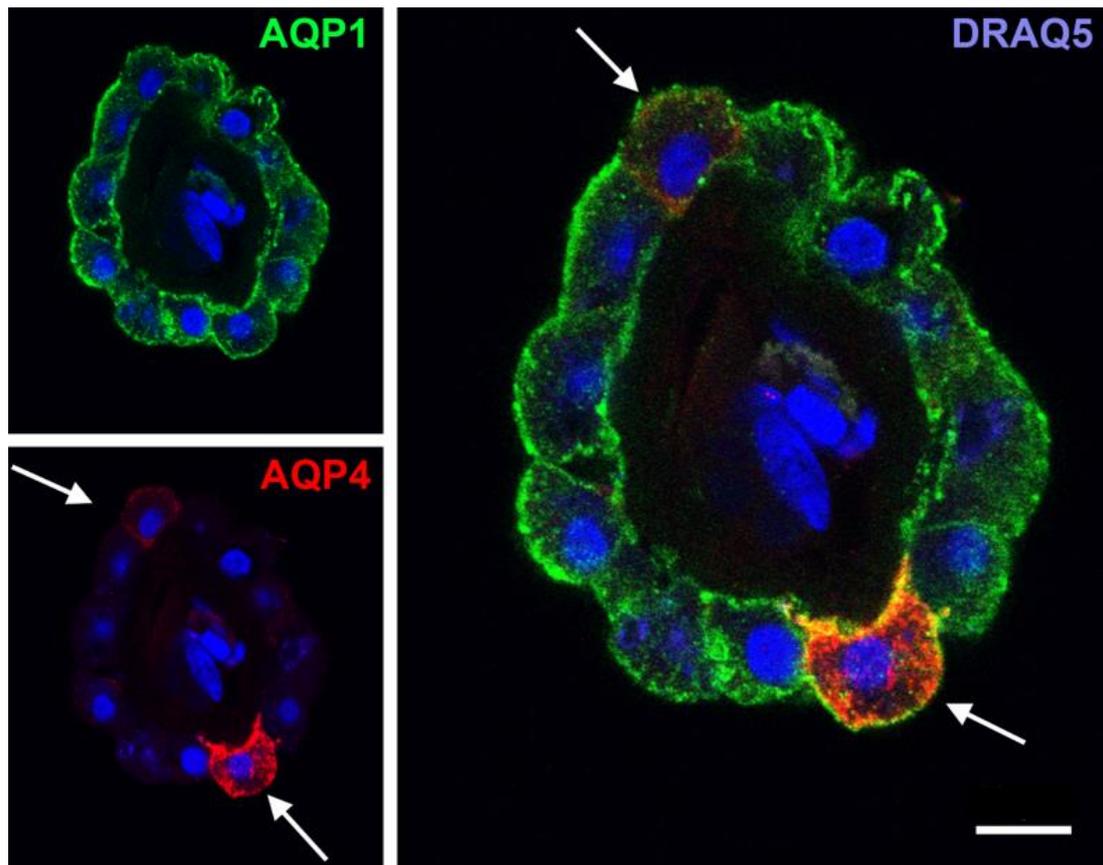


Abbildung 5: Humane PC-Zotte im lateralen Ventrikel

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Querschnitt einer Zotte gefärbt mit AQP1 (rot) und AQP4 (grün). Die Pfeile zeigen Zellen, die sich im PC-Epithel befinden und AQP4 meist basolateral exprimieren. Maßstab: 10 μ m.

Es ließ sich beim Vergleich aller Körperspender kein bestimmtes Muster feststellen. So fanden sich Regionen mit (1) einzelnen AQP4-positiven Zellen (2) und Regionen mit AQP4-positiven Zellclustern (**Abb. 6**). In ähnlich gleicher Anzahl fanden sich hierbei entweder AQP4-Zellen mit zusätzlichem AQP1 oder

AQP4-Zellen ohne AQP1-Immunoreaktivität. Des Weiteren existieren auch Abschnitte, in denen Zellen mit AQP4-Expression nicht auftreten.

Betrachtet man einen Ausschnitt von 100x100 µm, so machten in diesem Bereich des PCs, in dem sich vorwiegend einzelne AQP4-positive Zellen befanden, diese ca. 5% aller Epithelzellen aus. Befanden sich die AQP4-positiven Zellen jedoch in Regionen mit hauptsächlich vorkommenden Zellclustern, in denen sie als kontinuierliche Zellreihen auftraten, so machten diese AQP4-positiven Zellen etwa 50% aller Epithelzellen aus. Bei der Untersuchung von Psammom-Körperchen und verdicktem Bindegewebe unterhalb des Epithels konnte kein Zusammenhang zur Verteilung von AQP4 festgestellt werden (86).

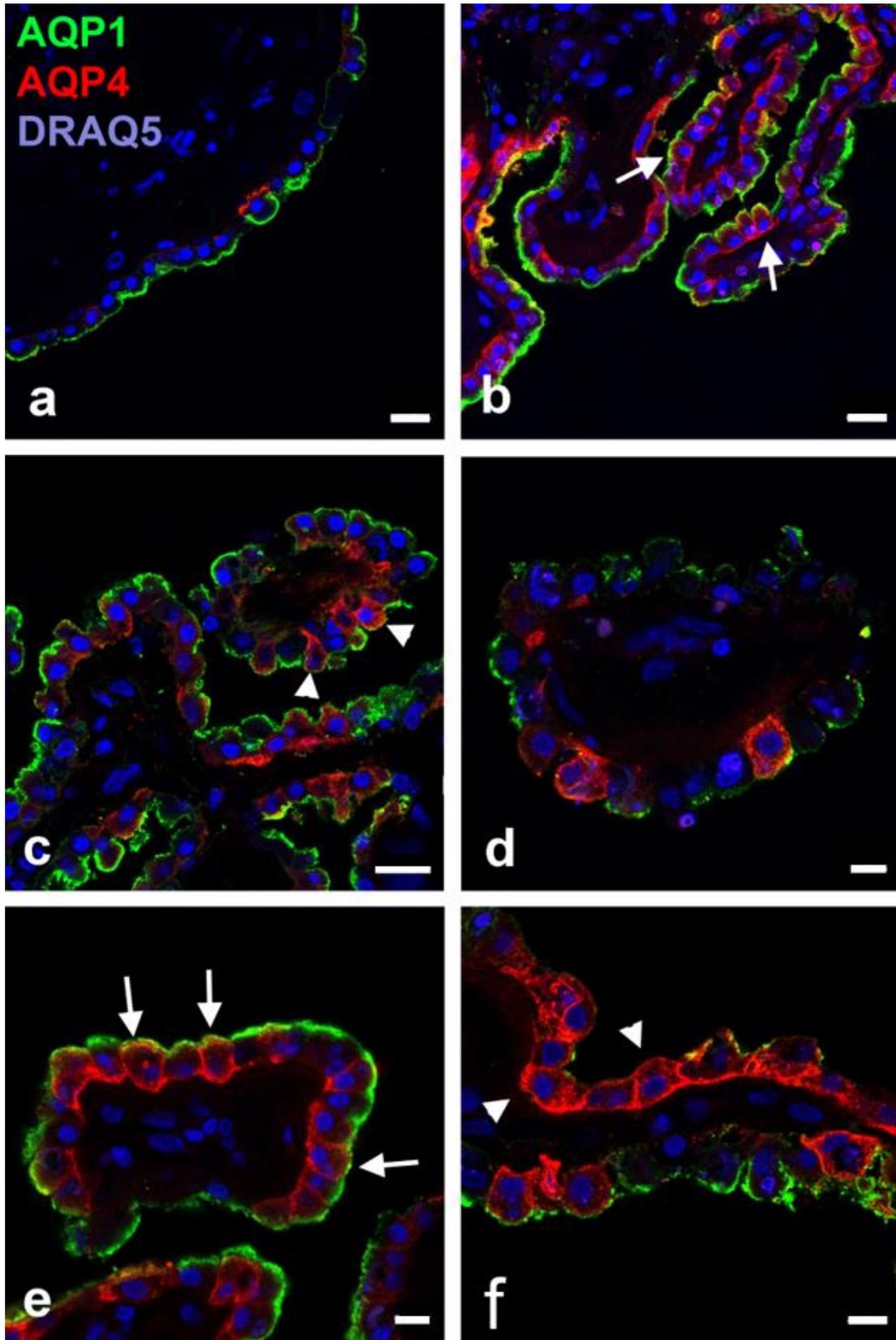


Abbildung 6: Verteilungsmuster von AQP1 und AQP4 im humanen PC

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Humaner PC im Seitenventrikel von verschiedenen Körperspendern. Dargestellt sind Bereiche (a und b) mit einzelnen AQP4-positiven Zellen (ca. 5% aller Epithelzellen) und Bereiche mit Clustern von Zellen (b, c, e und f), die AQP4 exprimieren (über 50% aller Epithelzellen). Bei der Untersuchung der zellulären Lokalisation fanden wir Zellen, die sowohl AQP1 als auch AQP4 exprimieren (b und e; Pfeile), sowie Zellen, die nur einen der beiden Wasserkanäle exprimieren (c und f; Pfeilspitzen). Maßstab: 10 μ m.

3.1.1.2 Maus

AQP1 konnte sowohl bei der jungen als auch bei der alten Maus im PC nachgewiesen werden (**Abb. 7**). Es zeigte sich als durchgängig apikale Expression in den Plexusepithelzellen. Hierbei ließ sich kein Unterschied hinsichtlich Lokalisation und Intensität der Färbung zwischen junger und alter Maus feststellen. Das Ependym zeigte wie auch human keine AQP1 Expression.

Dagegen befand sich im Ependym eine starke AQP4-Expression. Die Ependymzellen selbst zeigten eine basolaterale Expression auf. Die subependymalen Zone wies ebenfalls eine starke AQP4-Immunreaktivität auf. Der PC hingegen war sowohl bei junger als auch bei alter Maus frei von AQP4 (**Abb. 7**) (86).

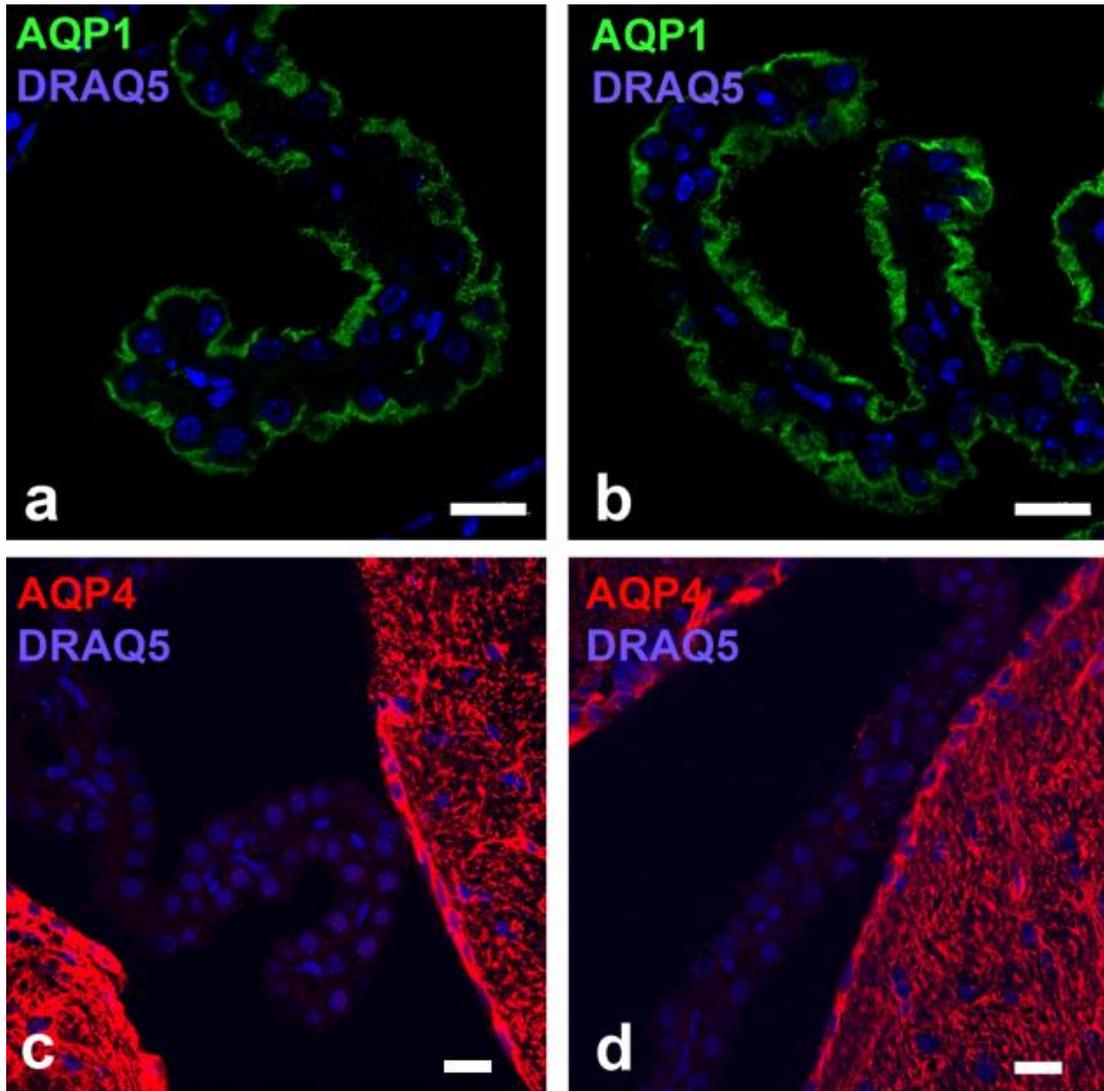


Abbildung 7: Muriner PC im Seitenventrikel

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Muriner PC des lateralen Ventrikels gefärbt mit AQP1 (grün). Junge (2 Monate alt, links) und alte (30 Monate alt, rechts) Mäuse zeigten keine Unterschiede in Lage oder Intensität der Expression von AQP1. AQP1 wurde immer apikal im Epithel exprimiert. AQP4-Immunreaktivität wurde im murinen PC nicht beobachtet. Maßstab: 20 μm .

3.1.2 NKCC1

Das Transportprotein NKCC1 zeigte sich als durchgängige apikale Expression auf den humanen Plexusepithelzellen, die mit AQP1 kolokalisiert war.

Umgekehrt zeigten die meisten AQP1-positiven Zellen auch eine Expression von NKCC1 (**Abb. 8**) (86).

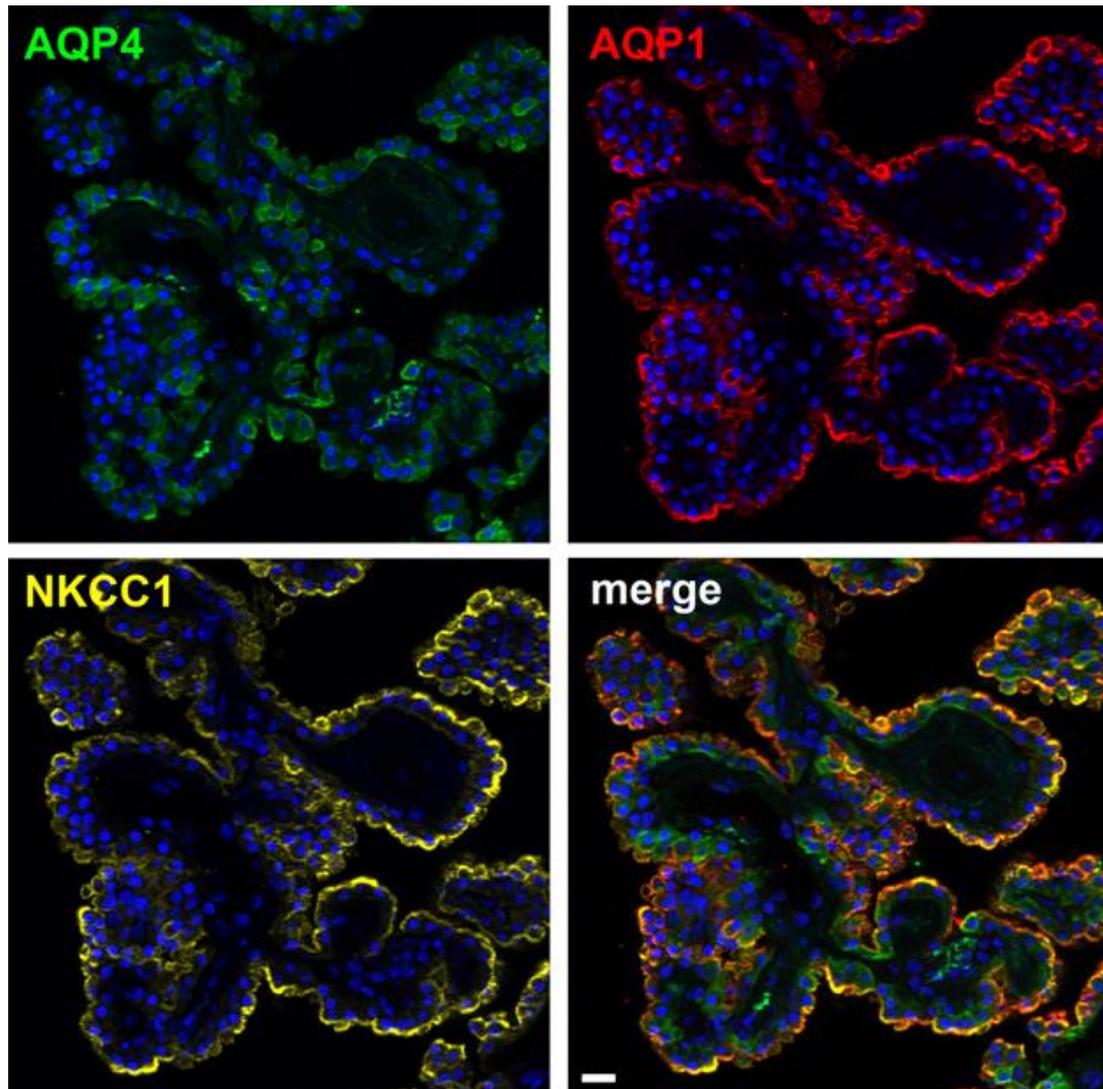


Abbildung 8: Immunfärbung für AQP1 (rot), AQP4 (grün) und NKCC1 (gelb)

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). NKCC1 zeigte eine fast durchgehende homogene Expression auf der apikalen Seite des Plexusepithels, die mit AQP1 kolokalisiert war. Umgekehrt zeigten die meisten AQP4-positiven Zellen auch eine Expression von NKCC1 (Pfeile). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Maßstab: 20 μ m.

3.1.3 Na^+/K^+ -ATPase

Ebenso wie NKCC1 fand sich die Na^+/K^+ -ATPase in der apikalen Membrandomäne der humanen Plexusepithelzellen (**Abb. 9**). Die Expression zeigte sich hierbei jedoch weitaus weniger homogen: So ließ sich die Tendenz feststellen, dass Na^+/K^+ -ATPase und AQP4 eine inverse Verteilung aufwiesen. Es kamen Bereiche vor, in denen AQP4-positive Zellen exprimiert wurden und Na^+/K^+ -ATPase fehlte. AQP1 war hierbei durchgehend apikal exprimiert (86).

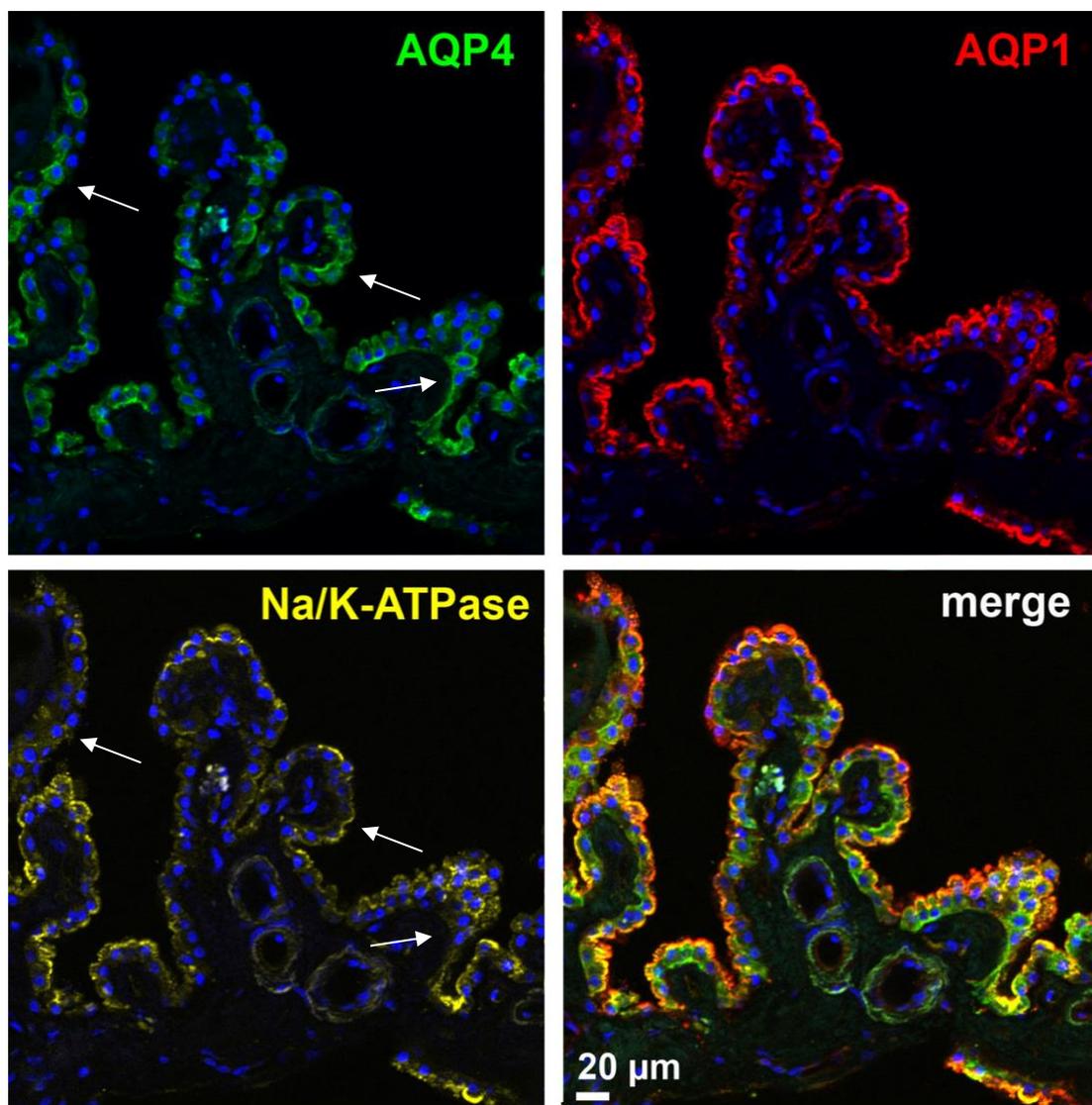


Abbildung 9: Immunfärbung für AQP1 (rot), AQP4 (grün) und Na/K-ATPase (gelb)

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Die Na/K-ATPase wurde wie NKCC1 apikal exprimiert, aber nicht homogen. Es zeigte sich die Tendenz, dass Na/K-ATPase und AQP4 invers verteilt waren: Bereiche (Pfeile), in denen AQP4-positive Zellen vorhanden waren, zeigten eine schwächere oder fehlende Na/K-ATPase-Immunreaktivität. AQP1 zeigte eine kontinuierliche Expression. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Maßstab: 20 μm .

3.1.4 Proliferationsmarker (KI-67, PCNA)

3.1.4.1 Mensch

Um eine mögliche Erklärung für die Entstehung der AQP4-positiven Zellen zu geben, wurden Proliferationsmarker wie KI-67 oder PCNA zur Analyse hinzugezogen. Im humanen PC ließen sich Zellnuclei post mortem mit KI67 und PCNA anfärben (**Abb. 10**). Durch die Verwendung des Basalmembranproteins Laminin konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um Zellen innerhalb des Epithels des PCs handelt. Hierbei gab es allerdings Unterschiede zwischen den einzelnen Körperspendern. So ließen sich nicht bei allen Körperspendern proliferierende Zellen finden. Die Anzahl dieser Zellen war sehr gering, auf einer Schnittfläche von 0,5 bis 1 cm^2 befanden sich durchschnittlich etwa 5 positive Zellen. Sie waren über den gesamten PC verteilt und kamen solitär vor. Die Zellen exprimierten hierbei apikal AQP1. AQP4 konnte nicht nachgewiesen werden. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen Proliferationsindex und Körperspender feststellen.

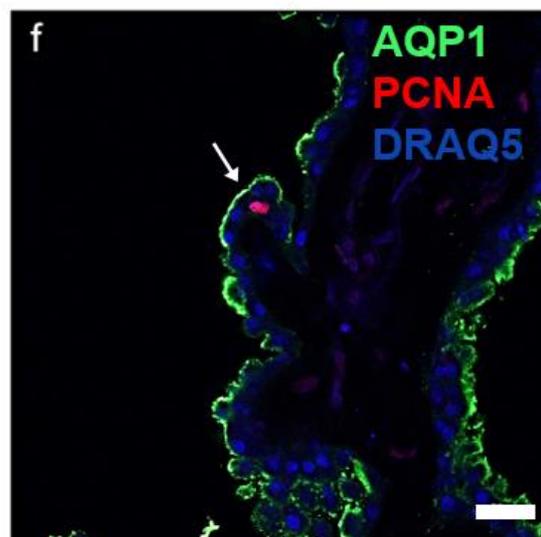
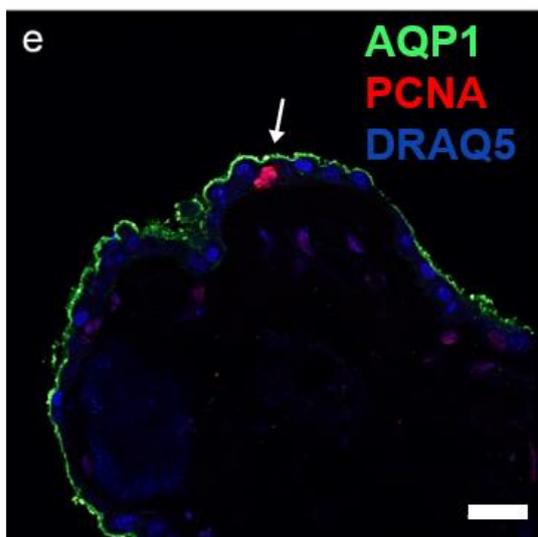
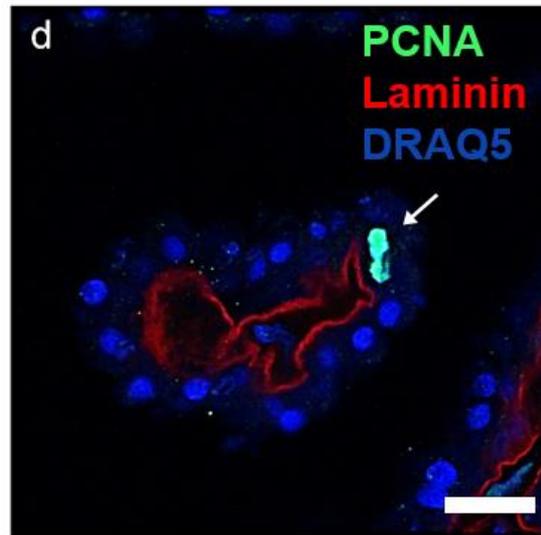
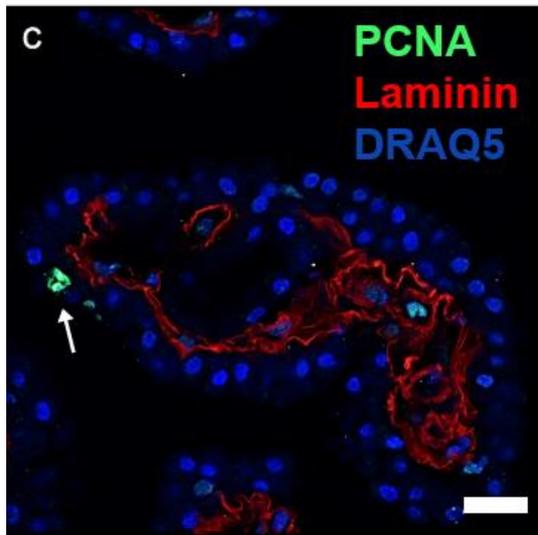
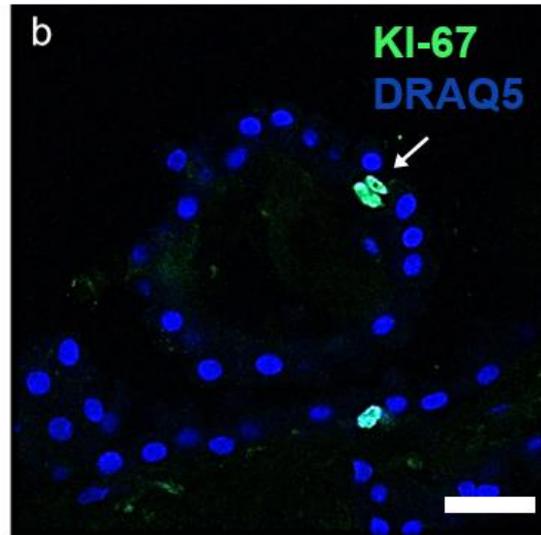
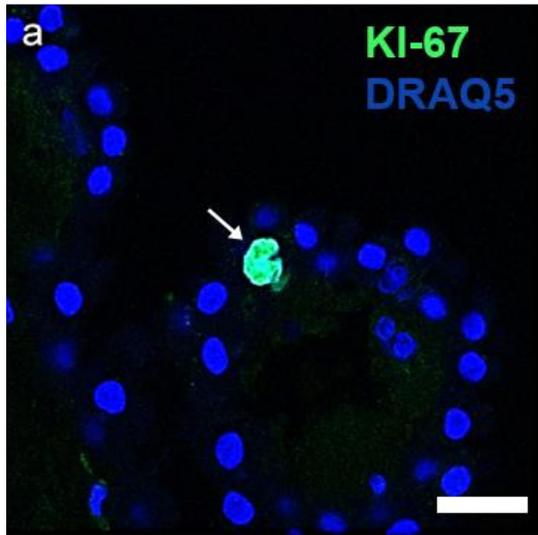


Abbildung 10: Proliferierende Zellen im Epithel des Plexus choroideus

Die oberste Reihe mit den Aufnahmen **a** und **b** zeigt KI-67-positive Zellen (grün). Die mittlere Reihe mit den Aufnahmen **c** und **d** zeigt, dass sich PCNA-positive Zellen (grün) apikal der Basalmembran (hier rot gefärbt mit Laminin) im Epithel des PCs befinden. Die untere Reihe mit den Aufnahmen **e** und **f** zeigt eine Doppelfärbung von PCNA (rot) und AQP1 (grün). PCNA-positive Zellen zeigen zusätzlich apikal eine AQP1-Expression. Maßstab: 20 µm.

3.1.4.2 Maus

Im PC zeigten sich sowohl bei der jungen als auch bei der alten Maus keine positive Reaktionen mit KI67 oder PCNA. In der subependymalen Zone konnten Zellen, die mit KI67 und mit PCNA angefärbt wurden, nachgewiesen werden (**Abb. 11**).

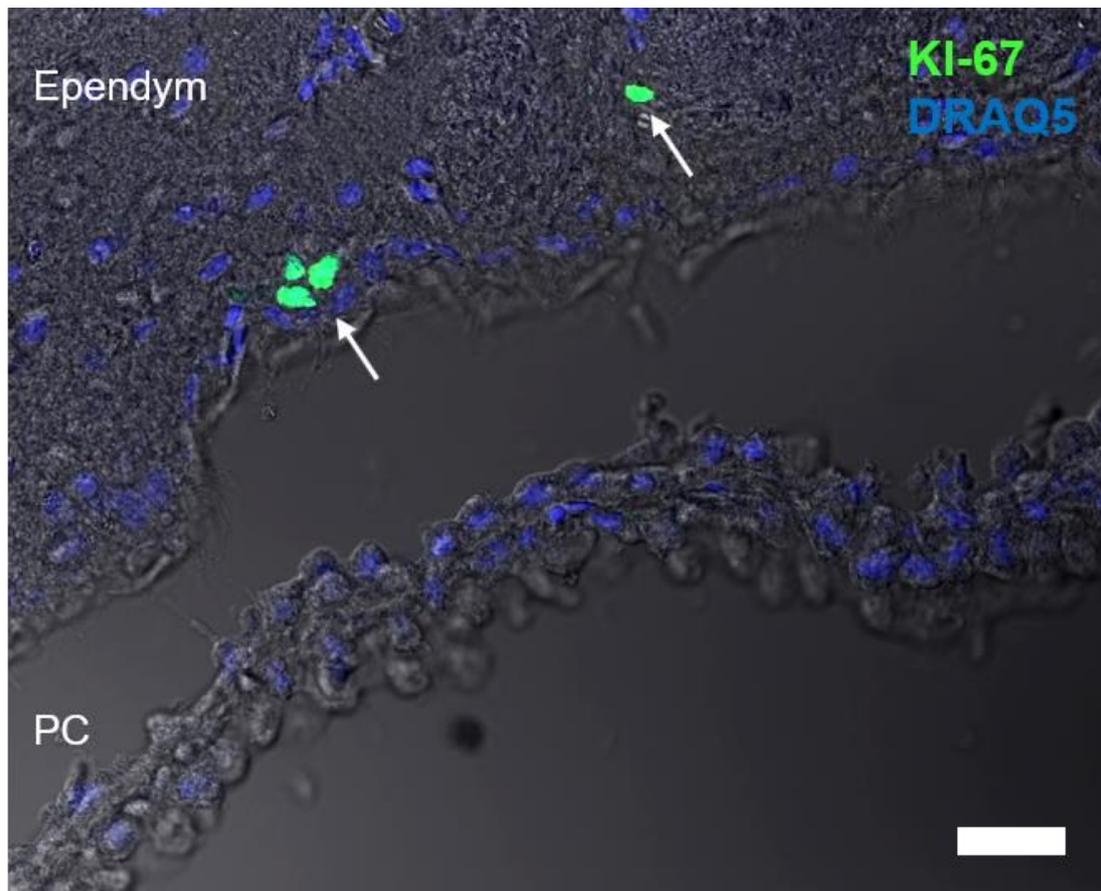


Abbildung 11: Proliferation in der subependymalen Zone in der Maus

Der PC der Maus zeigt keine proliferierenden Zellen. Die Pfeile zeigen auf proliferierende Zellen in der subependymalen Zone. Maßstab: 20 µm.

3.1.5 ACE2 und TMPRSS2

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden dem PC Schrankenfunktionen für Immunzellen und Erreger zugeschrieben. Im Rahmen der Corona-Pandemie wurden die beiden Membranrezeptoren ACE2 und TMPRSS2, bekannte Bindungsrezeptoren für den Eintritt des SARS-CoV2, für diese Arbeit hinzugezogen. Diese beiden Rezeptoren ließen sich in der Mehrheit der Plexusepithelzellen mit einer starken Proteinexpression feststellen (**Abb. 12**). Hierbei waren sie vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert, hierbei möglicherweise in Lysosomen oder großen Vesikeln (79).

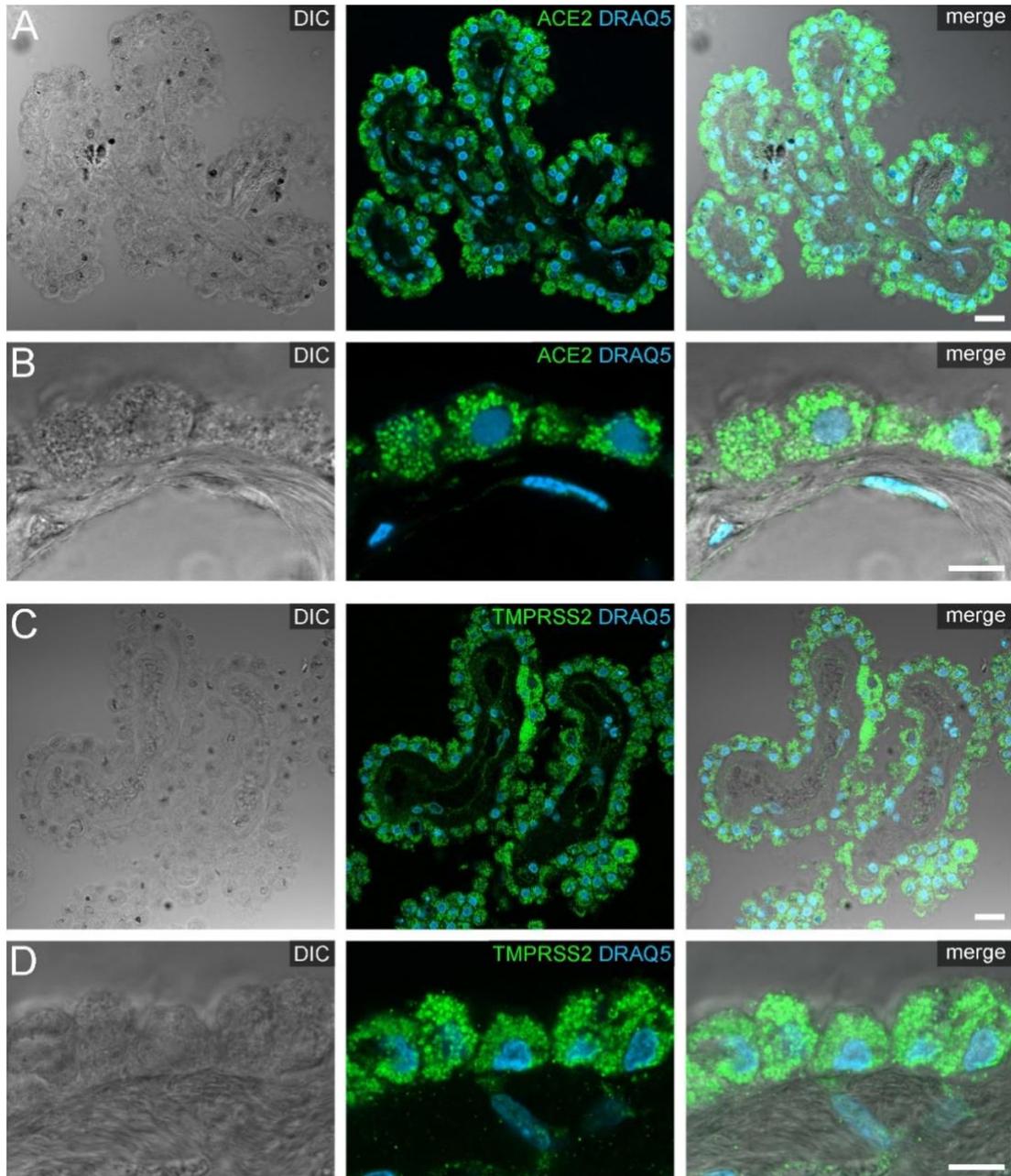


Abbildung 12: Expression von ACE2 und TMPRSS2 im humanen PC

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2020 (79). (A) Überblick mehrerer Zotten und (B) hochauflösende Vergrößerung von humanen Plexusepithelzellen aus dem lateralen Ventrikel in einer DIC-Aufnahme (links) sowie immunogefärbt mit ACE2 (grün) und dem Zellkernmarker DRAQ5 (blau). Es zeigt sich eine deutlich positive Reaktivität für ACE2. (C) Übersichtsaufnahme und (D) Hochauflösende Vergrößerung von humanen Plexusepithelzellen aus dem lateralen Ventrikel in einer DIC-Aufnahme (links) sowie immunogefärbt mit TMPRSS2 (grün) und dem Zellkernmarker DRAQ5 (blau). TMPRSS2 zeigt eine nahezu identische Expression wie ACE2 in den Epithelzellen. Maßstab: (A,C) 20 μm und (B, D) 10 μm .

Des Weiteren war ACE2 auch apikal oder basolateral in vereinzelt Epithelzellen zu finden (**Abb. 13**). Es zeigte sich vorwiegend eine sehr heterogene Intensität, lediglich für TMPRSS2 fanden sich wenige Zellen, die im Vergleich zu ihren Nachbarzellen, eine deutlich höhere Expression anzeigten (79).

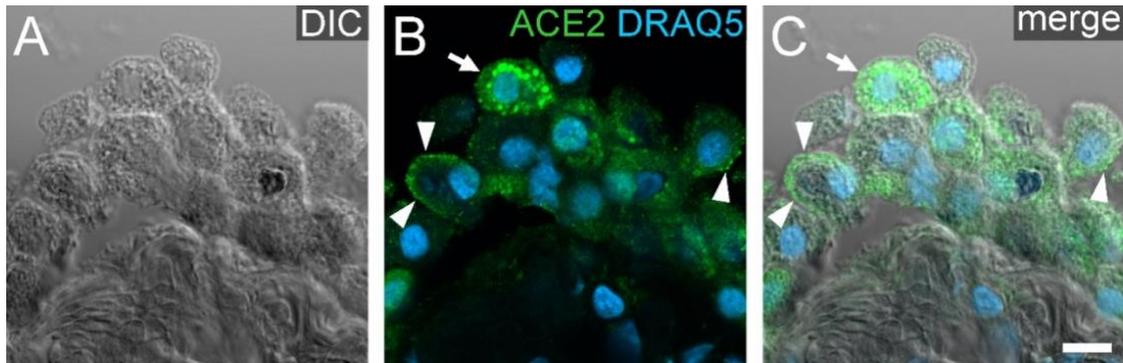


Abbildung 13: Unterschiedliche Expression von ACE2 im humanen PC

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2020 (79). (A) zeigt ein DIC-Aufnahme der Plexusepithelzellen. In (B) lassen sich die beiden Lokalisationen in Plexusepithelzellen mit einer ACE2-Immunhistochemie darstellen: in intrazellulären Vesikeln (Pfeile) oder an der Zellmembran (Pfeilspitzen). (C) zeigt das zusammengeführte Bild. Maßstab: 10 µm.

Zusätzlich zum Plexusepithel wurden auch Abschnitte des Ependyms und der *Taenia choroidea* auf Immunreaktivität dieser beiden Rezeptoren untersucht (**Abb. 14**). ACE2 war auf den Ependymzellen weniger exprimiert als auf den Plexusepithelzellen. Auch auf den subependymalen astrozytären Fortsätzen, festgestellt durch GFAP, zeigte sich zwar eine gleichmäßig verteilte aber schwache Immunoreaktivität. TMPRSS2 war ebenfalls schwächer auf den Endfüßen der Astrozyten exprimiert, auf dem Ependym sogar weitestgehend nicht (79).

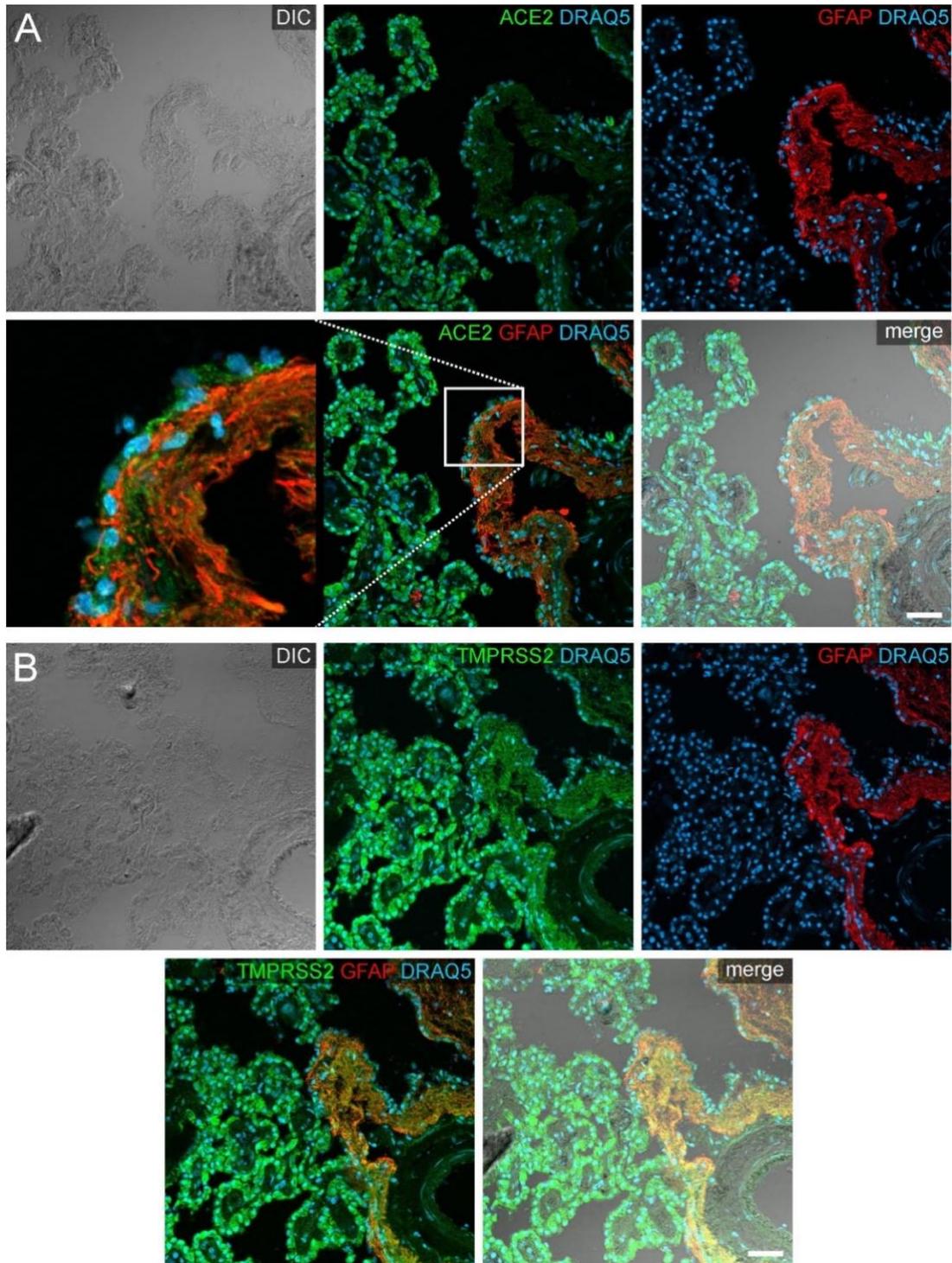


Abbildung 14: Expression von ACE2 und TMPRSS2 an der Taenia choroidea

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2020 (79). (A) zeigt die Übergangszone zwischen PC und angrenzendem Gehirnparenchym (in diesem Fall der Tania choroidea und des Ependyms) mit Färbungen von ACE2 (grün), GFAP (rot) und DRAQ5 (blau). Das weiße Rechteck zeigt einen vergrößerten Ausschnitt einer ACE2-Färbung im Ependym. ACE2 zeigt eine deutlich stärkere Reaktivität auf Plexusepithelzellen als auf Ependymzellen oder Astrozytenfortsätzen. (B) zeigt einen korrespondierenden Ausschnitt gefärbt mit TMPRSS2 (grün), GFAP (rot) und DRAQ5 (blau). Die Astrozytenfortsätze zeigen nur geringe bis keine Immunreaktivität für TMPRSS2. Maßstab: 50 μ m.

3.2 Molekularbiologische Analyse des Plexus choroideus

3.2.1 Human

3.2.1.1 RT-qPCR

Mittels TaqMan®-Assay wurde an drei Körperspendern eine Genexpressionsanalyse für AQP1, AQP4 und NKCC1 durchgeführt. Als Vergleichsgewebe für den PC diente hierbei das Striatum. Die Menge an jeweiliger mRNA wurde hierbei in Relation auf den Mittelwert der drei Referenzgene HPRT, UBC und TBP gesetzt. In allen drei Körperspendern war im PC AQP4 mRNA vorhanden, wenn auch eine niedrigere relative Menge als AQP1 mRNA (**Abb. 15**). NKCC1 mRNA dagegen zeigte sich in zwei der drei Körperspender (Nr. 1 und 3) auf dem nahezu gleichen relativen Niveau wie AQP1 mRNA, bei einem Körperspender (Nr. 2) war NKCC1 mRNA im Vergleich zu AQP1 mRNA deutlich vermindert. Bei allen drei Körperspendern hatte NKCC1 mRNA eine höhere relative Menge als AQP4 mRNA (86).

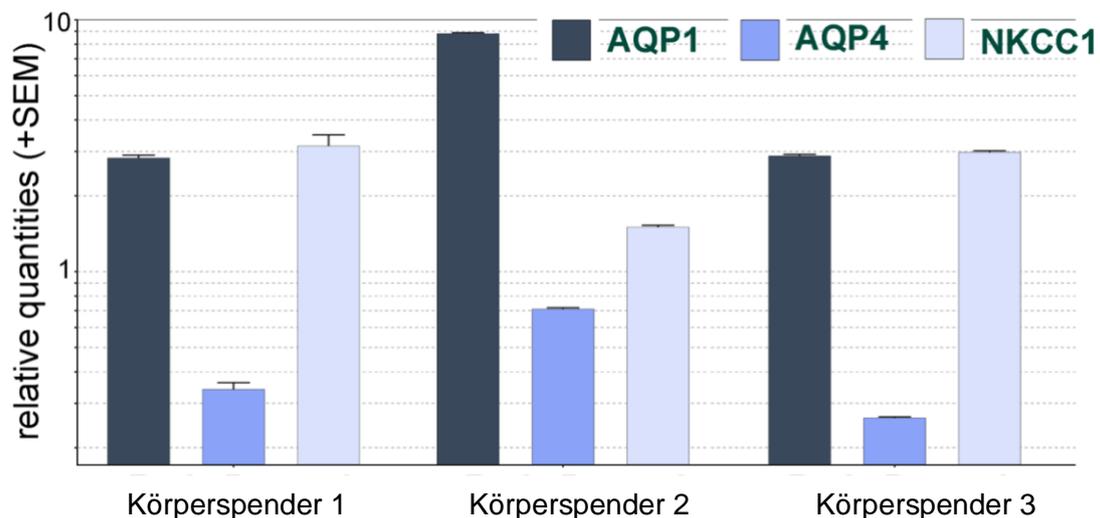


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse für AQP1, AQP4 und NKCC1 im Plexus choroideus

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Genexpressionsanalyse mittels TaqMan®-Assay für drei Körperspender im humanen PC. Neben der zu erwarteten AQP1 mRNA und NKCC1 mRNA, ist AQP4 mRNA in den Proben aller drei Körperspender enthalten.

Im Gegensatz dazu zeigten sich im striatalen Gewebe hohe relative Mengen von AQP4 mRNA und lediglich sehr geringe relative Mengen von AQP1 mRNA (**Abb. 16**). NKCC1 mRNA wies ein deutlich niedrigeres relatives Niveau im Gegensatz zu AQP4 mRNA und ein höheres relatives Niveau im Vergleich zu AQP1 mRNA auf (86).

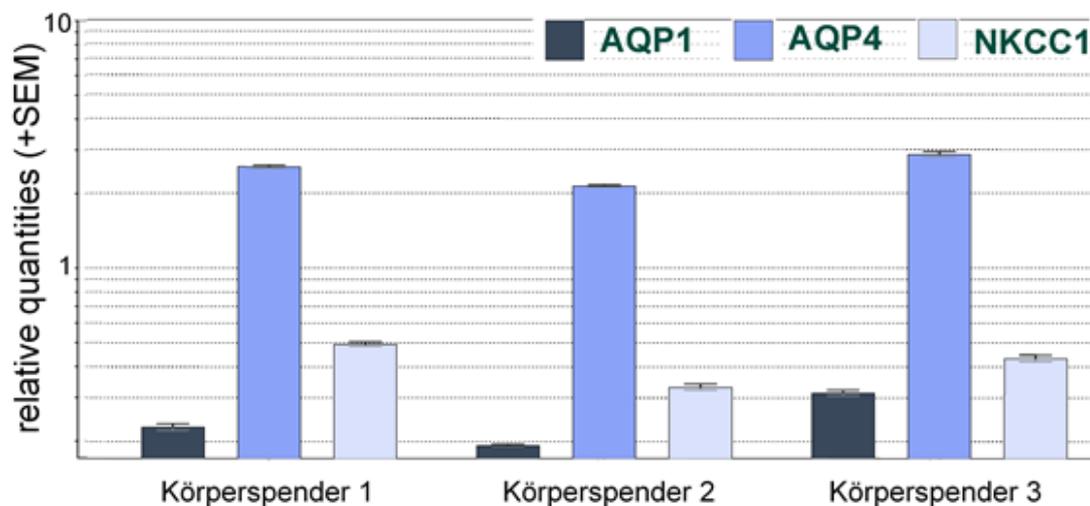


Abbildung 16: Genexpressionsanalyse für AQP1, AQP4 und NKCC1 im Striatum

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Genexpressionsanalyse mittels TaqMan®-Assay für drei Körperspender im humanen Striatum. AQP4 mRNA ist in hohem relativen Ausmaß vorhanden, NKCC1 mRNA deutlich geringer. AQP1 mRNA zeigt nur sehr geringe relative Mengen.

3.2.1.2 Kapillarelektrophorese

Um die Spezifität der TaqMan®-Sonden zu bestätigen, wurde eine Kapillarelektrophorese am QIAxcel durchgeführt. Hierbei konnte eine ausgeprägte Bande auf dem jeweiligen Level von AQP1, AQP4, NKCC1 und der drei Referenzgene nachgewiesen werden (**Abb. 17**) (86).

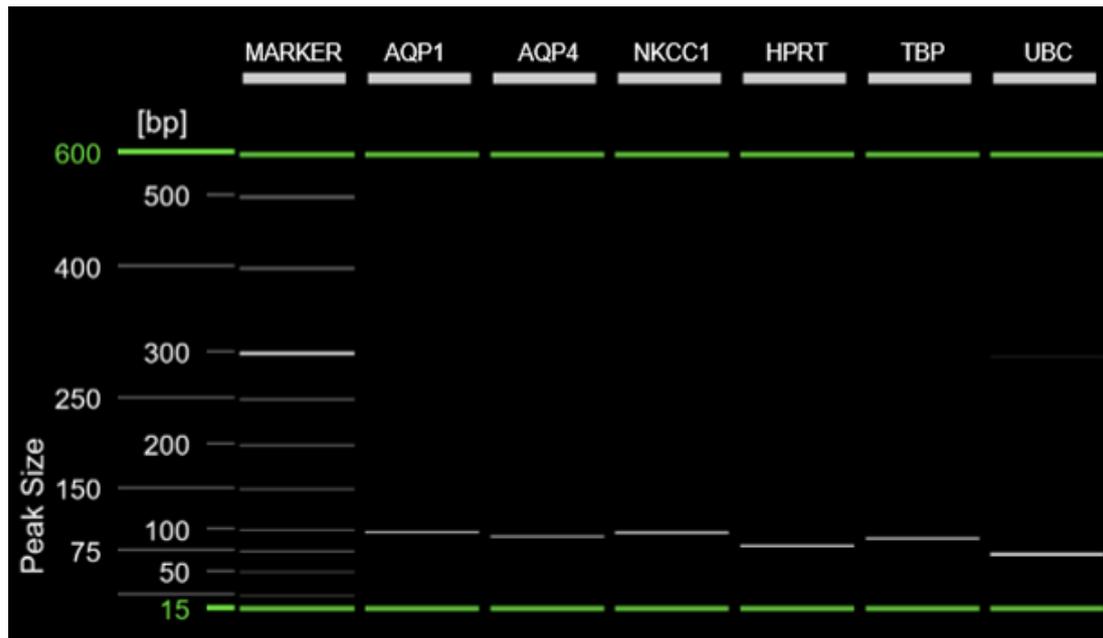


Abbildung 17: Gelbild der humanen RT-PCR-Produkte

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Das Gelbild wurde mithilfe der QIAxel-Systemsoftware erstellt und zeigt die zu erwartenden Produktgrößen für AQP1 (96 bp), AQP4 (92 bp), NKCC1 (97 bp) HPRT (82 bp), TBP (91 bp), UBC (71 bp).

3.2.2 Maus

3.2.2.1 RT-qPCR

Da alle von uns untersuchten Körperspender mehr als 70 Jahre alt waren, wurde eine altersabhängige Ursache für die AQP4 Expression nahe gelegt. Zur Bestätigung wurde bei der Maus eine Genexpressionsanalyse bezüglich AQP4 mRNA in den Alterskohorten jung (2 Monate), adult (12 Monate) und alt (30 Monate) mit je 5 biologischen Replikaten durchgeführt. Die Menge der AQP4 mRNA wurde hierbei in Relation auf den Mittelwert der drei Referenzgene HPRT, UBC und TBP gesetzt. Es ließ sich ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Menge von AQP4 mit ansteigendem Alter der Mäuse zeigen (**Abb. 18**) (**86**).

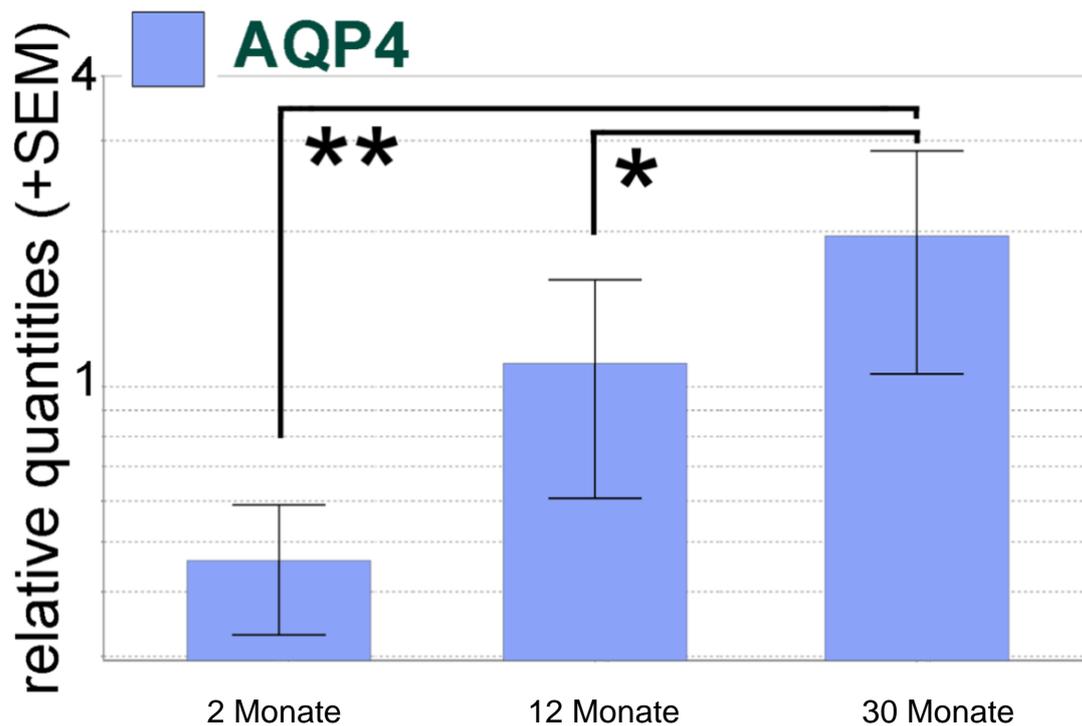


Abbildung 18: Quantitative RT-PCR-Analyse für AQP4 bei der Maus

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Quantitative RT-PCR-Analyse für AQP4 mittels TaqMan®-Assay für die drei Alterskohorten der Mäuse (jeweils fünf biologische Replikate). Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von AQP4 auf der Grundlage der von qbase + exportierten „relative quantity“ (RQ), berechnet aus den Cq-Werten. Qbase + Ergebnisse sind skaliert auf den Durchschnitt aller unbekannten Proben pro Ziel. Die RQ für AQP4 war in der 30 Monate alten Gruppe signifikant höher als in den jüngeren Gruppen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,0005$).

3.2.2.2 Kapillarelektrophorese

Wie zuvor bei den humanen Daten wurde bei Mäusen ebenso eine Kapillarelektrophorese zur Bestätigung durchgeführt. In **Abb. 19** sind die Banden von AQP1 und AQP4 der jeweiligen Alterskohorte sowie die drei Referenzgene aufgetragen. Es zeigte sich sowohl bei AQP1 wie auch bei AQP4 eine Bande in jeder Alterskohorte (86).

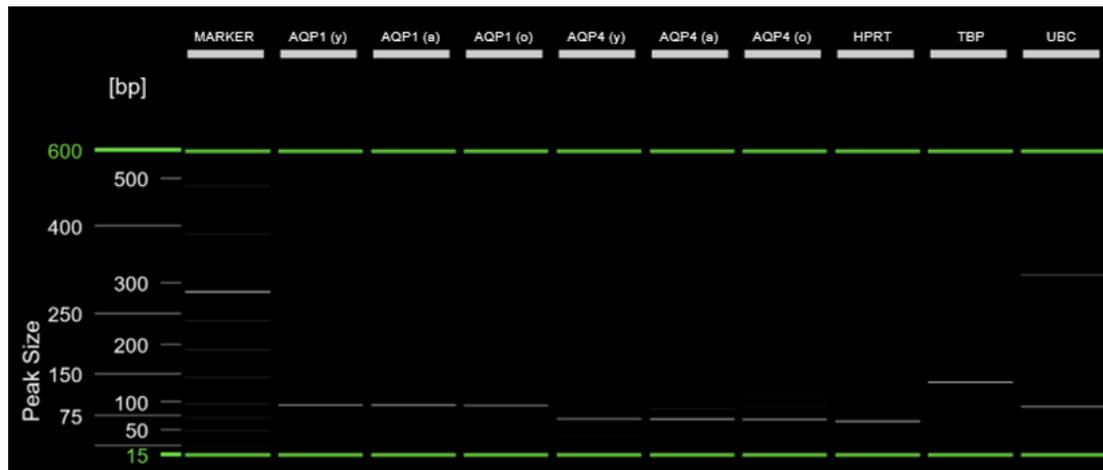


Abbildung 19: Gelbild der murinen RT-PCR-Produkte

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Das Gelbild wurde mithilfe der QIAxel-Systemsoftware erstellt und zeigt die zu erwartenden Produktgrößen für AQP1 (94 bp), AQP4 (69 bp), HPRT (65 bp), TBP (138 bp), UBC (92 bp). Dargestellt sind AQP1 und AQP4 von jeweils einer Maus aus jeder Alterkohorte.

Legende: y=young (2 Monate), a=adult (12 Monate), o=old (30 Monate)

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, altersabhängige Veränderungen im Plexus choroideus des Menschen und der Maus zu untersuchen. Basierend auf den vorbekannten Verteilungsmustern von AQP4 basolateral im Ependym und AQP1 apikal im PC, konnte sowohl in immunhistochemischen Färbungen eine AQP4-Expression im humanen PC als auch die Lokalisation des humanen AQP4-Gens auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Bei den Mäusen ließ sich eine Zunahme des AQP4-Verhältnisses von PC zu Parenchym bei alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen darstellen. Weitere Transport- und Schrankenproteine wie NKCC1 und Na/K-ATPase zeigten eine Veränderung im humanen PC auf. Zusätzlich konnten im Epithel des humanen PCs proliferierende Zellen bei einigen Körperspendern post mortal gefärbt werden. Außerdem ließen sich die beiden Rezeptoren ACE2 und TMPRSS2 auf dem Epithel des PCs nachweisen.

4.1 AQP4 im Plexus choroideus

In allen acht von uns untersuchten Körperspendern konnte eine AQP4-Expression im Epithel des PCs mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich AQP4 auch auf mRNA-Ebene mittels qPCR. Dieses Ergebnis stellte sich als unerwartet heraus, da Plexusepithelzellen laut der bisherigen Literatur lediglich AQP1 (3, 21, 56) aufweisen, während Ependymzellen AQP4 exprimieren (87, 88).

Die Altersverteilung unserer Körperspender ließ auf eine Ursache dieser Beobachtungen durch einen Alterungsprozess schließen, weshalb ein Modell mit unterschiedlich alten Mäusen hinzugezogen wurde, um diese Hypothese zu testen.

Bei der Maus fand sich zwar immunhistochemisch weder bei der jungen noch bei der alten Maus eine Expression von AQP4 im Plexusepithel, jedoch konnte auf mRNA-Ebene eine Zunahme der relativen Menge von AQP4 gezeigt

werden. Es gab zwar bisherige Studien, die das Vorkommen von AQP4 im PC der Ratte immunhistochemisch zeigten. Diese stellten sich jedoch als schwaches in-situ Hybridisierungssignal (89) oder als diffuse immunhistochemische zytoplasmatische Expression im Plexusepithel heraus (90). Allerdings konnte die Expression von AQP4 durch experimentelle hypoxische Bedingungen am PC von Mäusen induziert werden (86, 91).

Die Interpretation unserer Ergebnisse erfolgte mithilfe zweier Hypothesen, die in den Kapiteln **4.6** und **4.7** explizit beschrieben und in **Abb. 20** eingearbeitet wurden.

4.2 Verwertbarkeit der humanen qPCR-Daten

Die Analyse von humanem postmortalem Gewebe auf molekularer Ebene ist bisher nur wenig durchgeführt worden. Aus diesem Grund musste die Einordnung der Ergebnisse sehr sorgfältig angegangen werden. Aus bisherigen Arbeiten ließ sich beispielsweise an humanem PC post mortem mittels Immunoblot der NCEB (Natrium getriebener Chlorid Bikarbonat Austauscher) im Epithel des PCs nachweisen (21). Für eine qPCR-Analyse aus postmortalen mRNA wie in dieser Arbeit mussten Faktoren, welche die Stabilität der RNA beeinflussen, präzise beachtet und eingeordnet werden. Bisherige Untersuchungen bezüglich der RNA Degradation zeigten, dass diese von verschiedenen Ursachen abhängig ist. Zum einen spielte die Art des Gewebes eine Rolle. Gewebe mit hohem Ribonuklease-Gehalt wie Pankreas und Leber waren hierbei stärker von einem schnellen RNA Zerfall betroffen als Gewebe wie das Gehirn, welches bis zu 96 Stunden post mortem eine gute Stabilität zeigte (92). Des Weiteren stellte sich eine adäquate Normalisierung für die Proben als sehr wichtig heraus. Hierbei sollte eine Kontrolle mittels drei bis vier endogenen Referenzgenen, die eine hohe transkriptionelle Stabilität im jeweiligen Gewebe aufzeigen, durchgeführt werden (93). Zuletzt trugen insbesondere bei der humanen post mortem Gewebeanalyse andere Faktoren wie individuelle Lebensumstände der Körperspender, Todesursache und Umweltbedingungen zur Verwertbarkeit der Ergebnisse bei (92).

4.3 Abhängigkeit der RNA-Integrität auf die RT-qPCR

Die Auswirkungen der RIS-Werte auf die Effizienz der RT-qPCR musste vor allem bei der RNA-Isolation von Geweben mit einer langen post-mortem Zeit mitbeachtet werden. Hierbei spielten die Körperspender, die bis zu 11 Stunden nach Eintritt des Todes für die RNA-Isolation präpariert wurden, eine erhebliche Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass die C_T -Werte signifikant mit den RIS-Werten zusammenhängen. So führten erhöhte RIS-Werte zu niedrigeren C_T -Werten. Generell wurden RIS-Werte von mindestens 5 empfohlen, insbesondere bei langen Amplifikationsprodukten von über 400 bp. Kleinere Produkte zwischen einer Länge von 70-250 bp waren weniger abhängig von der RNA Qualität (94, 95). Daraus konnte nach Betrachtung der in dieser Arbeit verwendeten RIS-Werte eine Auswirkung der RNA-Integrität auf die Effizienz der RT-qPCR mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

4.4 Prozess des Alterns

Im Alter nimmt die Produktion der Liquormenge ab, was auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson diskutiert wird (96). Deswegen sollte insbesondere auf den Plexus choroideus als Hauptproduktionsstätte des Liquors ein besonderes Augenmerk hinsichtlich möglicher altersabhängiger Veränderungen gelegt werden.

Die Körperspender unterschieden sich in Geschlecht sowie Todesursache und Begleiterkrankungen (siehe **Tab. 1**). Demzufolge konnte eine Abhängigkeit von einem dieser Kriterien mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Auffällig dagegen zeigte sich das durchgehend hohe Alter (74 – 94 Jahre). Bei der histologischen Untersuchung der Gewebe konnten tatsächlich altersbedingte Auffälligkeiten entdeckt werden. Es fanden sich zahlreiche Psammom-Körperchen sowie ein mit Bindegewebe ausgefülltes, verdicktes Stroma zwischen Epithel und Blutgefäßen. Der hierbei deutlich verbreiterte Abstand zwischen Epithel und Blutgefäßen spiegelte sich höchstwahrscheinlich in einer erhöhten Diffusionsbarriere wider.

Bei Blick auf Altersveränderungen anderer Spezies, konnte bei 20 Monate alten Ratten eine Abnahme von AQP1 (97) und der Na/K-ATPase (98) im PC nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die PCs bei alten Schafen (7-10 Jahre) im Vergleich zu jungen Schafen (1-2 Jahre) eine Abnahme der Liquorsekretion mit einer Zunahme des Verhältnisses von Protein im Liquor zu Protein im Plasma bei gleichbleibendem Plasmaproteinspiegels (99). Darüber hinaus wurde vermutet, dass eine Abnahme der Liquorproduktion in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer steht (100, 101) und dass ein verminderter Liquorfluss Beeinträchtigungen auf kognitive Fähigkeiten haben könnte (102). Es ist somit davon auszugehen, dass diese altersabhängigen Veränderungen des Liquorflusses eine erhöhte Ausprägung bei einer Alzheimer-Erkrankung nach sich ziehen (86, 96).

4.5 Unterschiede der AQP4-Expression zwischen Mensch und Maus

Bei der Betrachtung der AQP4-Expression auf zellulärer Ebene von Mensch und Maus im PC zeigten sich zwischen diesen Spezies Unterschiede. Die Körperspender wiesen alle eine AQP4-Expression im Plexusepithel auf, während bei den alten Mäusen zwar AQP4 mRNA, jedoch keine AQP4-positiven Zellen nachgewiesen werden konnten.

Die Gründe für diese unterschiedlichen Expressionsmuster könnten vielseitig sein. Ein genereller Unterschied zwischen einzelner Spezies, in diesem Fall zwischen dem Menschen und der Maus, könnte Ursache dieser nicht übereinstimmenden Expressionsmuster sein. In bisherigen Arbeiten konnten solche Unterschiede zwischen verschiedener Spezies auf Protein- und mRNA-Ebene ebenfalls festgestellt werden. In den Speicheldrüsen konnte bei der Maus AQP1 und AQP4 während der prä- und postnatalen Entwicklung auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Beim Menschen dagegen fand sich AQP1 auch als Protein, während lediglich AQP4 mRNA detektiert werden kann, nicht jedoch AQP4 als Protein (103). In einem weiteren sekretorischen Organ wie dem exokrinen Pancreas ließ sich bei der Maus nur eine sehr schwache Expression von AQP1 feststellen, während der Mensch AQP1 und AQP4

mRNA aufwies, wovon wiederum nur AQP1 tatsächlich als Protein exprimiert wurde (104).

Ein weiterer Grund für die differente AQP4 Expression stellen die vermutlich unterschiedlichen Alterungsprozesse von Spezies dar. So lässt sich eine Maus mit Lebensspanne von 3-4 Jahren nicht unbedingt mit einem Menschen mit einer maximalen Lebensspanne von über 100 Jahren vergleichen (105).

Insbesondere altersbedingte Veränderungen und Prozesse wie beispielsweise subepitheliale Stromaverdickungen und Ablagerungen konnten nur bei den Körperspendern und nicht bei der alten Maus beobachtet werden.

Zusätzlich könnten auch die unterschiedliche Körper- und damit auch Gehirngröße sowie Druck- und Volumengrößen einen möglichen Einfluss auf diese Expression haben. Der makroskopische Aufbau vom PC der Maus unterschied sich von dem des Menschen. Während der murine PC sich als dünnes Blatt überzogen von Zellen im lateralen Ventrikel zeigte (9), stellte sich der humane PC als verzweigter Baum mit Zotten und einer ausgedehnten Tela choroidea im lateralen Ventrikel dar.

Zuletzt sollte noch die Möglichkeit miteinbezogen werden, dass die Translation des AQP4-Proteins in der Maus im Gegensatz zum Menschen unterdrückt wird. Einer Studie nach konnte gezeigt werden, dass die AQP4-Expression durch mehrere miRNAs herunterreguliert wurde (106). Außerdem ließ sich vor kurzem das RNA-Bindeprotein DDX4 als negativer Regulator für die AQP4-Expression in Mäusen identifizieren (107). Des Weiteren ließ sich in einer Studie unter hypoxischen Bedingungen eine AQP4-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene (hier geringer) beschreiben (86, 91).

4.6 AQP4-Expression als Kompensationsmechanismus

Unter der Berücksichtigung der zuvor genannten morphologischen und funktionellen Veränderungen, die mit Alter und Krankheit auftreten, könnte die AQP4-Expression im Plexusepithel als kompensatorischer Mechanismus aufgefasst werden, welcher der Liquorabnahme entgegen wirken soll (**Abb.**

20C). Die Ergebnisse der AQP4-Expression unterstützten hierbei diese Hypothese. Dieser Mechanismus könnte einerseits als konstitutive Expression erfolgen, andererseits wäre ein regulierter Mechanismus ähnlich wie bei dem ADH-abhängigen AQP2-Einbau in der Niere vorstellbar. Hierbei führt das antidiuretische Hormon (ADH), welches im Hypothalamus produziert wird, über eine Signalkaskade mit der cyclischen Adenylatcyclase, cAMP und der Proteinkinase A zu einem Einbau von AQP2 in das Sammelrohr der Niere (108). Solch ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei AQP4 greifen, wenn es zu einer Reduzierung der Liquorproduktion kommt. Dafür sprach die intrazytoplasmatische Lokalisation, wie sie in dieser Arbeit in einigen Zellen beobachtet werden konnte (86).

4.7 Übertragung der ependymalen und astrozytären Funktion von AQP4 auf den PC

Alternativ ließ sich über die Funktion von AQP4 im Ependym und an Astrozyten eine weitere Hypothese ableiten. AQP4 wird auf der basolateralen Seite von Ependymzellen (6, 66) und an subpialen und perivaskulären Endfüßen von Astrozyten exprimiert. Hierbei entspricht die basolaterale Lokalisation dem Expressionsmuster von AQP4 im humanen PC. Daraus könnte gefolgert werden, dass sich Plexusepithelzellen im Laufe der Zeit zu Ependymzellen differenzieren und dabei auch deren Eigenschaften annehmen. Demzufolge würde sich hierbei der Wasserfluss umkehren und Wasser aus den Ventrikeln über das Plexusepithel in die Blutgefäße des PCs zurückfließen (**Abb. 20D**). Dies hätte dann eine Abnahme der Liquorproduktion zu Folge, was wiederum konsistent zu den bisherigen Altererscheinungen wäre (86).

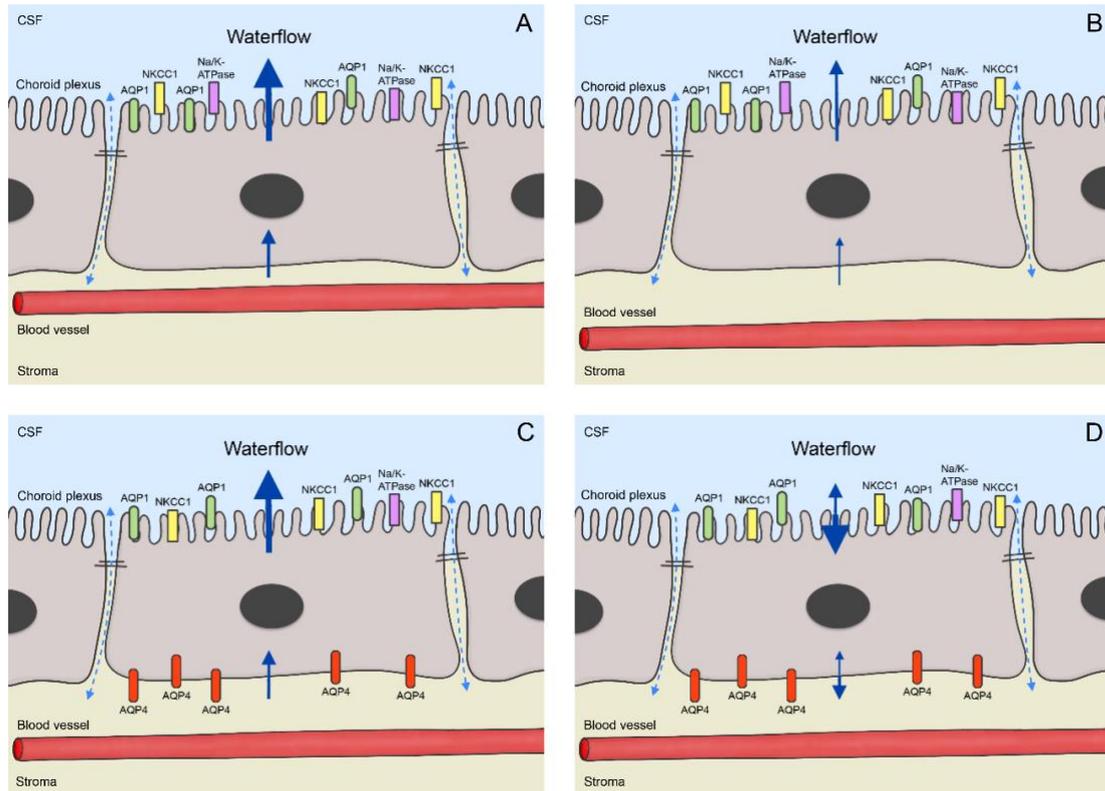


Abbildung 20: Grafische Darstellung der Hypothesen

Abbildung übernommen aus Deffner et al. 2022 (86). Sie zeigt eine grafische Darstellung der in dieser Studie untersuchten Kanäle und Transporter und deren vermuteter Einfluss auf den Wasserfluss und die Liquorproduktion im Alter. (A) zeigt eine PC Epithelzelle eines erwachsenen Menschen mit normalem Wasserfluss und Liquorproduktion. (B) zeigt eine gealterte PC Epithelzelle mit reduziertem Wasserfluss und reduzierter Liquorproduktion ohne basolaterale AQP4-Expression. Man beachte die vergrößerte Diffusionsdistanz zwischen dem Blutgefäß und dem Epithel. (C) erklärt unsere erste Hypothese: AQP4 wird exprimiert, um die reduzierte Liquorproduktion im Alter zu kompensieren. Die PC-Zellen exprimieren AQP4 basolateral, um einen höheren transzellulären Wasserfluss zu erzeugen. Dies führt zu einem normalen Wasserfluss und Liquorproduktion. (D) erklärt unsere alternative Hypothese: Die Expression von AQP4 führt zu einem invertierten transzellulären Wasserfluss, der eine reduzierte Liquorproduktion mit sich bringt.

4.8 Einfluss auf den „glymphatic pathway“

Sowohl das Szenario der Kompensation als auch das Szenario Differenzierung hätte Auswirkungen auf den „glymphatic pathway“ zufolge. Dieser beschreibt einen Austausch von Liquor und interstitieller Flüssigkeit sowie anfallender Metaboliten im Gehirn (109). Der Transport findet hierbei peri-arteriell und peri-venös über die mit AQP4 ausgestatteten Endfüßchen der Astrozyten statt. Liquor wird mittels eines para-arteriellen Influx über AQP4 von den Astrozyten aufgenommen und über einen para-venösen Efflux wieder über AQP4

abgegeben. Interstitiell gelöste Stoffe werden hierbei mit aus dem Gehirn gewaschen (110). AQP4 könnte bei einer solchen Liquorabgabe aus den Ventrikeln und Liquoraufnahme in das Stroma des PC eine Rolle spielen. Eine MRT-Studie mit AQP-Knockout-Mäusen kam zu dem Ergebnis, dass AQP4 im Vergleich zu AQP1 einen höheren Einfluss auf die Liquorproduktion hat (111). Die Richtung der Durchlässigkeit von Aquaporinen für Wasser erfolgte entlang eines osmotischen und hydrostatischen Gradienten (56). Eine verminderte Expression der Na/K-ATPase (97) (siehe **Abb. 9** in dieser Arbeit) hätte einen geringeren osmotischen Druck zur Folge, wodurch Liquor aus den Ventrikeln in umgekehrter Reihenfolge absorbiert werden könnte. Eine aktuelle Studie (74) beschrieb durch Untersuchung des PC bei Ratten neben AQP1 auch einen erheblichen Effekt des Co-Transporters NKCC1 auf den apikalen Wasserfluss in die Ventrikel. Dagegen hielt eine andere Studie (75) über isolierte PC-Zellen dagegen, dass NKCC1 für einen Einstrom von Wasser verantwortlich ist. Dieser Einstrom hält das Zellwasservolumen, das für die Liquorsekretion benötigt wird, aufrecht. Diese Debatte ist noch nicht abschließend geklärt (hierfür siehe Reviews: (18), (17)). Unsere Ergebnisse zum schnellen AQP4-Kanal (112) legten nahe, dass der Wasserhaushalt über das Epithel verändert werden kann. Allerdings ist ungewiss, ob sich dieser Kompensationsmechanismus als vorteilhaft erweist (86).

4.9 Proliferation post mortem im Epithel des Plexus choroideus

In dieser Arbeit konnte post mortem eine Proliferation im Epithel des humanen Plexus choroideus nachgewiesen werden. Bei der Maus dagegen ließen sich proliferierende Zellen lediglich in der subependymalen Zone und nicht im PC selbst beobachten (113). Hierbei muss beachtet werden, dass das Plexusepithel durch die Abstammung vom Neurothel als postmitotisch gilt (47). Jedoch handelt es sich histologisch um ein Epithel, welches mit Basalmembran und Polarität die typischen Charakteristika eines Epithels enthält. Epithelien werden demzufolge auch als regenerativ angesehen, sodass hier Proliferation eine Rolle spielt. Die Ergebnisse bestätigen diese Eigenschaft, jedoch zeigt sich

eine sehr geringe Turnover-Rate und nicht alle Körperspender wiesen Proliferation auf. Die Beobachtungen in dieser Arbeit geben einen Aufschluss, dass in geringem Umfang Proliferation auch im hohen Alter noch im humanen PC stattfindet. Da lediglich AQP1 und kein AQP4 bei den proliferierenden Epithelzellen exprimiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die AQP4-Expression nicht durch die Entstehung von neuen Zellen getriggert wird, sondern interne Zellkaskaden dafür verantwortlich sein müssen, dass AQP4 von bestimmten Epithelzellen in die Zellmembran eingebaut wird.

4.10 Neuroinvasion von SARS-CoV2

SARS-CoV2 ist für eine Vielzahl von neurologischen Symptomen sowie neurologischen Langzeitfolgen verantwortlich (77). Um in den Liquorraum und damit in das ZNS zu gelangen und solche Symptome auszulösen, nutzen hierbei virale Erreger häufig die olfaktorischen Hüllzellen des *Nervus olfactorius* (114). Jedoch lassen die fehlende Expression des ACE2-Rezeptors auf olfaktorischen Neuronen darauf schließen, dass zwar eine Vielzahl der COVID-19 Patienten an Geruchsverlust leiden, diese aber in keinem Zusammenhang mit dem Zugang von SARS-CoV2 in das Gehirn steht (115, 116).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist der PC mitverantwortlich für das Ausbilden der BLS und eignet sich mit seinen fenestrierten Kapillaren in der *Tela choroidea* als eine mögliche Route für Erreger darzustellen, um in den Liquorraum und in das Gehirn zu gelangen (117, 118). Hierbei können zwei mögliche Eintrittswege in Betracht kommen: [1] über die gefenesterten Kapillaren und [2] apikal über das Plexusepithel. Tatsächlich konnte in einer früheren Studie eine ACE2-Lokalisation im Bürstensaum des PCs nachgewiesen werden, jedoch handelte es sich hierbei zum einen lediglich um eine Enzymaktivität und keine histo-morphologische Aufarbeitung und zum anderen wurden diese Untersuchungen am PC von Schafen vorgenommen (119). In dieser Arbeit ließ sich zeigen, dass ACE2 und TMPRSS2 im Plexusepithel auf Proteinebene exprimiert sind und so als mögliche Eintrittspforte für SARS-CoV2 ins Gehirn dienen können. Durch die fast ausschließlich zytoplasmatische und

nur vereinzelt apikale Lokalisation dieser beiden Proteinasen, stellt sich die Frage nach der physiologischen Funktionalität. Möglich wäre hierbei ein zellulärer Mechanismus, der einen Einbau dieser Proteine in die apikale Zellmembran nach sich zieht. Um einen solchen Mechanismus genauer zu untersuchen, müssten weitere Forschungen vor allem im physiologischen Bereich erfolgen (79).

4.11 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Expression von AQP4 im Epithel von humanem PC sowie altersabhängig auf mRNA-Ebene im PC der Maus gezeigt werden. Diese Expression in alterndem Plexusgewebe hat einen Einfluss auf die Modellvorstellungen über den Wasserfluss innerhalb des Plexusepithels. So könnte AQP4 als Kompensationsmechanismus für eine sinkende Liquorproduktion im Alter dienen. Alternativ könnte AQP4 inkorrekt exprimiert werden und dadurch die Liquorproduktion reduzieren (86). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Proliferation von lediglich AQP1 positiven Plexusepithelzellen lässt auf eine möglicherweise interne Zellkaskade als Ursache für den Einbau von AQP4 schließen. Zuletzt konnte die Lokalisation von ACE2 und TMPRSS2 im Plexusepithel gezeigt werden und damit eine mögliche Eintrittspforte von SARS-CoV2 ins Gehirn bestimmt werden (79).

5 Zusammenfassung

Der Plexus choroideus des Gehirns, welcher in die Ventrikel hineinragt, besteht aus spezialisierten Ependymzellen, Blutgefäßen und Stroma und ist mitverantwortlich für die Produktion des Liquors. Die spezialisierten Ependymzellen sind Teil der Blut-Liquor-Schranke und weisen einen epithelialen Charakter mit Polarität, Basallamina und Tight Junctions auf. Sie enthalten eine Vielzahl von Transport- und Schrankenproteinen, die in einem komplexen Zusammenspiel an der Liquorproduktion beteiligt sind. AQP1 wird apikal auf den Plexusepithelzellen exprimiert, AQP4 kommt basolateral auf den Ependymzellen, welche die Ventrikel auskleiden, sowie den Endfüßen von Astrozyten vor.

Ziel dieser Studie war es, verschiedene Wasserkanäle, Transportproteine und Rezeptoren auf dem Epithel des Plexus choroideus zu untersuchen, um so altersabhängige Veränderungen und deren mögliche Auswirkungen auf die Liquorproduktion aufzudecken. Die Analysen erfolgten mittels Immunhistochemie am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop sowie auf molekularer Ebene mittels qPCR. Es wurden 8 Körperspender für die Immunhistochemie und 3 Körperspender für die qPCR verwendet. Um die Ergebnisse der Körperspender besser bezüglich des Alterungsprozess einordnen zu können, wurde ein Mausmodell mit Gehirnen von jungen (2 Monate), erwachsenen (12 Monate) und alten (30 Monate) Mäusen etabliert.

Wie bereits bekannt, ließ sich AQP1 apikal auf dem humanen Plexusepithel finden. Zusätzlich konnte jedoch basolateral die Expression von AQP4 in allen untersuchten Körperspendern nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte mittels qPCR bestätigt werden. NKCC1 zeigte ein identisches Muster wie AQP1, hier ließ sich keine Korrelation bezüglich AQP4 identifizieren. Na/K-ATPase dagegen zeigte einen Trend für eine inverse Korrelation mit AQP4. Des Weiteren ließen sich ACE2 und TMPRSS2, bekannt als Rezeptoren für den Eintritt von SARS-CoV2, sehr stark zytoplasmatisch in den Plexusepithelzellen

feststellen. Außerdem konnten proliferierende Zellen post mortem im Epithel bei einigen Körperspendern nachgewiesen werden.

Bei der Maus konnte AQP1 ebenfalls in allen drei Alterskohorten apikal auf dem Plexusepithel nachgewiesen werden. AQP4-positive Zellen im Plexus choroideus konnten dagegen weder bei der alten noch bei der jungen Maus identifiziert werden. Jedoch ließ sich auf mRNA-Ebene eine Zunahme von AQP4 bei der alten im Vergleich zur jungen Maus zeigen.

Zusammenfassend konnten zahlreiche Veränderungen im Plexus choroideus gezeigt werden, die einen Zusammenhang mit dem Altern nahelegen.

Insbesondere der Nachweis für AQP4 im humanen Plexus choroideus sowie altersabhängige Veränderungen von AQP4 auf mRNA-Ebene bei der Maus ziehen Konsequenzen für den Wasserfluss durch das Plexusepithel nach sich.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Liquorproduktion im Alter abnimmt. Hieraus können sich somit zwei Hypothesen für unsere Ergebnisse ableiten. Zum einen könnte sich AQP4 als Kompensationsmechanismus darstellen: Hierbei wird AQP4 über einen molekularen Mechanismus basolateral in die Plexusepithelzellen eingebaut, um somit der nachlassenden Liquorproduktion entgegen zu wirken und diese aufrecht zu erhalten. Zum anderen könnte AQP4 den Grund für den verminderten Liquorfluss darstellen: Hierbei wird AQP4 inkorrekt in das Plexusepithel eingebaut und führt über einen einwärts gerichteten Wasserfluss zu einer verlangsamten Liquorproduktion.

Um diese Hypothesen konkreter auszubauen, sollten weitere Untersuchungen an isoliertem Plexusgewebe oder isolierten Plexuszellen durchgeführt werden. Außerdem sollten weitere Experimente mit alterndem Plexusgewebe in Angriff genommen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*. 2009;31(4):497-511.
2. Møllgard K, Saunders NR. The development of the human blood-brain and blood-CSF barriers. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1986;12(4):337-58.
3. Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):75-88.
4. Ghersi-Egea JF, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*. 2018;135(3):337-61.
5. Benninghoff A, Drenckhahn D. Anatomie: Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut / [unter Mitarb. von Esther Asan ...]: Urban & Schwarzenberg; 2004.
6. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Reichenbach A, Mack AF. Ependymal Cells☆. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier; 2015.
7. Cornford EM, Varesi JB, Hyman S, Damian RT, Raleigh MJ. Mitochondrial content of choroid plexus epithelium. *Exp Brain Res*. 1997;116(3):399-405.
8. Whish S, Dziegielewska KM, Møllgard K, Noor NM, Liddel SA, Habgood MD, et al. The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Front Neurosci*. 2015;9:16.
9. Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(7):561-74.
10. Praetorius J, Damkier HH. Transport across the choroid plexus epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017;312(6):C673-C86.
11. Bryant DM, Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(11):887-901.
12. Ghersi-Egea JF, Finnegan W, Chen JL, Fenstermacher JD. Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience*. 1996;75(4):1271-88.
13. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2011;128(6):309-16.
14. Cserr HF. Physiology of the choroid plexus. *Physiol Rev*. 1971;51(2):273-311.
15. Orešković D, Radoš M, Klarica M. Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics. *Neuroscience*. 2017;354:69-87.
16. Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr Top Dev Biol*. 2005;71:1-52.

17. MacAulay N, Rose CR. CrossTalk opposing view: NKCC1 in the luminal membrane of choroid plexus is outwardly directed under basal conditions and contributes directly to cerebrospinal fluid secretion. *J Physiol.* 2020;598(21):4737-9.
18. Alvarez-Leefmans FJ. CrossTalk proposal: Apical NKCC1 of choroid plexus epithelial cells works in the net inward flux mode under basal conditions, maintaining intracellular Cl(-) and cell volume. *J Physiol.* 2020;598(21):4733-6.
19. Brown PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience.* 2004;129(4):957-70.
20. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev.* 2013;93(4):1847-92.
21. Praetorius J, Nielsen S. Distribution of sodium transporters and aquaporin-1 in the human choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(1):C59-67.
22. Speake T, Whitwell C, Kajita H, Majid A, Brown PD. Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. *Microsc Res Tech.* 2001;52(1):49-59.
23. Kaiser K, Bryja V. Choroid Plexus: The Orchestrator of Long-Range Signalling Within the CNS. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(13):4760.
24. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 2015;advance online publication.
25. Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluids. *J Inherit Metab Dis.* 1993;16(4):617-38.
26. CE. J. The choroid plexus. In: BH AGS, editor. *Encyclopedia of Neuroscience Vol 1.* New York: Elsevier Science; 1999. p. 384 – 7.
27. Burdo JR, Connor JR. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals.* 2003;16(1):63-75.
28. Lu J, Kaur C, Ling EA. Expression and upregulation of transferrin receptors and iron uptake in the epi-plexus cells of different aged rats injected with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Anat.* 1995;187 (Pt 3):603-11.
29. Tabata H, Kobayashi M, Ikeda JH, Nakao N, Saito TR, Tanaka M. Characterization of multiple first exons in murine prolactin receptor gene and the effect of prolactin on their expression in the choroid plexus. *J Mol Endocrinol.* 2012;48(2):169-76.
30. Zemo DA, McCabe JT. Salt-loading increases vasopressin and vasopressin 1b receptor mRNA in the hypothalamus and choroid plexus. *Neuropeptides.* 2001;35(3-4):181-8.
31. Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology.* 2000;141(4):1434-41.
32. Wong ML, Licinio J, Pasternak KI, Gold PW. Localization of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor mRNA in adult rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Endocrinology.* 1994;135(5):2275-8.
33. Bondy C, Werner H, Roberts CT, Jr., LeRoith D. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat

- brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience*. 1992;46(4):909-23.
34. Nico B, Mangieri D, Corsi P, De Giorgis M, Vacca A, Roncali L, et al. Vascular endothelial growth factor-A, vascular endothelial growth factor receptor-2 and angiopoietin-2 expression in the mouse choroid plexuses. *Brain Res*. 2004;1013(2):256-9.
35. Gonzalez AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res*. 1995;701(1-2):201-26.
36. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology*. 2017;18:123.
37. Lauer AN, Tenenbaum T, Schrotten H, Schwerk C. The diverse cellular responses of the choroid plexus during infection of the central nervous system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018;314(2):C152-C65.
38. Wolburg K, Gerhardt H, Schulz M, Wolburg H, Engelhardt B. Ultrastructural localization of adhesion molecules in the healthy and inflamed choroid plexus of the mouse. *Cell and Tissue Research*. 1999;296(2):259-69.
39. Steffen BJ, Breier G, Butcher EC, Schulz M, Engelhardt B. ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *Am J Pathol*. 1996;148(6):1819-38.
40. Meeker RB, Williams K, Killebrew DA, Hudson LC. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adh Migr*. 2012;6(5):390-6.
41. Schwerk C, Tenenbaum T, Kim KS, Schrotten H. The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9.
42. Figueiredo CA, Steffen J, Morton L, Arumugam S, Liesenfeld O, Deli MA, et al. Immune response and pathogen invasion at the choroid plexus in the onset of cerebral toxoplasmosis. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):17.
43. Wilting J, Christ B. An experimental and ultrastructural study on the development of the avian choroid plexus. *Cell Tissue Res*. 1989;255(3):487-94.
44. Catala M. Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebro-spinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges and choroid plexuses. *Arch Anat Cytol Pathol*. 1998;46(3):153-69.
45. Sturrock RR. A morphological study of the development of the mouse choroid plexus. *J Anat*. 1979;129(Pt 4):777-93.
46. Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR. Development of the choroid plexus. *Microsc Res Tech*. 2001;52(1):5-20.
47. Liddel SA, Dziegielewska KM, Vandenberg JL, Saunders NR. Development of the lateral ventricular choroid plexus in a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2010;7:16.
48. Watanabe M, Kang YJ, Davies LM, Meghpara S, Lau K, Chung CY, et al. BMP4 sufficiency to induce choroid plexus epithelial fate from embryonic stem cell-derived neuroepithelial progenitors. *J Neurosci*. 2012;32(45):15934-45.
49. Korzhevskii DE. Proliferative zones in the epithelium of the choroid plexuses of the human embryo brain. *Neurosci Behav Physiol*. 2000;30(5):509-12.

50. Safaee M, Oh MC, Bloch O, Sun MZ, Kaur G, Auguste KI, et al. Choroid plexus papillomas: advances in molecular biology and understanding of tumorigenesis. *Neuro Oncol.* 2013;15(3):255-67.
51. Barkho BZ, Monuki ES. Proliferation of Cultured Mouse Choroid Plexus Epithelial Cells. *PLoS ONE.* 2015;10(3).
52. Marques F, Sousa JC, Brito MA, Pahnke J, Santos C, Correia-Neves M, et al. The choroid plexus in health and in disease: dialogues into and out of the brain. *Neurobiology of Disease.* 2017;107(Supplement C):32-40.
53. Crossgrove JS, Li GJ, Zheng W. The choroid plexus removes beta-amyloid from brain cerebrospinal fluid. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230(10):771-6.
54. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol.* 2009;10(5):514-23.
55. Korzhhevskii DE. Current concepts of lamellar calcifications (psammoma bodies) in the human choroid plexus and meninges. *Morfologiya.* 1997;112(4):87-90.
56. Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, et al. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol.* 1993;265(4 Pt 2):F463-76.
57. Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys.* 2006;39(4):361-96.
58. Ishibashi K, Kondo S, Hara S, Morishita Y. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am J Physiol-Reg I.* 2011;300(3):R566-R76.
59. Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(24):11110-4.
60. Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14648-54.
61. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, et al. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature.* 2000;407(6804):599-605.
62. Hub JS, de Groot BL. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(4):1198-203.
63. Au CG, Cooper ST, Lo HP, Compton AG, Yang N, Wintour EM, et al. Expression of aquaporin 1 in human cardiac and skeletal muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36(5):655-62.
64. Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the Aquaporin Chip in Secretory and Resorptive Epithelia and Capillary Endothelia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(15):7275-9.
65. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *The FASEB Journal.* 2005;19(1):76-8.
66. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells:

- high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 1997;17(1):171-80.
67. Binder DK, Nagelhus EA, Ottersen OP. Aquaporin-4 and epilepsy. *Glia.* 2012;60(8):1203-14.
68. Wolburg H. Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch.* 1995;36(2):239-58.
69. Mack A, Neuhaus J, Wolburg H. Relationship between orthogonal arrays of particles and tight junctions as demonstrated in cells of the ventricular wall of the rat brain. *Cell Tissue Res.* 1987;248(3):619-25.
70. Welch K. SECRETION OF CEREBROSPINAL FLUID BY CHOROID PLEXUS OF THE RABBIT. *Am J Physiol.* 1963;205:617-24.
71. Davson H, Segal MB. The effects of some inhibitors and accelerators of sodium transport on the turnover of ^{22}Na in the cerebrospinal fluid and the brain. *J Physiol.* 1970;209(1):131-53.
72. Masuzawa T, Ohta T, Kawamura M, Nakahara N, Sato F. Immunohistochemical localization of Na^+ , K^+ -ATPase in the choroid plexus. *Brain Res.* 1984;302(2):357-62.
73. Bairamian D, Johanson CE, Parmelee JT, Epstein MH. Potassium cotransport with sodium and chloride in the choroid plexus. *J Neurochem.* 1991;56(5):1623-9.
74. Steffensen AB, Oernbo EK, Stoica A, Gerkau NJ, Barbuskaite D, Tritsarlis K, et al. Cotransporter-mediated water transport underlying cerebrospinal fluid formation. *Nat Commun.* 2018;9(1):2167.
75. Gregoriades JMC, Madaris A, Alvarez FJ, Alvarez-Leefmans FJ. Genetic and pharmacological inactivation of apical Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter 1 in choroid plexus epithelial cells reveals the physiological function of the cotransporter. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;316(4):C525-C44.
76. Schilling J, Lehfeld A-S, Schumacher D, Diercke M, Buda S, Haas W, et al. Disease severity of the first COVID-19 wave in Germany using reporting data from the national notification system. Robert Koch-Institut; 2021. p. 1--19.
77. Leonardi M, Padovani A, McArthur JC. Neurological manifestations associated with COVID-19: a review and a call for action. *J Neurol.* 2020;267(6):1573-6.
78. Berlit P, Bosel J, Gahn G, Isenmann S, Meuth SG, Nolte CH, et al. "Neurological manifestations of COVID-19" - guideline of the German society of neurology. *Neurol Res Pract.* 2020;2:51.
79. Deffner F, Scharr M, Klingenstein S, Klingenstein M, Milazzo A, Scherer S, et al. Histological Evidence for the Enteric Nervous System and the Choroid Plexus as Alternative Routes of Neuroinvasion by SARS-CoV2. *Front Neuroanat.* 2020;14:596439.
80. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-80.e8.
81. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004;203(2):631-7.

82. De Felice FG, Tovar-Moll F, Moll J, Munoz DP, Ferreira ST. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the Central Nervous System. *Trends Neurosci.* 2020;43(6):355-7.
83. Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, et al. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis.* 2020;94:55-8.
84. Wagner A. Die Verankerung von Aquaporin-4 durch den Dystrophinassozierten Proteinkomplex im Ductus cochlearis des Menschen und der Ratte: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2017.
85. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.
86. Deffner F, Gleiser C, Mattheus U, Wagner A, Neckel PH, Fallier-Becker P, et al. Aquaporin-4 expression in the human choroid plexus. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2022;79(2).
87. Nagelhus EA, Mathiesen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience.* 2004;129(4):905-13.
88. Mack AF, Wolburg H. A Novel Look at Astrocytes: Aquaporins, Ionic Homeostasis, and the Role of the Microenvironment for Regeneration in the CNS. *The Neuroscientist.* 2013;19(2):195 - 207.
89. Venero JL, Vizuete ML, Ilundain AA, Machado A, Echevarria M, Cano J. Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs. *Neuroscience.* 1999;94(1):239-50.
90. Speake T, Freeman LJ, Brown PD. Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 water channels in rat choroid plexus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2003;1609(1):80-6.
91. Trillo-Contreras JL, Ramirez-Lorca R, Hiraldo-Gonzalez L, Sanchez-Gomar I, Galan-Cobo A, Suarez-Luna N, et al. Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(10):3515-26.
92. Scrivano S, Sanavio M, Tozzo P, Caenazzo L. Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: a review of current evidence. *Int J Legal Med.* 2019;133(6):1629-40.
93. Vennemann M, Koppelkamm A. Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1-3):76-82.
94. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):126-39.
95. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
96. Kratzer I, Ek J, Stolp H. The molecular anatomy and functions of the choroid plexus in healthy and diseased brain. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020;1862(11):183430.
97. Masseguin C, LePanse S, Corman B, Verbavatz JM, Gabrion J. Aging affects choroidal proteins involved in CSF production in Sprague-Dawley rats. *Neurobiology of Aging.* 2005;26(6):917-27.

98. Kvitnitskaia-Ryzhova T, Shkapenko AL. [A comparative ultracytochemical and biochemical study of the ATPases of the choroid plexus in aging]. *Tsitologiya*. 1992;34(6):81-7.
99. Chen RL, Kassem NA, Redzic ZB, Chen CPC, Segal MB, Preston JE. Age-related changes in choroid plexus and blood–cerebrospinal fluid barrier function in the sheep. *Experimental Gerontology*. 2009;44(4):289-96.
100. Serot JM, Bene MC, Faure GC. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci*. 2003;8:s515-21.
101. Serot JM, Zmudka J, Jouanny P. A possible role for CSF turnover and choroid plexus in the pathogenesis of late onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;30(1):17-26.
102. Attier-Zmudka J, Serot JM, Valluy J, Saffarini M, Macaret AS, Diouf M, et al. Decreased Cerebrospinal Fluid Flow Is Associated With Cognitive Deficit in Elderly Patients. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:87.
103. Delporte C. Aquaporins in salivary glands and pancreas. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(5):1524-32.
104. Delporte C, Bryla A, Perret J. Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(2):166.
105. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*. 2016;152:244-8.
106. Vandebroek A, Yasui M. Regulation of AQP4 in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5).
107. Pisani F, Simone L, Mola MG, De Bellis M, Frigeri A, Nicchia GP, et al. Regulation of aquaporin-4 expression in the central nervous system investigated using M23-AQP4 null mouse. *Glia*. 2021.
108. Boone M, Deen PM. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch*. 2008;456(6):1005-24.
109. Nedergaard M. Garbage Truck of the Brain. *Science*. 2013;340(6140):1529-30.
110. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Science Translational Medicine*. 2012;4(147):147ra11.
111. Igarashi H, Tsujita M, Kwee IL, Nakada T. Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 17O JVCPE MRI study in knockout mice. *Neuroreport*. 2014;25(1):39-43.
112. Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, Kamegawa A, Nishikawa K, Tanimura Y, et al. Mechanism of Aquaporin-4's Fast and Highly Selective Water Conduction and Proton Exclusion. *J Mol Biol*. 2009;389(4):694-706.
113. Thomas LB, Gates MA, Steindler DA. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia*. 1996;17(1):1-14.
114. Briguglio M, Bona A, Porta M, Dell'Osso B, Pregliasco FE, Banfi G. Disentangling the Hypothesis of Host Dysosmia and SARS-CoV-2: The Bait Symptom That Hides Neglected Neurophysiological Routes. *Front Physiol*. 2020;11:671.

115. Klingenstein M, Klingenstein S, Neckel PH, Mack AF, Wagner AP, Kleger A, et al. Evidence of SARS-CoV2 Entry Protein ACE2 in the Human Nose and Olfactory Bulb. *Cells Tissues Organs*. 2020;209(4-6):155-64.
116. Butowt R, Meunier N, Bryche B, von Bartheld CS. The olfactory nerve is not a likely route to brain infection in COVID-19: a critical review of data from humans and animal models. *Acta Neuropathol*. 2021.
117. Wolburg H, Mack AF. Comment on the topology of mammalian blood–cerebrospinal fluid barrier. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*. 2014;20(4):70-2.
118. Pfeiffer F, Mack AF, Wolburg H. Topological Aspects of the Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers and Their Relevance in Inflammation. In: Lyck R, Enzmann G, editors. *Blood Brain Barrier and Inflammation. Progress in Inflammation Research Series*2017. p. 23-48.
119. Marshall AC, Shaltout HA, Pirro NT, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. Antenatal betamethasone exposure is associated with lower ANG-(1-7) and increased ACE in the CSF of adult sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(7):R679-88.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde am Institut für Klinischen Anatomie und Zellanalytik unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Bernhard Hirt, Herrn PhD Andreas Mack und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn PhD Andreas Mack in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser.

Die Einschläferung und Dekapitation der Mäuse erfolgte durch Melanie Scharr und Dr. rer. Nat. Peter Neckel.

Die Extraktion der humanen Gewebe (Plexus choroideus und Striatum) wurde von Herrn Dr. med. Andreas Wagner und Herrn Dr. rer. nat. Peter Neckel durchgeführt.

Die Feinpräparation des PCs wurde von Herrn PhD Andreas Mack und nach Einarbeitung durch ihn von mir eigenständig durchgeführt.

Die Einbettung der Gewebe sowie deren Schneiden am Kryostaten wurde nach Einarbeitung durch Herrn Ulrich Mattheus von mir eigenständig durchgeführt

Die Immunhistochemie wurde nach Einarbeitung durch Herrn Ulrich Mattheus von mir eigenständig durchgeführt.

Die konvokale Mikroskopie wurde nach Einarbeitung durch Herrn PhD Andreas Mack von mir eigenständig durchgeführt.

Die Isolierung der RNA, die Umschreibung in cDNA und die qPCR wurden nach Einarbeitung durch Frau Lidia Garcia-Pradas, Frau Sarah Frosch und Frau Melanie Scharr von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser und nach Einarbeitung durch sie von mir eigenständig durchgeführt.

Die in dieser Arbeit vorkommenden Abbildungen wurden folgendermaßen erstellt:

Abb. 1, 5-7, 10, 11, 17, 19 und 20 wurden von mir eigenständig erstellt.

Abb. 3, 8, 12 und 13 wurden von Herrn PhD Andreas Mack und mir gemeinsam erstellt.

Abb. 4, 9 und 14 wurden von Herrn PhD Andreas Mack erstellt.

Abb. 15, 16 und 18 wurden von Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser und Herrn PhD Andreas Mack erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Herrn Professor Dr. med. Bernhard Hirt, Herrn PhD Andreas Mack und Frau Dr. rer. nat. Corinna Gleiser verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Teile dieser Arbeit sind in vorherigen Veröffentlichungen (Deffner et al. 2020 und Deffner et al. 2022) bereits verwendet worden.

Tübingen, den 20.03.2022

Felix Deffner

A handwritten signature in black ink, consisting of the letters 'F.' followed by a stylized 'D' and a long horizontal stroke extending to the right.

8 Veröffentlichungen

Deffner F, Scharr M, Klingenstein S, Klingenstein M, Milazzo A, Scherer S, et al. Histological Evidence for the Enteric Nervous System and the Choroid Plexus as Alternative Routes of Neuroinvasion by SARS-CoV2. *Front Neuroanat.* 2020

Deffner F, Gleiser C, Mattheus U, Wagner A, Neckel PH, Fallier-Becker P, et al. Aquaporin-4 expression in the human choroid plexus. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2022

9 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Bernhard Hirt, der mich mit diesem Projekt von Anfang unterstützt hat, der mit seinen Anregungen und Verbesserungen wichtige Beiträge geleistet hat und der sich sehr für mich bei der Bewerbung für das Stipendium des IZKFs eingesetzt hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Andreas Mack bedanken. Ohne ihn wären die Veröffentlichungen und diese Arbeit nicht möglich gewesen. Er war der Kopf dieses Projekts und immer zur Stelle, sobald ich ihn mit Fragen (und davon hatte ich sehr viele) überhäuft habe.

Außerdem möchte ich mich bei Corinna Gleiser bedanken, die mich in der großen Welt der Molekularbiologie bei Durchführung, Auswertung und Darstellung meiner Daten intensiv unterstützt hat.

Desweiteren gilt mein Dank Ulrich Mattheus, der mich von Beginn an in alle histologischen Methoden geduldig eingeführt hat und bei allen möglichen Problemen immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Peter Neckel danke ich für seine sehr hilfreichen Beiträgen zu den Veröffentlichungen und zu dieser Arbeit sowie seinen fast immer hilfreichen Tricks und Kniffen, wenn Dinge nicht nach Plan liefen.

Bei Lidia Garcia-Pradas, Sarah Frosch und Melanie Scharr möchte ich mich für ihre gedulige Einführung und Hilfestellung bei der für mich nicht immer ganz einfachen Durchführung der Molekularbiologie bedanken.

Außerdem danke ich dem restlichen Team des Instituts für Klinische Anatomie und Zellanalytik, die mich sehr schnell aufgenommen haben und in deren Arbeitsatmosphäre ich mich sofort wohlfühlt habe. Ebenfalls möchte ich hiermit meine Dankbarkeit den anonymen Körperspendern zum Ausdruck bringen.

Ich danke auch dem Promotionskolleg des IZKFs für deren Unterstützung und Betreuung.

Zuletzt möchte ich Rebekka, meinem Bruder und meinen Eltern danken, die sich regelmäßig nach dem aktuellen Stand der Dinge erkundigt haben und mir somit unterbewusst den Antrieb für die Vollendung dieser Arbeit gegeben haben, während sie gleichzeitig dafür gesorgt haben, dass mein Geist und Körper mit genügend Freizeitaktivitäten versorgt werden.