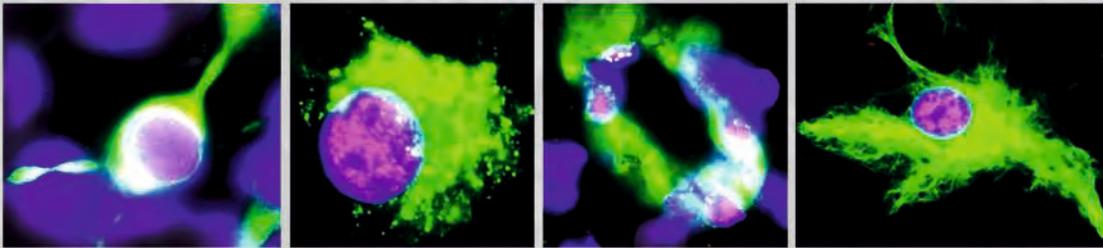


Jelena Damm

**Charakterisierung der Beteiligung des
Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der Induktion
zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome
in der Ratte**



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Dr. Christoph Rummel

**Charakterisierung der Beteiligung des
Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der
Induktion zentralnervös kontrollierter
Krankheitssymptome in der Ratte**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jelena Damm

Tierärztin aus Detmold

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Dr. Christoph Rummel
Prof. Dr. Joachim Geyer

Tag der Disputation: 26.06.2012

**"You can't possibly be a scientist if you mind people thinking
that you're a fool."**

Wonko the Sane in Douglas Adams „So Long And Thanks For All The Fish (1985)“

Meinem Vater Christoph

ABKÜRZUNGEN

ac	<i>Commissura anterior</i>
aCSF	Artificial cerebrospinal fluid
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AG490	N-Benzyl-3,4-dihydroxybenzylidenecyanoacetamide
AGP/EBP	α 1-Acid Glycoprotein enhancer binding protein
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance
AP	<i>Area postrema</i>
AP-1	Activator protein 1
APR	Akute-Phase Reaktion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT II	Angiotensin II
BAT	Brown adipose tissue
BSA	Bovines Serumalbumin
BST	<i>Nucleus interstitialis striae terminalis</i> , Bettkern der <i>stria terminalis</i>
bZIP	Basic leucine zipper
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CeA	Zentrale <i>Amygdala</i>
CF	Correction factor
ChP	<i>Plexus choroideus</i>
CINC-1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1
COX	Cyclooxygenase
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein
Crem	Cremophor®EL
CRH	corticotropin-releasing hormone
CRP2	C/EPB related protein 2
CSF	Cerebrospinal fluid
C _T	Cycle threshold
CV	Correction value
CVO	Circumventrikuläre(s) Organ(e)
D.L.	Detektionslimit
Da	Dalton
DAPI (-Dilaktat)	4', 6-diamidino-2-phenylindol (-Dilaktat)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA05	siRNA von Dharmacon mit der Nummer LQ-092218-000005

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOPE	L- α -Dioleyl Phosphatidyl Ethanolamin
ds	Double-stranded
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemiluminiszenz
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular signal-related kinase
FAM®	6-Carboxy-Fluoreszin
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GAS	Gamma-activated sequence
GBSS	Gey's balanced salt solution
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GIT	Guanidin-Isothiocyanat
gp	Glykoprotein
Grb	growth factor receptor binding protein
GTC	Guanidinisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's buffered salt solution
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRP	Horserradish peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.c.v.	Intracerebroventrikulär
i.m.	Intramuskulär
i.p	Intraperitoneal
i.r.	Immunreaktiv
I.R.	Immunreaktivität
I.U.	International units
i.v.	Intravenös
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IL-1RacP	IL-1-Rezeptor akzessorisches Protein

IL-6-DBP	IL-6-dependent DNA binding protein
IL-6R	IL-6-Rezeptor
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ISGF	IFN-stimulated gene factor
ISRE	IFN-stimulated regulatory elements
I κ B	Inhibitor of κ B
JAK	Janus Kinase
kDa	kilo Dalton
KM	Körpermasse
L-NAME	NG-Nitro-L-Arginin-methylester
LAP	Liver-enriched activating protein
LBP	LPS binding protein
LIP	Liver-enriched inhibitory protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRS	Leaky ribosome scanning
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
ME	<i>Eminentia mediana</i>
MEK	MAP Kinase/ERK Kinase
MGB	Minor groove binder
MIP	Macrophage inflammatory protein
MnPO	<i>Nucleus praeopticus medianus</i>
mPGES	Mikrosomale Prostaglandin E Synthase
mRNA	Messenger RNA
mSOS	Mammalian son of sevenless
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NBA	Neurobasal A
NBA-X	Neurobasal A ohne B27 und Antibiotika
NDS	Normal Donkey Serum
NF-IL6	Nuclear Factor IL-6
NF-M	Nuclear Factor myeloid
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NFQ	Non-fluorescent quencher
NGF	Neuronal growth factor
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nt	Nukleotid

NTC	Negativer Temperaturkoeffizient
NTS	<i>Nucleus tractus solitarii</i>
oc	<i>Chiasma opticum</i>
OD	Optical density
ODN	Oligodesoxynukleotid
OVLT	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
p	Protein
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBC	<i>Nucleus parabrachialis</i>
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PGE	Prostaglandin E
PGES	Prostaglandin E Synthase
PGS	Prostaglandinsynthase
Pi	<i>Glandula pinealis</i>
Pit	Hypophyse
PK	Proteinkinase
PLA2	Phospholipase A2
POAH	Präoptische Region des anterioren Hypothalamus
POMC	Proopiomelanocortin
PTGS	Post-transcriptional gene silencing
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
QRT-PCR	Quantitative real-time PCR
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma/rat fibrosarcoma
ras	Reticular activating system
RD	regulatory domain / repression domain
RIP	Receptor-interacting protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RPa	<i>Nucleus raphe pallidus</i>
rpm	Rounds per minute
RQ	Relative quantity
RSK	Ribosomal protein S6 kinase
RTD-PCR	Real-time detection PCR
s.c.	Subcutan
S.E.M.	Standard error of the mean
SCO	<i>Organum subcommissurale</i>
sCVO	sensorische circumventrikuläre Organe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamid gelelectrophoresis

Ser	Serin
SFA	Saturated fatty acids
SFO	<i>Organum subfornicale</i>
SH	Src-homology
Shc	Src homologous collagen
SHP	Src-homology phosphatase
siRNA	Short-interfering RNA
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SODD	Silencer of death domain
SON	<i>Nucleus supraopticus</i>
ss	Single-stranded
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T _{abd.}	Abdominal gemessene Körperkerntemperatur
TAD	Transcription activation domain
TGF	Transforming growth factor
Thr	Threonin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TIR	Toll-IL1-receptor homology domain
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFR	TRF Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRADD	TNF-receptor 1- associated DEATH domain protein
TRAF	TNF-receptor associated factor
Trib	Tribbles
TYK	Tyrosine kinase
UCP	Uncoupling protein
UV	Ultraviolett
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VMPO	<i>Nucleus praeopticus ventromedialis</i>
vW	Von-Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem
α -MSH	α -Melanocyte-stimulating hormone

INHALT

I. EINLEITUNG.....	16
1. Zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome.....	16
1.1. Charakterisierung und Bedeutung der Symptome.....	16
1.2. Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS.....	17
2. Stationen und Signalkaskaden des humoralen Weges.....	19
2.1. Potentielle Mediatoren in der Peripherie.....	19
2.2. Humorale Signalweiterleitung ins Gehirn.....	21
2.2.1. Circumventrikuläre Organe (CVO).....	21
2.2.2. Interaktionen mit Endothel-, perivaskulären und Mikrogliazellen.....	24
2.3. Ziele von Kommunikationswegen im Gehirn – wichtige Instanzen der zentralnervösen Kontrolle.....	24
2.4. Potentielle Mediatoren und Expression von Zielgenen im Gehirn.....	26
2.4.1. LPS als Mediator.....	26
2.4.2. IL-1 β als Mediator.....	27
2.4.3. TNF α als Mediator.....	27
2.4.4. IL-6 als Mediator.....	27
2.4.5. PGE2 als Mediator.....	28
2.5. Genomische Zellaktivierung.....	30
2.5.1. Entscheidende Transkriptionsfaktoren.....	30
2.5.1.1. NF- κ B.....	32
2.5.1.2. STAT3.....	32
2.5.2. Wege der Signalweiterleitung durch potentielle Mediatoren.....	33
2.5.2.1. Signaltransduktion durch IL-1 β	33
2.5.2.2. Signaltransduktion durch LPS.....	33
2.5.2.3. Signaltransduktion durch TNF α	35
2.5.2.4. Signaltransduktion durch IL-6.....	36
3. Der Transkriptionsfaktor NF-IL6.....	39
3.1. Charakterisierung von NF-IL6.....	39
3.1.1. Struktur.....	39
3.1.2. Funktionsweise.....	40
3.2. Aktivierung, Signaltransduktion und Regulation.....	41
3.2.1. Aktivatoren von NF-IL6.....	41
3.2.1.1. Inflammatorische Stimuli.....	41
3.2.1.2. andere Stimuli.....	41
3.2.2. Signaltransduktion der NF-IL6-Aktivierung.....	41
3.2.2.1. Die JAK/MAP-Kinase-Kaskade.....	42
3.2.2.2. Der p90 RSK-Weg.....	42
3.2.2.3. Über PKA, PKC und PKG vermittelte Wege.....	42
3.2.3. Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen.....	43
3.2.4. Negative Regulation.....	43
3.2.4.1. Negative Regulation mit Trib1.....	43
3.2.4.2. Negative Regulation mit LIP.....	43

3.3. Bedeutung, Funktionen und Zielgene von NF-IL6.....	44
3.3.1. Bedeutung für die Zelldifferenzierung und -proliferation.....	44
3.3.2. Bedeutungen im Gehirn.....	45
3.3.3. Bedeutung für Inflammationen.....	45
3.3.3.1. Regulation von Zytokinen.....	46
3.3.3.2. Regulation anderer inflammatorischer Mediatoren.....	46
4. Zielsetzung der Arbeit	48
4.1. Charakterisierung der NF-IL6 Aktivität im Verlauf zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome.....	48
4.2. Bedeutung JAK2-vermittelter Signalwege	49
4.3. Spezifische Bedeutung von NF-IL6 und NF-IL6-Synthese.....	50
5. Studienaufbau.....	51
5.1. LPS-induzierte Entzündungsreaktionen.....	51
5.2. Einflüsse des JAK-Inhibitors AG490 auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen.....	51
5.3. Einflüsse gegen NF-IL6 gerichteter siRNA auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen.....	53
II. MATERIAL UND METHODEN.....	57
II.A. VERSUCHSMODELLE.....	60
1. In vitro Modell.....	60
1.1. Materialien.....	60
1.2. Versuchsaufbau.....	62
1.3. Primäre Zellkultur der Area postrema.....	62
1.4. Transfektion und Stimulation der Zellen.....	63
2. In vivo Modelle.....	64
2.1. Materialien.....	64
2.2. Versuchsaufbau	67
2.3. Tiere.....	70
2.4. Operationen	70
2.4.1. Intraperitoneale Implantation der Radiotransmitter.....	70
2.4.2. Intracerebroventrikuläre Implantation der Leitkanüle.....	71
2.5. Injektionen.....	74
2.5.1. Intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid	74
2.5.2. Intracerebroventrikuläre Injektionen.....	74
II.B. ERFASSUNG PHYSIOLOGISCHER DATEN.....	76
1. Telemetrie.....	76
1.1. Materialien.....	76
1.2. Versuchsbedingungen.....	76
1.3. Messung von Körpertemperatur und lokomotorischer Aktivität.....	76
1.4. Messung von Futter- und Wasseraufnahme.....	78
1.5. Auswertung und Statistik.....	78

2. Entwicklung der Körpermasse.....	80
2.1. Auswertung und Statistik.....	80
II.C. ERFASSUNG BIOCHEMISCHER PARAMETER.....	81
1. Immunzytochemie / Immunhistochemie.....	81
1.1. Materialien.....	81
1.2. Grundlagen der Methode.....	82
1.3. Antikörper.....	84
1.4. Immunzytochemie.....	86
1.4.1. Versuchsprotokoll.....	86
1.4.2. Auswertung.....	86
1.5. Immunhistochemie.....	87
1.5.1. Perfusion und Organentnahme.....	87
1.5.2. Herstellen von Gehirnschnitten am Kryostat.....	87
1.5.3. Versuchsprotokoll.....	89
1.5.4. Mikroskopie	91
1.5.5. Auswertung und Statistik.....	91
2. Zytokin Bioassay.....	96
2.1. Materialien.....	96
2.2. Grundlagen der Methode.....	97
2.3. Probengewinnung.....	97
2.4. IL-6.....	97
2.5. TNF.....	100
2.6. Auswertung und Statistik.....	100
3. Quantitative real-time PCR.....	102
3.1. Materialien.....	102
3.2. Grundlagen der Methode	102
3.3. RNA-Extraktion und -Aufbereitung.....	109
3.4. cDNA Synthese - Reverse Transkription.....	112
3.5. Durchführung der quantitativen real-time PCR.....	113
3.6. Auswertung und Statistik.....	113
4. Western Blot.....	114
4.1. Materialien.....	114
4.2. Grundlagen der Methode.....	116
4.3. Proteinextraktion und Aufbereitung.....	117
4.4. Durchführung des Western Blot.....	120
4.5. Detektion, Auswertung und Statistik.....	121
4.6. Gelgegenfärbung.....	121

III. ERGEBNISSE.....	123
III.A. CHARAKTERISIERUNG DER NF-IL6 AKTIVITÄT IM VERLAUF LPS-INDUZIERTER ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN.....	123
1. Charakterisierung der Entzündungsreaktionen im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der LPS-Dosis.....	123
1.1. Physiologische Parameter.....	123
1.1.1. Körperkerntemperatur.....	123
1.1.2. Lokomotorische Aktivität.....	126
1.1.3. Futter- und Wasseraufnahme.....	127
1.1.4. Körpermasse.....	129
1.2. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma.....	130
1.2.1. IL-6	130
1.2.2. TNF.....	131
2. Zeitliche und räumliche Charakterisierung der NF-IL6-I.R im Gehirn	134
2.1. Verteilung der Signale im gesamten Gehirn.....	134
2.2. Zeitlicher Verlauf in den sCVO nach LPS Applikation.....	136
2.2.1. semiquantitative Bewertung.....	136
2.2.2. Zellzählungen.....	138
2.2.3. Dosisabhängigkeit.....	140
2.2.4. In vitro	140
2.3. Charakterisierung immunreaktiver Zelltypen.....	141
2.3.1. Vorkommende Zelltypen.....	144
2.3.2. Quantifizierung reaktiver Zellpopulationen in verschiedenen Hirngebieten.....	144
3. LPS-bedingte Induktion der Genexpression im Gehirn.....	146
3.1. Induktion auf mRNA-Ebene im Hypothalamus.....	146
3.1.1. NF-IL6 und sein negativer Regulator Trib1.....	146
3.1.2. Andere Transkriptionsfaktoren und ihre negativen Regulatoren.....	146
3.1.3. Inflammatorische Mediatoren.....	147
3.1.3.1. Zytokine.....	147
3.1.3.2. Enzyme der Prostaglandinsynthese.....	147
3.2. Induktion auf Proteinebene in Hypothalamus, cerebralem Cortex und Stammhirn.....	150
3.2.1. Expression verschiedener NF-IL6 Isoformen im Gehirn.....	150
3.2.2. Expression des inflammatorischen Markers COX2	151
III.B. EINFLÜSSE DES JAK-INHIBITORS AG490 AUF LPS-INDUZIERTE ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN.....	153
1. Beeinflussung der Entzündungsreaktionen durch zentrale Injektion von AG490.....	153
1.1. Physiologische Parameter.....	153
1.1.1. Körperkerntemperatur.....	153
1.1.2. Fieberindex.....	157
1.1.3. Lokomotorische Aktivität.....	158
1.1.4. Futter- und Wasseraufnahme.....	160
1.1.5. Körpermasse.....	162

1.2. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma.....	164
1.2.1. IL-6.....	164
1.2.2. TNF α	164
2. Einfluss von AG490 auf die Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren im OVLT und SFO.....	167
2.1. NF-IL6 und phospho-NF-IL6.....	167
2.2. STAT3 und phospho-STAT3.....	170
2.3. NF- κ B.....	170
2.4. Einflüsse der i.c.v. Injektionen.....	172
3. Beeinflussung der LPS-bedingten Induktion der Genexpression im Gehirn durch AG490.....	174
3.1. Induktion auf mRNA-Ebene im Hypothalamus.....	174
3.1.1. Transkriptionsfaktoren und ihre negativen Regulatoren.....	174
3.1.2. Inflammatorische Mediatoren.....	174
3.1.2.1. Zytokine.....	174
3.1.2.2. Enzyme der Prostaglandinsynthese.....	176
3.2. Induktion von COX2 auf Proteinebene.....	177
III.C. EINFLÜSSE VON ANTI-NF-IL6-SIRNA AUF LPS-INDUZIERTE ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN.....	179
1. Charakterisierung verschiedener siRNA Sequenzen in primären neuroglialen Kulturen der AP.....	179
1.1. Auswirkungen verschiedener siRNA Sequenzen auf die LPS-induzierte NF-IL6-I.R. in vitro.....	179
1.2. Auswirkungen auf die NF-IL6-I.R. in verschiedenen Zelltypen.....	180
1.3. Auswirkungen verschiedener Sequenzen auf die Konzentration bioaktiver Zytokine im Kulturmedium.....	182
2. Beeinflussung der Entzündungsreaktionen durch zentrale Injektion von anti-NF-IL6-siRNA.....	185
2.1. Distribution von siRNA im Gehirn nach der i.c.v. Injektion.....	185
2.2. Physiologische Parameter.....	188
2.2.1. Körperkerntemperatur.....	188
2.2.2. Fieberindex.....	192
2.2.3. Lokomotorische Aktivität.....	193
2.2.4. Futter- und Wasseraufnahme.....	194
2.2.5. Körpermasse.....	197
2.3. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma.....	198
2.3.1. IL-6.....	198
2.3.2. TNF.....	199
3. Einfluss der siRNA auf die Expression von NF-IL6 im Hypothalamus.....	201
3.1. Expression von mRNA.....	201
3.2. NF-IL6 Immunreaktivität.....	203

IV. DISKUSSION.....	207
1. NF-IL6 als später Zellaktivierungsmarker im Zeitverlauf LPS-induzierter systemischer Inflammationen.....	207
1.1. NF-IL6-Expression im Gehirn und mögliche funktionale Auswirkungen.....	208
1.1.1. Anatomische Verteilungsmuster.....	208
1.1.2. Mögliche Relevanz der NF-IL6-I.R. in bestimmten Hirnregionen.....	208
1.1.3. Phänotypische Zusammensetzung reagierender Zellpopulationen und deren mögliche Rolle für die inflammatorische Reaktion im Gehirn.....	210
1.1.4. Potentielle Aktivatoren von NF-IL6 im Gehirn.....	211
1.1.5. Funktionsweise von NF-IL6 – mögliche Wichtung von Regulationsmechanismen seiner Aktivität.....	212
1.2. NF-IL6-Aktivität und charakteristische Krankheitssymptome bzw. Plasmakonzentrationen bioaktiver Zytokine im Zeitverlauf.....	213
1.3. Mögliche Bedeutung von NF-IL6 für die Expressionsmuster potentieller Zielgene im Gehirn.....	215
2. Mögliche Bedeutung von NF-IL6 im Verlauf zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome.....	219
2.1. NF-IL6 als Aktivierungsmarker im Gehirn nach traumatischen Läsionen.....	219
2.1.1. Einflüsse der NF-IL6-Aktivität auf die Entstehung von Hirnschädigungen.....	219
2.1.2. Auswirkungen mechanischer Traumata auf inflammatorische Reaktionen im Gehirn.....	220
2.1.3. Auswirkungen läsionsbedingter Effekte auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit	221
2.1.4. Mögliche Bedeutung JAK2-vermittelter Signalwege für die Entwicklung und Ausprägung charakteristischer Krankheitssymptome.....	222
2.1.5. Fördernde sowie hemmende Wirkungen von AG490 auf LPS-induzierte Krankheitssymptome.....	222
2.1.6. Dissoziierende Einflüsse inflammatorischer Mediatoren auf Komponenten des „sickness-behavior“.....	223
2.1.7. Mögliche Ursachen und Mechanismen veränderter Krankheitssymptome nach Inhibition mit AG490.....	224
2.1.7.1. Körperkerntemperatur.....	224
2.1.7.2. Lokomotorische Aktivität.....	226
2.1.7.3. Anorexie und Adipsie.....	227
2.2. Auswirkungen auf Expression und Zusammenspiel inflammatorischer Marker im Gehirn..	229
2.2.1. Expression von Aktivierungsmarkern im Hypothalamus.....	231
2.2.1.1. STAT3.....	231
2.2.1.2. NF-IL6.....	232
2.2.1.3. NF-κB.....	236
2.2.2. Expression potentieller Mediatoren im Hypothalamus.....	238
2.3. Systemische Auswirkungen der Injektion.....	239
2.4. Zukünftige weiterführende Untersuchungen basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen der eigenen Studie.....	240
2.5. Anwendung des Mechanismus der RNAi.....	241
2.5.1. Kritische Betrachtung der Ergebnisse nach Verwendung von anti-NF-IL6-siRNA ...	242
2.5.2. Mögliche Einflüsse von NF-IL6 und der Steigerung seiner Expression auf den Verlauf des Krankheitsgeschehens.....	244
3. Fazit und Ausblick.....	246

V. ZUSAMMENFASSUNG.....	249
VI. SUMMARY.....	252
VII. LITERATUR.....	254
VIII. ANHANG.....	288
1. Publikationen.....	288
1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften.....	288
1.2. Veröffentlichte Abstracts.....	288
2. Danksagung.....	289
3. Erklärung:.....	290

I. EINLEITUNG

1. Zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome

Neben zahlreichen anderen Noxen, wie beispielsweise chemischen oder mechanischen Traumata, können mikrobielle Infektionen Entzündungsreaktionen hervorrufen. Der Zweck der daraufhin vom Wirt generierten inflammatorischen Antwort liegt in der Zerstörung oder Inaktivierung des auslösenden Agens und der Reinigung des betroffenen Gebietes von Zelltrümmern. Im Idealfall ist dies die Grundlage einer *Restitutio ad integrum* des Gewebes. Zu diesem Zweck werden im betroffenen Gebiet verschiedenste Zelltypen aktiviert, welche lösliche Mediatoren produzieren. Neben lokalen Effekten kann das inflammatorische Geschehen sich aber auch in Form eines Übertritts dieser Mediatoren und / oder des auslösenden Agens (wie Bestandteilen von Mikroorganismen) auf den gesamten Organismus auswirken, was als systemische Inflammation bezeichnet wird. Die Gesamtheit systemischer Effekte als multifaktorielle, stereotypische Reaktion eines Organismus auf Infektion, Verletzung oder Trauma umschreibt die sog. Akute-Phase Reaktion (APR). Diese Reaktion geht unter anderem mit einer Reihe von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen einher, welche unter dem Begriff „sickness-behavior“ zusammengefasst werden (Gabay & Kushner, 1999; International Union of Physiological Sciences, 2001; Roth et al., 2006).

Eine mögliche Noxe, die „sickness-behavior“ im Rahmen einer APR auslösen kann, ist Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien (Dantzer et al., 2008). LPS gehört zur Gruppe der sog. „pathogen-associated molecular patterns“ PAMPs, die konservierten, pathogentypischen Merkmalen entsprechen (Anderson, 2000). Da Fieber das auffallendste und bestbeschriebene Symptom des Komplexes „sickness-behavior“ darstellt, werden diese von außen in den Organismus eingebrachten Noxen auch als exogene Pyrogene (fiebererzeugende Substanzen) bezeichnet (Cooper, 1995; Zeisberger, 1999). Kommen sie in Kontakt mit Komponenten des angeborenen Immunsystems, erfolgt eine Ausschüttung sekundärer Mediatoren, die in ihrer Gesamtheit als endogene Pyrogene bezeichnet werden (Blatteis & Sehic, 1997; Conti et al., 2004; Dinarello, 1999; Kluger, 1991; Luheshi & Rothwell, 1996; Roth & De Souza, 2001; Zeisberger, 1999). Dabei handelt es sich vor allem um Zytokine, wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF) - α und die Interferone (IFN) α , β und γ , aber auch z.B. Chemokine und Eicosanoide (Überblick: Roth et al., 2006).

Um die zentralnervöse Kontrolle über die Entwicklung und den Verlauf von Krankheitssymptomen zu gewährleisten, müssen solche peripheren Signale aus dem Blutkreislauf an entsprechende regulatorische Zentren im Hypothalamus übermittelt werden (Kap. 1.2).

1.1. Charakterisierung und Bedeutung der Symptome

„Sickness-behavior“ als Reaktion des Organismus auf oben genannte Stimuli wird heute als hochorganisierte Strategie zur Bekämpfung von Infektionen verstanden (Hart, 1988). Ihr Spektrum umfasst unter anderem die Entwicklung von Fieber, Verlust an Körpermasse unter anderem durch Veränderungen im Lipid- und Proteinstoffwechsel, verminderten Appetit, erniedrigte lokomotorische Aktivität bzw. Apathie und Lethargie, sowie verminderte Aufmerksamkeit (Dantzer, 2001; Tizard, 2008). Unter diesen Krankheitssymptomen gilt Fieber als wichtiges Kennzeichen einer z.B. bakteriellen Infektion (Blatteis, 2003).

Fieber stellt eine aktive Hochregulation der Körpertemperatur dar (Baumgartner et al., 1996; Liebermeister, 1887), wofür thermoregulatorische Kontrollzentren der präoptischen Region des Hypothalamus von Bedeutung sind (International Union of Physiological Sciences, 2001). Die Existenz eines bei Fieber nach oben verstellten „Sollwertes“ als übergeordnete Kontrollinstanz der Körperkerntemperatur, welcher die Aufrechterhaltung einer somit voreingestellten Körpertemperatur vermittelt, wird allerdings heute nicht mehr als wahrscheinlich angenommen (Romanovsky, 2007). Vielmehr geht man von einem „Balance-Punkt“ bzw. einer „Zwischenschwellenzone“ aus, die sich aus den spezifischen Aktivierungsschwellen zahlreicher Thermoeffektoren und deren Regelkreise ergibt. Insgesamt bedingen diese dann die Aufrechterhaltung einer konstanten Körperkerntemperatur (Romanovsky, 2007). Die regulierte Temperaturerhöhung bei Fieber wird demnach durch ein Zusammenspiel wärmeproduzierender und wärmekonservierender Thermoeffektoren infolge der Verschiebung von Aktivierungsschwellen erreicht und erhalten und durch entsprechendes Verhalten unterstützt (Romanovsky, 2007; Roth et al., 2006; International Union of Physiological Sciences, 2001). Das heißt, dass ein betroffenes Individuum z.B. neben der Thermogenese durch Zittern gezielt warme Orte aufsucht oder den Wärmeverlust durch Zusammendrängen mit Artgenossen erniedrigt (Kluger, 1991; Roth, 2000).

1.2. Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS

Für die Übermittlung einer peripheren Immunstimulation an zentralnervöse Regulationszentren wurden und werden verschiedene mögliche Wege diskutiert: (Harre et al., 2002; Konsman et al., 2002; Lebel et al., 2000; Rummel et al., 2006; Rummel et al., 2005; Vallières & Rivest, 1997).

Die frühe Phase der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome scheint auf einem sehr schnell ablaufenden nervalen Weg zu basieren (Blatteis, 2004, 2006). Dabei werden von inflammatorischen Noxen oder von auf deren Einwirken hin gebildeten Mediatoren wie Prostaglandinen oder IL-1 β lokal am Ort des Einwirkens kutane Afferenzen sensorischer Nerven sowie vagale Afferenzen stimuliert, das Immunsignal also in ein nervalles Signal umgewandelt (Dantzer et al., 1998; Goehler et al., 1999). Die Nervenenden projizieren in die *Medulla oblongata* des Hirnstamms und erreichen von da aus unter anderem die präoptische Region des anterioren Hypothalamus, wo schließlich das komplexe „sickness-behavior“ z.B. über die Bildung von weiteren Mediatoren im Gehirn ausgelöst und reguliert wird (Blatteis, 2004, 2006; Blatteis & Sehic, 1997; Ericsson et al., 1994; Ross et al., 2000; Sawchenko & Swanson, 1982). Die dabei erfolgte Rückumwandlung des nervalen in ein zentrales Immunsignal kann auch umgangen werden, so ist eine direkte Stimulation von Neuronen regulatorischer Zentren des Hypothalamus über den *N. vagus* ebenfalls möglich (Dantzer et al., 2000). Eine Beteiligung dieses Weges an der Ausbildung von Krankheitssymptomen ergibt sich aus Studien, in denen die Durchtrennung des *N. vagus* im Abdomen zu deren Verminderung beitragen konnte (Blatteis & Sehic, 1997; Dantzer, 2001; Roth & De Souza, 2001; Watkins et al., 1995; Zeisberger, 1999).

Nach der frühen Initiationsphase, oder parallel zu dieser, spielen vor allem Komponenten des sogenannten humoralen Signalwegs eine entscheidende Rolle (Kap. 2., Abb. 2). Der humorale Weg umschreibt einen Vorgang, bei dem exogene (z.B. LPS) und endogene Pyrogene (z.B. Zytokine) aus der Peripherie das Gehirn erreichen, um hier Zellen genomisch zu aktivieren, welche dann die Regulation der Krankheitssymptome initiieren. Dabei ist allerdings ein direktes Einwirken der Substanzen auf hypothalamische Kerngebiete aufgrund der dichten Blut-Hirn-Schranke, die das ZNS als Kompartiment gegenüber Einwirkungen aus dem Blutkreislauf effektiv abgrenzt, unwahrscheinlich. Dennoch ist die genomische Aktivierung von Gehirnzellen durch PAMPs (wie

LPS) und pro-inflammatorische Zytokine eine anerkannte Tatsache (Chakravarty & Herkenham, 2005; Laflamme & Rivest, 2001; Vallières & Rivest, 1997). Daher wird von einer indirekten Signalweiterleitung ausgegangen, die ihren Ursprung an Übergangsbereichen zwischen Peripherie und ZNS hat, und von da aus über weitere Mediatoren bis zu regulatorisch bedeutsamen Zentren führt (Blatteis, 1992; Matsumura & Kobayashi, 2004; Roth et al., 2004; Saper & Breder, 1992; Schiltz & Sawchenko, 2003; Stitt, 1985, 1986). Entsprechende Übergangsbereiche stellen z.B. Zellen der Blut-Hirnschranke und die sogenannten circumventrikulären Organe (CVO), Strukturen mit einer veränderten Blut-Hirn-Schranke, dar (Chakravarty & Herkenham, 2005; Laflamme & Rivest, 2001; Vallières & Rivest, 1997; siehe auch Kap. 2.2.1.). In diesen Regionen können Zielgene (z.B. für weitere Mediatoren) exprimiert werden, die eine Weiterleitung von Signalen ins und im Gehirnparenchym ermöglichen. Außerdem wird postuliert, dass in den frühen Phasen der humoralen Signalweiterleitung in peripheren Organen (wie der Leber) gebildete Prostaglandine (PG) eine wichtige Rolle als Mediatoren spielen. Die lipophilen Moleküle können aufgrund ihrer relativ geringen Größe (350 Da) auch bei intakter Blut-Hirn-Schranke direkt aus dem Blutkreislauf ins Gehirn übertreten. So konnte eine pyrogene Wirkung von albumingebundenem PGE₂ gezeigt werden (Steiner et al., 2006). In späteren Phasen erhalten zentralnervös gebildete PG die Reaktion aufrecht (Steiner et al., 2006, 2006a).

Als Teilaspekt der humoralen Theorie wird auch ein Auswandern aktivierter Immunzellen aus der Peripherie ins Gehirn diskutiert. Diese könnten mit Hilfe von Mediatoren, die sie entweder an sich gebunden tragen oder aber parakrin sezernieren, zur Aktivierung von Hirnzellen im Hypothalamus führen (Netea et al., 1999). Von Bedeutung sind hierbei vor allem Neutrophile Granulozyten, die nach LPS-Stimulation als erste Zellen ins Gehirn rekrutiert werden und nachgewiesenermaßen pro-inflammatorische Eigenschaften aufweisen (Andrews et al., 1999; Bohatschek et al., 2001; Jiang et al., 1995; Kim, 2003; Lawson & Perry, 1995; Li et al., 2002; Matsuo et al., 1994). Aber auch für sogenannte perivaskuläre Makrophagen ist eine Rolle in der zellgebundenen Vermittlung peripherer Immunsignale wahrscheinlich (Schiltz & Sawchenko, 2003; Serrats et al. 2010).

2. Stationen und Signalkaskaden des humoralen Weges

2.1. Potentielle Mediatoren in der Peripherie

Neben direkten Wirkungen exogener Pyrogene bzw. PAMPs erfüllt das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle beim ersten Schritt der Übermittlung infektiöser Stimuli an übergeordnete, regulatorische Zentren. Zu diesem System gehören in der Peripherie Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten. Diese Zellen erkennen über Rezeptoren, sogenannte „pattern-recognition receptors“, verschiedenste PAMPs. Dabei sind die toll-like Rezeptoren (TLR) von zentraler Bedeutung. Die Signalübermittlung eines LPS-Stimulus findet zum Beispiel über den TLR4 statt (Poltorak et al., 2000). In der humoralen Theorie stellt die Produktion von endogenen Pyrogenen die direkte Folge der Rezeptorbindung an diesen Zellen dar (Aderem & Ulevitch, 2000; Hübschle et al., 2006; Rivest, 2003; Roth et al., 2006). Die Theorie, dass endogene Pyrogene als Folge des Eindringens exogener Pyrogene wie LPS für die Entstehung von Fieber und anderen zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen (mit) verantwortlich sind, stammt aus dem Jahr 1948 (Beeson, 1948). Diese endogenen Mediatoren wurden später als Mitglieder der Zytokinfamilie identifiziert. Zytokine gehören zu den am stärksten induzierbaren Proteinen bzw. interzellulären Signalmolekülen (Cooper, 1995). Dabei sind vor allem TNF α , IL-1 β und IL-6 als sog. pro-inflammatorische Zytokine und IL-10 und IL-1ra als anti-inflammatorisch wirksame Zytokine hervorzuheben (Conti et al., 2004). Die Regulation der Zytokinmenge und -aktivität beruht auf einem dichten Netzwerk gegenseitiger Beeinflussungen. Im zeitlichen Verlauf experimentell mit LPS induzierter Fieberreaktionen findet sich ein charakteristisches Muster der Zytokinaktivität im Blutkreislauf. So ist TNF α nach Stimulation mit LPS das erste (nach 60 Minuten), im Plasma detektierbare Zytokin (Givalois et al., 1994; Kluger, 1991; Long et al., 1990a; Roth et al., 1993). Anschließend folgen IL-1 β (Jansky et al., 1995) in geringen, meist schwer zu detektierenden, und IL-6 in größeren Mengen (LeMay et al., 1990; Luheshi et al., 1996; Roth et al., 1993; Roth et al., 2002; Roth et al., 1994). Im Gegensatz zu TNF α und IL-1 β bleibt die IL-6-Plasmakonzentration während der gesamten Fieberreaktion erhöht (Cartmell et al., 2000; Miller et al., 1997; Roth et al., 1993). IL-10 kann im Anschluss an LPS-Injektionen zu späteren Zeitpunkten (1,5 - 6 Stunden) im Plasma detektiert werden (Durez et al., 1993).

TNF α , IL-1 β und IL-6 gelten als wichtigste pro-inflammatorische Mediatoren systemischer Reaktionen auf Infektionen mit gram-negativen Bakterien (Blatteis, 2004; Conti et al., 2004; Dinarello, 1997; Xin & Blatteis, 1992). TNF α wurde ursprünglich als zirkulierender, tumorsupprimierender Faktor und parallel als endogener Mediator für Kachexie entdeckt (Beutler & Cerami, 1986; Cerami & Beutler, 1988; Flick & Gifford, 1985) und wird auch mit dem Verlust an Körpermasse im Rahmen von „sickness-behavior“ in Verbindung gebracht. Diesem pro-inflammatorischen Zytokin werden allerdings auch antipyretische Effekte zugeschrieben (Kawasaki et al., 1989; Morimoto et al., 1989; Nakamura et al., 1988). IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra gehören zur IL-1 Familie der Zytokine (Übersicht: Roux-Lombard, 1998). Ihre Expressionssteigerung, verbunden mit der Induktion der Rezeptorisoform IL-1R-1 durch LPS konnte demonstriert werden. Im Blutplasma steigt IL-1 β allerdings während LPS-bedingter Entzündungsreaktionen nur geringfügig an (Givalois et al., 1994; Jansky et al., 1995; Kluger, 1991; Penton-Rol et al., 1999). IL-6 wird vor allem mit der Regulation der Synthese von Akute-Phase Proteinen in der Leber in Zusammenhang gebracht (Castell et al., 1988), spielt unter anderem auch für die Entwicklung von Lymphozyten, Zellproliferation und Apoptose eine wichtige Rolle (Heinrich et al., 1998; Hodge et al., 2005; Kamimura et al., 2003; Steelman et al., 2004). Allerdings sind auch protektive Funktionen des Zytokins im Verlauf von

Entzündungsreaktionen möglich (Xing et al., 1998). Die bereits basal vorhandene Konzentration an bioaktivem, zirkulierendem IL-6 steigt während des zeitlichen Verlaufs der Fieberreaktion deutlich an (Roth et al., 1994). Einzig für dieses Zytokin zeigt sich außerdem eine deutliche Korrelation der Plasmakonzentration mit der Stärke des Fiebers (Jansky et al., 1995; Kluger, 1991; LeMay et al., 1990; Nijsten et al., 1987; Roth et al., 1994). Nach lokaler Verabreichung einer niedrigen Dosis von Pyrogenen ist IL-6 (neben Chemokinen) das einzige Zytokin, das in die Zirkulation übertritt (Cartmell et al., 2000). Unter den Interferonen wird IFN γ die wichtigste Rolle in Bezug auf die Modulation des angeborenen Immunsystems in Form der Förderung der Entwicklung und Funktion von Immuneffektorzellen zugesprochen. Die Produktion erfolgt unter anderem durch T-Zellen und natürliche Killerzellen (Stark, 1998).

LPS-bedingt produzierte anti-inflammatorische Zytokine dienen der Eindämmung der Entzündungsreaktionen und der Rückkehr zum „Normalzustand“ (Fernandez-Botran, 2000; Opal & DePalo, 2000). IL-1ra ist ein endogener Antagonist von IL-1, der an den gleichen Rezeptor bindet, diesen jedoch nicht aktiviert (Hannum et al., 1990). Sowohl IL-1 als auch TNF α induzieren seine Expression. IL-1ra selbst senkt die Spiegel dieser beiden Zytokine und hat außerdem einen hemmenden Einfluss auf lokal induzierte Fieberreaktionen (Cartmell et al., 2001; Marsh & Wewers, 1994; Miller et al., 1997a). IL-10 wirkt ebenfalls anti-inflammatorisch (de Waal Malefyt et al., 1992). Dies beruht vor allem auf der Hemmung der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6 (Howard & O'Garra, 1992). Außerdem wird die IL-1ra-Produktion durch IL-10 gefördert (Jenkins et al., 1994).

Die Rolle verschiedener Zytokine für die Fieberentstehung und -aufrechterhaltung konnte zum Einen anhand von Studien über deren direkte Auswirkungen gezeigt werden. So bewirkt die Injektion von TNF α ein relativ starkes Fieber (Dinarello et al., 1986; Goldbach et al., 1996). Auch IL-1 β ist peripher oder zentral injiziert ausreichend, um sämtliche Komponenten der APR, einschließlich eines starken Fiebers und der typischen Verhaltensdepression, auszulösen (Anforth et al., 1998; Roth et al., 1998). Alleinige Injektion von IL-6 führt hingegen zu einem eher moderaten Fieber (Blatteis et al., 1990; Harre et al., 2002). Zum Anderen untermauern verschiedene Neutralisierungsstrategien einzelner Zytokine oder ihrer Wirkungen in Verbindung mit LPS-induzierten Fieberreaktionen diese Erkenntnisse. Werden TNF α , IL-1 β oder IL-6 einzeln durch Antagonisten, lösliche Rezeptoren oder Antisera blockiert, kann jeweils ein deutlicher Rückgang der Fieberreaktion beobachtet werden (Cartmell, 1998; Luheshi et al., 1996; Luheshi et al., 1997; Roth & De Souza, 2001; Roth et al., 1998a). Die Neutralisierung der TNF α -Bioaktivität führt allerdings mitunter auch zu einer Verstärkung LPS-induzierter Fieberreaktionen, was einen Hinweis auf dessen mögliche antipyretische Eigenschaften darstellt (Long et al., 1990; Long et al., 1990a). Studien mit Zytokin- oder Zytokin-Rezeptor-defizienten Mäusen bestätigten zusätzlich die Rolle von IL-1 β und vor allem IL-6 für die Entstehung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome (Chai et al., 1996; Kozak et al., 1998; Kozak et al., 1995; Leon, 2002). Eine fiebermindernde Rolle für IL-10 wurde ebenfalls anhand von Studien mit defizienten Tieren, Neutralisierungsstrategien oder direkter Verabreichung des Zytokins in Verbindung mit z.B. LPS-Stimulation verdeutlicht (Cartmell et al., 2003; Leon et al., 1998a). Das komplexe Zusammenspiel von Zytokinen im Rahmen zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome, sowie die zugrundeliegenden Mechanismen, sind nach wie vor nicht vollständig und zweifelsfrei geklärt und bedürfen daher weiterer Untersuchungen.

2.2. Humorale Signalweiterleitung ins Gehirn

Als hydrophobe, relativ große Moleküle (15-25 kDa) können Zytokine aus dem Kreislauf nicht ohne weiteres die Blut-Hirn-Schranke passieren, um ins ZNS zu gelangen. Diese besteht aus über tight junctions miteinander verbundenen Endothelzellen (Matsumura & Kobayashi, 2004) und spezialisierten Gliazellen (*glia limitans*) in unmittelbarer Nähe von Endothel- und Basalmembran (Übersicht: Bechmann et al., 2007; siehe auch Abb. 2). Es gibt allerdings mehrere mögliche Wege, wie die zirkulierenden Mediatoren dennoch bis in regulatorische Hirnzentren vordringen können: Zum Einen ist ein Übertritt in den circumventrikulären Organen möglich, die eine durchlässige Blut-Hirn-Schranke aufweisen (Roth et al., 2004). Zum Anderen können Interaktionen der Moleküle mit Endothelzellen im Gehirn oder perivaskulären Zellen über spezifische Rezeptoren zu einer Weiterleitung des Signals ins Gehirn führen (Matsumura & Kobayashi, 2004; Schiltz & Sawchenko, 2003). Auch ein zytokinspezifischer, aktiver Transport über ein sättigbares System ist denkbar, so dass die Barriere der Blut-Hirn-Schranke gezielt überwunden werden könnte (Banks et al., 1995).

2.2.1. Circumventrikuläre Organe (CVO)

Circumventrikuläre Organe finden sich im Gehirn aller Vertebraten. Der Name ergibt sich aus ihrer anatomischen Lokalisation in direkter Nähe zu den Gehirnventrikeln (Hofer, 1958). Die sieben beschriebenen CVO der Säugetiere umfassen das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), das *Organum subfornicale* (SFO), die *Eminentia mediana* (ME), die *Glandula pinealis* (Epiphyse), das *Organum subcommissurale* (SCO), die *Area postrema* (AP) und den *Plexus choroideus* (ChP) aller Ventrikel. Traditionell werden die CVO als bedeutende Hirnstrukturen für die Aufrechterhaltung der Flüssigkeits- und kardiovaskulären Homöostase angesehen (Ferguson & Bains, 1996; McKinley et al., 1999a). Neben der sehr hohen Gefäßdichte ergibt sich die Bedeutung dieser Strukturen für die humorale Signalweiterleitung vor allem aus einer veränderten Blut-Hirn-Schranke und dem Auftreten atypischer ependymaler Zellen (McKinley et al., 2003). Einer Untergruppe der CVO wird eine besondere Rolle für die Erkennung und Weiterleitung von Signalen aus der Zirkulation zugesprochen, weshalb diese Gruppe auch als sensorische CVO (sCVO) bezeichnet wird. Sie setzt sich aus dem OVLT (ventral) und dem SFO (dorsal) innerhalb der anterioren Wand des dritten Ventrikels (*lamina terminalis*) und der AP innerhalb der Wand des vierten Ventrikels zusammen (McKinley et al., 2003). Die sCVO besitzen gebietsweise ein fenestriertes Endothel. Daran schließt sich ein relativ weiter perivaskulärer Raum an. Vom umliegenden Gewebe sind die sCVO anatomisch und funktional durch „tight junctions“ zwischen den sie umgebenden Ependymzellen, die auch als Tanyzyten bezeichnet werden, abgegrenzt. Neben in großer Anzahl vorkommenden Nervenendigungen und funktionalen Verschaltungen sind lediglich in den sCVO auch Neuronenzellkörper lokalisiert. Gliazellen verschiedener Unterarten komplettieren die Zellpopulation (McKinley et al., 2003). Neben den CVO im klassischen Sinn fällt außerdem den hochvaskularisierten Leptomeningen eine wichtige Bedeutung für Reaktionen auf zirkulierende Mediatoren zu (Rivest, 2009).

Aufgrund der fehlenden Blut-Hirn-Schranke können Zellen der sCVO direkt in Kontakt mit zirkulierenden Mediatoren treten, auf die sie über spezifische Rezeptoren direkt (neuronal; Shibata & Blatteis, 1991) oder indirekt (über die Bildung weiterer Signalmoleküle) reagieren können (Roth et al., 2004). So fanden sich unter anderem Rezeptoren für Prostaglandine (EP2-4) im OVLT und SFO (Ek et al., 2000; Nakamura et al., 1999). Rezeptoren für endogene Pyrogene wurden ebenfalls mehrfach nachgewiesen, so dass Einwirkungen von TNF α (Nadeau & Rivest, 1999), IL-1 β und IL-6 (Ericsson et al., 1995; Vallières & Rivest, 1997) aus dem Blutkreislauf auf die sCVO nahe-

liegen. Neben endogenen Pyrogenen können PAMPs aber auch direkt, vermittelt über dort exprimierte Rezeptoren wie TLR4 und CD (cluster of differentiation) -14, Kap. 2.5.2.2.) für die Erkennung von LPS, auf Zellen in den sCVO einwirken (Laflamme & Rivest, 2001; Rivest, 2003). Dies kann zeitlich sogar vor einer peripheren Zytokinantwort auftreten. Die Reaktion von Zellen der sCVO auf zirkulierende Zytokine lässt sich an deren genomischer Aktivierung direkt ablesen. Unter anderem macht die Aktivierung bzw. nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren in sCVO-Zellen deren genomische Aktivierung deutlich (Harre et al., 2002; Laflamme & Rivest, 1999; Nadjar et al., 2003; Rummel et al., 2004), was durch gleichzeitige Induktion entsprechender, negativer Regulatoren in diesen Regionen untermauert wird (Lebel et al., 2000; vgl. Kap. 2.5.). Somit stellt die Detektion aktivierter inflammatorischer Transkriptionsfaktoren eine direkte Verbindung zur Aktivierung von Zellen im Zuge der humoralen Signalweiterleitung dar und bildet damit ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der beteiligten Strukturen und Mediatoren.

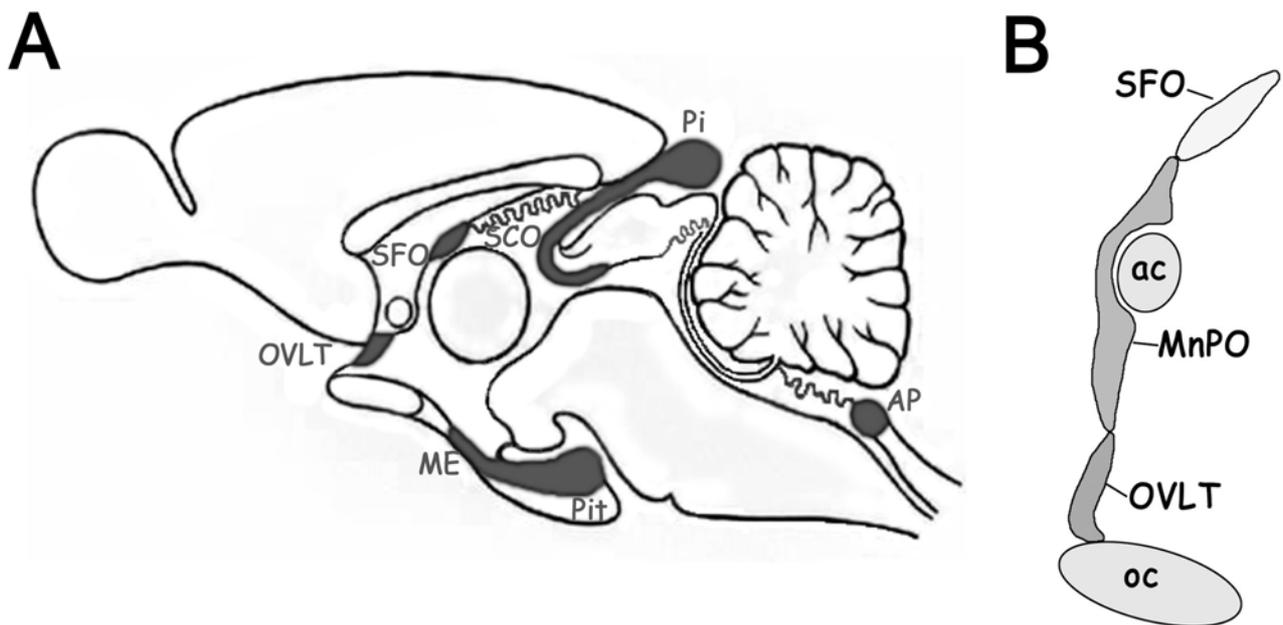


Abb. 1: Schematische Darstellung der anatomischen Lage circumventrikulärer Organe (A) und der lamina terminalis der Ratte (B) im Sagittalschnitt

OVL: Organum vasculosum laminae terminalis, SFO: Organum subfornicale, SCO: Organum subcommissurale, Pi: Glandula pinealis, ME: Eminentia mediana, Pit: Hypophyse, AP: Area postrema, MnPO: Nucleus praeopticus medianus, ac: Commissura anterior, oc: Chiasma opticum.

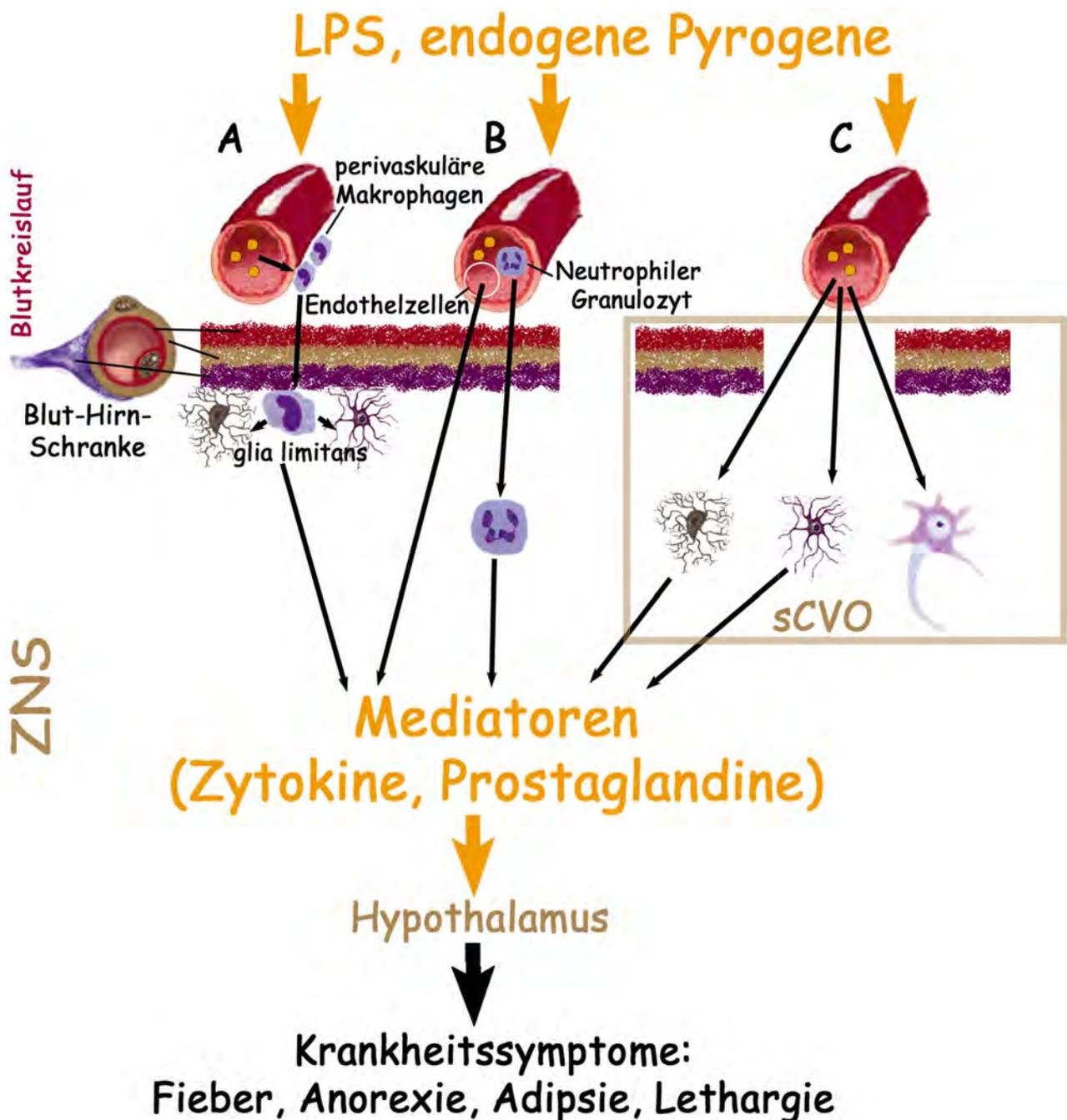


Abb. 2: Schematische Darstellung verschiedener Komponenten des humoralen Weges der Signalweiterleitung

Ein peripherer Immunstimulus, z.B. in Form eines Eindringens exogener Pyrogene (LPS), bewirkt die Produktion endogener Pyrogene, die im Blutkreislauf zirkulieren. Über perivaskuläre Makrophagen und Zellen der *glia limitans* (A), Endothelzellen, oder einwandernde Immunzellen (B) können Zellen im Gehirn zur Produktion weiterer Mediatoren stimuliert werden. In Bereichen mit undichter Blut-Hirn-Schranke (sensorische CVO, siehe auch Kap. 2.2.1.) bilden die zirkulierenden Pyrogene direkt den entsprechenden Stimulus für die Produktion von z.B. Zytokinen und Prostaglandinen durch Astrozyten, Mikrogliazellen oder Neuronen (C). Im ZNS bedingen diese Mediatoren neben direkten neuronalen Aktivierungen die Initiation und Aufrechterhaltung der sog. „sickness-response“ in entsprechenden hypothalamischen Kerngebieten, so dass typische Krankheitssymptome auftreten.

2.2.2. Interaktionen mit Endothel-, perivaskulären und Mikrogliazellen

Die Signalweiterleitung aus dem Blutkreislauf ins Gehirnparenchym kann im gesamten Gehirn auch über die Endothelzellen der Gefäße ablaufen. Diese exprimieren sowohl Rezeptoren für IL-1 (sowohl luminal als auch basolateral) und TNF α konstitutiv (Konsman et al., 2004; Nadeau & Rivest, 1999) als auch das Glykoprotein gp130 als Transduktionsmolekül des IL-6-Rezeptors, über das durch Komplexe von IL-6 mit dem löslichen IL-6 Rezeptor Reaktionen ausgelöst werden können (Vallières & Rivest, 1997; vgl. Kap. 2.5.2.4.). Unter inflammatorischen Bedingungen wird auch die Expression des membranständigen IL-6-Rezeptors unter anderem in Endothelzellen induziert (Vallières & Rivest, 1997). Die genomische Aktivierung von Gehirndothelzellen über IL-1 (Nadjar et al., 2003) und IL-6 (Rummel et al., 2005) konnte anhand der daraufhin in diesen Zellen stattfindenden nukleären Translokation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nuclear factor kappa B) bzw. STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) als Aktivierungsmarker dargestellt werden. TLR4 finden sich im Gehirndothel nur vereinzelt, so dass die Bedeutung von LPS als direkter Mediator für diesen Weg nicht von zentraler Bedeutung zu sein scheint (Laflamme & Rivest, 2001).

Auch perivaskuläre Zellen, nämlich eine Gruppe von Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, können an der Signalweiterleitung beteiligt werden (Bechmann et al., 2007). Beispielsweise konnte die Expression des IL-1R-1 durch diese Zellen nachgewiesen werden (Konsman et al., 2004). Des Weiteren ist eine Rolle von Mikrogliazellen für die Verarbeitung inflammatorischer Signale im Gehirn anzunehmen, da diese im gesamten Hirnparenchym infolge peripherer LPS-Stimulation aktiviert werden (Chakravarty & Herkenham, 2005; Nadeau & Rivest, 2000; Nguyen et al., 2002; Quan et al., 1997). Perivaskuläre Mikrogliazellen können außerdem neben Endothelzellen an der Synthese von Mediatoren wie PG beteiligt sein (Elmqvist et al., 1997).

2.3. Ziele von Kommunikationswegen im Gehirn – wichtige Instanzen der zentralnervösen Kontrolle

King und Wood erbrachten erste Beweise dafür, dass das zentrale Nervensystem ein wichtiger Wirkungsort endogener Pyrogene ist (King & Wood, 1958). Die präoptische Region des anterioren Hypothalamus (POAH) bildet das wichtigste Thermoregulationszentrum des Gehirns (Cooper et al., 1967; Jackson, 1967). In der POAH kommen warm-sensitive, kalt-sensitive und temperatur-insensitive Neuronen vor. Die Hemmung warm-sensitiver Neuronen, die nicht auf der peripheren Wahrnehmung fallender Temperaturen beruht, wird als Basismechanismus der Entwicklung von Fieber angesehen (Hori et al., 1988; Xin & Blatteis, 1992). Eine verstärkte Wärmebildung entsteht dabei allgemein durch eine Enthemmung kalt-sensitiver Mechanismen (Boulant, 1980, 1996; Nagashima et al., 2000).

Dem OVLT wird aufgrund seiner räumlichen Nähe zur präoptischen Region eine besondere Bedeutung als „pyrogene Zone des Gehirns“ für die Fieberentstehung zugesprochen (Scammell et al., 1996; Stitt, 1985). Eine Aktivierung von OVLT-Neuronen einerseits durch systemische (i.v.) Stimulation mit LPS (Elmqvist et al., 1996; Roth et al., 2006) und andererseits in Verbindung mit einer charakteristischen Fieberreaktion wurde ebenso gezeigt wie die direkte Reaktion dieser Neurone auf die Applikation von PGE₂ (Prostaglandin E₂), welches als wichtigster Fiebermediator bekannt ist (Hori et al., 1992; Matsuda et al., 1992; Stitt, 1986, 1991; siehe auch Kap. 2.4.5.). So hemmt PGE₂ warm-sensitive Neurone (Hori et al., 1988; Xin & Blatteis, 1992), was wiederum die oben genannten Basismechanismen für Fieber aktiviert. Läsionsstudien ergaben zudem, dass das Fehlen des OVLT die Fieberantwort auf eine LPS-, IL-1 β - oder TNF α -Stimulation komplett unter-

drückt (Blatteis et al., 1983; Blatteis et al., 1987; Hashimoto et al., 1994). Zusätzlich wurden neuronale Verbindungen vom OVLT zum SFO und anderen thermoregulatorisch bedeutsamen Regionen wie beispielsweise dem *Nucleus raphe pallidus* (RPa) nachgewiesen, der in Nagern an der Kontrolle der Thermogenese durch braunes Fettgewebe (BAT) beteiligt ist (McKinley et al., 2003; Taniguchi et al., 2003).

Da sich beispielsweise in der Ratte der *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) dorsal dem OVLT direkt anschließt (Abb. 1), ist eine funktionale Zusammenarbeit beider Gehirnstrukturen naheliegend. Dem MnPO kommt ebenfalls eine wichtige Bedeutung für die Fieberentstehung zu. Dort kommen unter anderem EP3-Rezeptoren vor, die an der Fieberinduktion durch PGE₂ beteiligt sind, so dass eine EP3-Deletion im MnPO unter anderem durch LPS ausgelöstes Fieber verhindern kann (Lazarus et al., 2007). Im Rahmen der Entwicklung von „sickness-behavior“ ist der MnPO allerdings auch im Bezug auf das Trinkverhalten von Interesse (Übersicht: McKinley et al., 2003). Unter anderem wurde eine bedeutende Rolle des MnPO für die Angiotensin-II-bedingte Induktion von Durst nachgewiesen. Die Stimulation durch Angiotensin-II findet dabei im Experiment je nach Applikationsart (i.v. oder i.c.v.) im Zusammenwirken mit dem OVLT und dem SFO statt (Cunningham et al., 1992; Gardiner & Stricker, 1985; Gardiner et al., 1985; Mangiapane & Simpson, 1983; McKinley et al., 1995; McKinley et al., 1999).

Das SFO wurde bereits 1973 als die Hirnregion beschrieben, die für die Stimulation des Trinkens durch zirkulierendes Angiotensin II verantwortlich ist (Simpson & Routtenberg, 1973). Dies ergibt sich möglicherweise aus einem Zusammenwirken mit anderen Regionen wie dem MnPO (Allen et al., 2000; s.o.). Es bestehen funktionale Verbindungen des SFO unter anderem zum OVLT, zum *Nucleus arcuatus* (ARC), der unter anderem an der Regelung von Appetit und Wachstum beteiligt ist, und zur *Eminentia mediana* (ME) als wichtigste Nahtstelle zwischen dem Nerven- und Hormonsystem, so dass die Beeinflussung der Funktionen dieser Gebiete, vermittelt über das SFO, wahrscheinlich ist (McKinley et al., 2003). Ablationsstudien legen außerdem eine Beteiligung des SFO auch an der Fieberentstehung nahe (Takahashi et al., 1997). Dies wird durch die Hemmung von LPS-induziertem Fieber durch Neutralisierung von IL-1 β im SFO untermauert (Cartmell et al., 1999).

Die AP wurde erstmals von Borison und Brizzee als „Chemorezeptor Triggerzone“ für das Auslösen von Erbrechen beschrieben (Borison & Brizzee, 1951). Sie befindet sich in direkter Nähe unter anderem zum sich ventral anschließenden *Nucleus tractus solitarii* (NTS), der sowohl für diese als auch für andere beschriebene AP-Funktionen eine synergistische Rolle einnimmt (McKinley et al., 2003). Eine mögliche Funktion der AP in Bezug auf die Entstehung von „sickness-behavior“ könnte in der Weiterleitung von Signalen über neuronale Wege an den *Nucleus parabrachialis* (PBC) und zur zentralen *Amygdala* (CeA) sowie den *Nucleus interstitialis striae terminalis* (Bettkern der *Stria terminalis*, BST) bestehen, wo vor allem die IL-1-vermittelte Verhaltensdepression reguliert werden könnte (Dantzer et al., 2000; Ericsson et al., 1995). Außerdem existieren Projektionen von der AP über den NTS zum *Nucleus paraventricularis* (PVN) und *Nucleus supraopticus* (SON, Ericsson et al., 1994; Sawchenko & Swanson, 1982). Neben humoralen Signalen, die in der AP detektiert werden, erreichen außerdem afferente Signale aus der Peripherie über den *N.vagus* die AP. Neuronen dieser Region könnte somit eine Rolle für die Integration automomer Signale in Hirnstamm und Hypothalamus z.B. im NTS zugeschrieben werden (Price et al., 2008). Ablationsstudien führten zu der Annahme, dass die AP eine wichtige Rolle für die Induktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) spielt (Lee et al., 1998). Dabei

könnte der PVN für die Integration von Signalen eine entscheidende Rolle spielen (Buller, 2001), wobei die Übermittlung z.T. über neuronale Verbindungen stattfindet (Hashimoto et al., 1994). Die konstante Aktivierung der HPA-Achse im Verlauf systemischer Inflammationen führt zu erhöhten Mengen an Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und Glucocorticoiden (Givalois et al., 1994; Roth et al., 2002; Tollner et al., 2000; Turnbull & Rivier, 1999).

Dem *Plexus choroideus* (ChP) wird eine Rolle als Produzent pro-inflammatorischer Zytokine nach Kontakt mit entsprechenden zirkulierenden Mediatoren zugeschrieben. Dort gebildetes IL-1 β kann beispielsweise über Diffusion aus der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) regulatorische Hirnareale erreichen (Konsman et al., 1999). Die *Eminentia mediana* (ME) spielt in diesem Rahmen vermutlich ebenfalls eine Rolle, eine Volumentransmission von dort gebildetem IL-1 β zum ARC wird mit der Entstehung von Anorexie in Zusammenhang gebracht (Konsman et al., 2002).

2.4. Potentielle Mediatoren und Expression von Zielgenen im Gehirn

Die genomische Aktivierung von Zielzellen durch periphere Stimuli an den Grenzen der sCVO und der Blut-Hirn-Schranke bewirkt letztendlich die Produktion und Freisetzung von Mediatoren innerhalb des Gehirns. Diese Mediatoren, sowie mit ihnen assoziierte Proteine, werden im Zuge LPS-vermittelter Reaktionen vermehrt exprimiert: Nach einer Stimulation mit LPS steigen im Gehirn unter anderem die Spiegel von IL-1 β , TNF α , IL-6 und IL-1ra (Gatti & Bartfai, 1993; Laye et al., 1994). Die konstitutive Expression von CD14 als akzessorisches Molekül der Signaltransduktion am TLR4 in den sCVO wird ebenfalls nach oben reguliert (Lacroix et al., 1998; Rivest, 2003). Endothelzellen exprimieren nach Stimulation mit LPS oder IL-1 β unter anderem COX2 (Cyclooxygenase 2), iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase) und IL-1 β (Cao et al., 1996; Quan et al., 1998; Wong et al., 1996). Auch Mikrogliazellen spielen eine wichtige Rolle für die Weiterleitung und Verarbeitung inflammatorischer Signale im Gehirn, sie werden z.B. nach LPS-Stimulation im gesamten Hirnparenchym aktiviert (Chakravarty & Herkenham, 2005; Nadeau & Rivest, 2000; Nguyen et al., 2002; Quan et al., 1997).

Nach dieser ersten Induktionswelle folgt eine zweite, die vermutlich durch sekundär gebildete Mediatoren wie NO (Stickstoffmonoxid) und PGE₂ getragen wird. Sie findet vor allem in perivaskulären Zellen und Astrozyten auf der Hirn-Seite der Blut-Hirn-Schranke statt (Herkenham et al., 1998). Diese sekundär gebildeten Mediatoren sind zusammen mit direkter Stimulation durch die primäre Mediatorfreisetzung für die Induktion und Aufrechterhaltung der Krankheitssymptome verantwortlich. Im Folgenden soll kurz auf die für die vorliegende Arbeit relevanten Mediatoren näher eingegangen werden.

2.4.1. LPS als Mediator

Rezeptoren, die direkte Wirkungen von LPS vermitteln können, wurden in Form der Moleküle TLR4 und CD14 unter anderem in den sCVO beschrieben (Laflamme & Rivest, 2001; Rivest, 2003). LPS kann hier die Induktion der IL-1 β - und TNF α -Expression bewirken (Breder et al., 1994; Nakamori et al., 1993; Nakamori et al., 1994; siehe auch Kap. 2.5.2.2.), die sich bei Verabreichung septischer Dosen auf das gesamte Gehirnparenchym ausweitet (Quan et al., 1999; Vallières & Rivest, 1997). Für die Entstehung LPS-induzierter Entzündungsreaktionen konnte eine essentielle Bedeutung der Signalweiterleitung über TLR4 gezeigt werden (Chakravarty & Herkenham, 2005), was vermutlich zum Teil auf einer mRNA-Induktion von CD14, nicht aber TLR4 selbst beruht (Laflamme & Rivest, 2001; Rivest, 2003).

2.4.2. IL-1 β als Mediator

IL-1 β ist als wichtiges „klassisches“ endogenes Pyrogen seit langem bekannt (Dinarello, 1984; 2010). Als zelluläre Quelle der IL-1 β -Produktion im Gehirn kommen Mikrogliazellen und perivaskuläre, sowie meningeale Makrophagen in Frage (van Dam et al., 1992). Man geht von einer primären IL-1 β -Bildung in den CVO aus, der eine Diffusion ins Gehirnparenchym folgt (Konsman et al., 1999). IL-1 β kann die Synthese weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α oder IL-6, aber auch anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-1ra initiieren und wird daher als wichtiger Mediator LPS-vermittelter Reaktionen im Gehirn angesehen (Konsman et al., 2002). Als Antwort auf exogene Stimuli gebildetes IL-1 β scheint vor allem für die Entwicklung von Lethargie und Anorexie verantwortlich zu sein (Dantzer, 2001; Rothwell & Luheshi, 2000). Dies wird z.B. durch die Fähigkeit des Zytokins, Neuronen der basolateralen *Amygdala* direkt zu beeinflussen, untermauert. Außerdem kann die intracerebroventrikuläre Injektion des IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) diese Symptome vollständig hemmen (Dantzer, 2001). Auch IL-1 β -Wirkungen auf thermosensitive OVLT-Neuronen, die zum Teil auf der Bildung von PGE₂ beruhen, sind beschrieben worden, beispielsweise die Verringerung der Aktivität von warm-sensitiven Neuronen (Hori et al., 1988; Nakashima et al., 1989; Ota et al., 1997). Im SFO konnten Ferguson und Kollegen zusätzlich sogar eine direkte IL-1-vermittelte Aktivierung von Neuronen zeigen (Desson & Ferguson, 2003).

2.4.3. TNF α als Mediator

TNF α wird nach systemischer LPS-Stimulation von perivaskulären und meningealen Zellen sowie Neuronen gebildet (Breder et al., 1993). Auch für dieses Zytokin wurde eine negative Beeinflussung warm-sensitiver Neurone, vermittelt über PGE₂, beschrieben (Nakashima et al., 1991). Die Rolle für TNF α für die Induktion von Fieber und „sickness-behavior“ wird allerdings kontrovers diskutiert (Conti et al., 2004): Im Gehirn stimuliert TNF α die Expression von Genen pro-inflammatorischer Proteine in Mikrogliazellen (Nadeau & Rivest, 2000) und bewirkt neben relativ starkem Fieber (Dinarello et al., 1986; Goldbach et al., 1996) auch vermehrte Schlafphasen (Krueger & Majde, 1994). Durch Hemmung der biologischen Aktivität von TNF α im Gehirn können diese Symptome nach systemischer LPS-Stimulation unterdrückt werden (Cooper et al., 1994; Luheshi et al., 1997; Rivest, 2003). Andererseits kann wiederum die Neutralisierung der TNF α -Bioaktivität zu einer Verstärkung LPS-induzierter Fieberreaktionen führen (Long et al., 1990; Long et al., 1990a).

2.4.4. IL-6 als Mediator

Im Gehirn sind Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothelzellen als IL-6-responsive Zellen aber auch potentielle Produzenten von IL-6 bekannt. Sowohl LPS als auch die endogenen Pyrogene TNF α , IL-1 β und PGE₂ sind Induktoren der IL-6-Produktion (Frei et al., 1989; Maimone et al., 1993; Suganuma et al., 2002). Neben deutlich erhöhten Plasmakonzentrationen an bioaktivem IL-6 steigt die Konzentration während des Fiebers auch in der Cerebrospinalflüssigkeit an (Coceani et al., 1993; Ueno et al., 1989). Neuromodulatorische Funktionen des Zytokins sind wahrscheinlich (Juttler et al., 2002). So kann beispielsweise auch IL-6 über PGE₂ zur Hemmung warm-sensitiver Neuronen führen (Xin & Blatteis, 1992). Außerdem scheint IL-6 für die direkte genomische Aktivierung von Zellen der sCVO von großer Bedeutung zu sein. Dies wurde z.B. für Zellen im OVLT und im SFO anhand der nukleären Translokation von STAT3 nachgewiesen (Harre et al., 2002, Rummel et al. 2006). Eine entscheidende Beteiligung von IL-6 an der Fieberinduktion in den sCVO ergibt sich außerdem aus Studien mit IL-6-defizienten Mäusen, die nach einem LPS- oder IL-1 β -

Stimulus keine Fieberreaktion mehr zeigten, auf zentrale IL-6-Injektion aber mit deutlicher Fieberentwicklung reagierten (Chai et al., 1996). Trotz des geringen pyrogenen Effekts von systemisch appliziertem IL-6 (Blatteis et al., 1990; Cartmell et al., 2000; Harre et al., 2002; Sakata et al., 1991) scheint dieses Zytokin also von höchster Wichtigkeit für die Entstehung von Fieber zu sein. Dies beruht vor allem auf einer Neusynthese im ZNS, sehr wahrscheinlich auf Ebene der sCVO, dürfte sich aber auch aus dem Zusammenspiel mit anderen Mediatoren ergeben. Aufgrund der zentralen Rolle von IL-6 für die humoral vermittelte Induktion von Krankheitssymptomen, ist ein möglichst weitreichendes Verständnis regulatoriver Mechanismen, die vor allem die Wirkung dieses Zytokins bedingen und beeinflussen, von Bedeutung.

2.4.5. PGE₂ als Mediator

Neben dem Übertritt von PG aus der Peripherie im Anfangsstadium von LPS-bedingten Fieberreaktionen (Steiner et al., 2006, 2006a; vgl. S. 18) spielt sekundär im Gehirn gebildetes PGE₂ als Mediator eine entscheidende Rolle. Dieses stammt vor allem aus Gehirndothelzellen (Matsumura et al., 1998a; Matsumura & Kobayashi, 2004; Van Dam et al., 1993) und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, von wo aus eine Diffusion in Gehirnparenchym stattfindet (Engblom et al., 2002; Stitt, 1990). Aber auch perivaskuläre Mikrogliazellen kommen als Quelle des Mediators in Frage (Elmqvist et al., 1997). Im Rahmen der Fieberentstehung scheint dieses sekundär zu den entsprechenden regulatorischen Zentren (z.B. OVLT, MnPO) gelangende PGE₂ eine entscheidendere Rolle zu spielen als lokal dort gebildetes (Yamagata et al., 2001). PGE₂ wird für die Etablierung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome als Schlüsselfaktor, vor allem für die Fieberentstehung, angesehen (Roth et al., 2006). Dies erschließt sich aus zahlreichen Untersuchungen: Zum Einen konnte durch Einbringen von PGE₂ in die cerebralen Ventrikel (Milton & Wendlandt, 1971) oder die präoptische Region des anterioren Hypothalamus (Scammell et al., 1996) Fieber direkt ausgelöst werden. Ein Ansteigen der PGE₂-Spiegel im Blutplasma und im Gehirn, welches mit der Stärke der febrilen Reaktion korreliert, wurde ebenfalls gezeigt (Milton, 1998; Sehic et al., 1996). Dabei scheint für die Signaltransduktion vor allem dem EP3-Rezeptor in der präoptischen Region eine zentrale Bedeutung zuzukommen (Lazarus et al., 2007; vgl. S. 25.) Es gibt aber auch gegenteilige Erkenntnisse, so dass in einigen älteren Studien spezifische PGE-Antagonisten keine fieberhemmende Wirkung entfalteten (Cranston et al., 1976; Cranston et al., 1980; Laburn et al., 1977). In Bezug auf verminderte Futteraufnahme während Infektionen kommt Prostaglandinen ebenfalls eine wesentliche Rolle zu (Dunn & Swiergiel, 1998; Swiergiel & Dunn, 2002).

Für die Entstehung von PGE₂ aus Arachidonsäure sind Isoformen der COX (Cyclooxygenase) und PGES (Prostaglandin E Synthase) wichtige Schlüsselenzyme (Li et al., 1999; Zhang et al., 2003; siehe Abb. 3). Nachdem Arachidonsäure in einem ersten Schritt durch Phospholipase A2 von Membranphospholipiden abgespalten wurde (O'Banion, 1999), erfolgt zunächst ihre schrittweise Umwandlung zu Prostaglandin H₂ durch konstitutive COX-Isoenzyme. PGES wandelt die Prostaglandinvorstufe PGH₂ schließlich in PGE₂ um. Vor allem die COX2 und die mikrosomale PGES-1 (mPGES1) haben für die Synthese von PGE₂ eine zentrale Bedeutung (Ivanov & Romanovsky, 2004; Matsumura & Kobayashi, 2004; Zhang et al., 2003). Die durch sie vermittelten Schritte werden als geschwindigkeitsbestimmend für die Prostaglandin-Synthese angesehen (Lacroix & Rivest, 1998; Rummel et al. 2010).

Eine kolokalisierte Expression der induzierbaren Isoformen COX2 und mPGES1 gilt als wichtigste Quelle von PGE₂ im Gehirn im Verlauf von Fieberreaktionen (Matsumura & Kobayashi, 2004; Turrin & Rivest, 2004; Yamagata et al., 2001). Die gemeinsame Induktion beider Enzyme kann

dabei als Vorstufe der verzögerten Produktion von PGE₂ als sekundärer Mediator im Verlauf systemischer Inflammationen betrachtet werden (Murakami et al., 2000). COX2 wird unter anderem durch pro-inflammatorische Zytokine, vor allem IL-1 (Nadjar et al., 2005) aber auch IL-6 (Rummel et al., 2006; Conti et al., 2004), LPS oder andere Endotoxine und tumorigene Substanzen (Herschman, 1996; Kujubu & Herschman, 1992; Matsumura et al., 1998) induziert. Im Gehirn zeigt sich die Induktion der COX2-Expression im Verlauf systemischer Inflammationen in Blutgefäßen, im Parenchym und im subarachnoidalen Raum (Cao et al., 1995, 1996b, 1998; Matsumura & Kobayashi, 2004). Exprimierende Zellen sind dabei Endothelzellen, perivaskulären Mikrogliazellen und meningeale Makrophagen (Cao et al., 1995; Elmquist et al., 1997). mPGES1 wird außer in Gehirndothelzellen (Ek et al., 2001; Engblom et al., 2002a; Yamagata et al., 2001) unter anderem in Makrophagen durch LPS-Stimulation induziert (Uematsu et al., 2002). Eine gleichzeitige Induktion beider Enzyme erfolgt ebenfalls infolge LPS-Injektion und anderer inflammatorischer Stimuli wie IL-1 β , TNF α und IL-6 (Cao et al., 2001; Cao et al., 1996b, 1998; Ek et al., 2001), vor allem in Zellen der CVO (Damm et al., 2011; Rummel et al., 2005; Rummel et al., 2008), Endothelzellen (Matsumura & Kobayashi, 2004) und perivaskulären Zellen (Schiltz & Sawchenko, 2003).

Die Bedeutung von COX2 und mPGES für die Entwicklung zentralnervös kontrollierter Krankheits-symptome ist eindeutig: Eine fiebersenkende bzw. -hemmende Wirkung von Medikamenten, die die PGE₂-Synthese hemmen (Cao et al., 1997; Milton, 1998; Roth & De Souza, 2001; Yamagata et al., 2001; Zeisberger, 1999; Zhang et al., 2003), in Zusammenhang mit der Verringerung auch anderer Symptome des „sickness-behavior“ wie beispielsweise Anorexie (Dunn & Swiergiel, 1998; Swiergiel & Dunn, 2002), ist hinlänglich bekannt. Neben der anti-inflammatorischen Wirkung von beispielsweise COX-Hemmern belegen aber auch Studien mit COX2-defizienten Mäusen die Bedeutung dieses Enzyms für die Entwicklung der inflammatorischen Antwort, die eine ausbleibende Fieberentwicklung nach Stimulation mit LPS oder IL-1 β in diesen Tieren zeigen (Li et al., 2001; Li et al., 1999). In mPGES1-defizienten Mäusen tritt ebenfalls eine verminderte Fieberentwicklung auf (Engblom et al., 2003; Trebino et al., 2003). Die mPGES1-Expression zeigt außerdem im zeitlichen Verlauf eine Korrelation zur während des Fiebers ansteigenden PGE₂-Menge (Trebino et al., 2003).

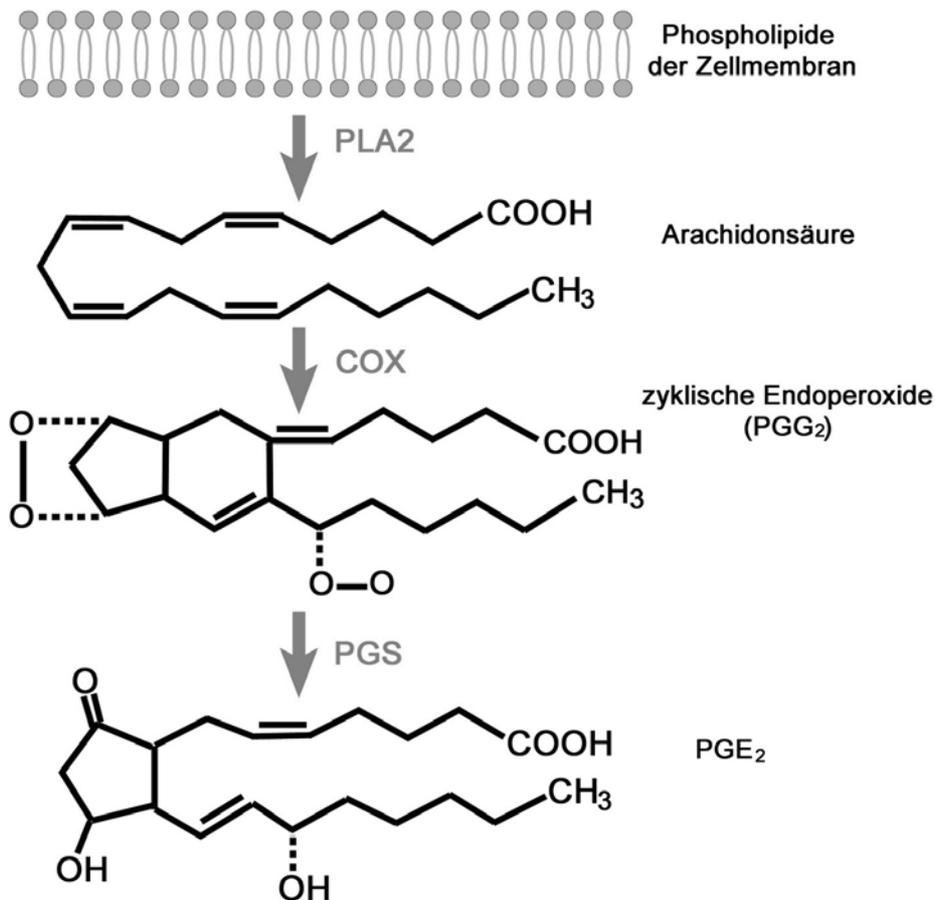


Abb. 3: Schematische, vereinfachte Darstellung der Prostaglandinsynthese

Phospholipide als Bestandteile der Zellmembran werden durch die Phospholipase A2 (PLA2) gespalten, so dass Arachidonsäure entsteht. Diese kann durch Vertreter der Cyclooxygenasen (COX) und Prostaglandinsynthasen (PGS) über Zwischenstufen zu Prostaglandinen (z.B. PGE₂) umgewandelt werden. Die induzierbaren Isoformen COX2 und mPGES1 spielen bei der Entstehung von PGE₂ als Mediator im Gehirn eine entscheidende Rolle.

2.5. Genomische Zellaktivierung

2.5.1. Entscheidende Transkriptionsfaktoren

Die genomische Aktivierung von Zellen durch primäre und sekundäre Mediatoren wird durch Transkriptionsfaktoren vermittelt (Abb. 4). Nach der Bindung von Liganden an entsprechende Rezeptoren werden diese Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Signalkaskade aktiviert und translozieren in den Zellkern (Nadjar et al., 2005; Rummel et al., 2006; Tanabe & Tohnai, 2002). Im Allgemeinen interagieren Transkriptionsfaktoren dort mit regulatorischen Elementen von Promotoren der weiter davon entfernten Enhancern. Ihre Interaktion mit entsprechenden „DNA-Erkennungsstellen“ innerhalb dieser Elemente erhöhen die Frequenz der Initiation der Transkription. Dies erfolgt durch direkten Kontakt des Transkriptionsfaktors mit dem sog. basalen Transkriptionsapparat anschließend an seine DNA-Bindung (Johnson & McKnight, 1989; Mitchell & Tjian, 1989). Somit kann man die Akkumulation bestimmter Transkriptionsfaktoren im Rahmen von Entzündungsreaktionen als Merkmal für genomische Zellaktivierungen betrachten, die wiederum zu charakteristischen Expressionsmustern von Zielgenen führen und mit den beobachtbaren Krankheitssymptomen z.T. assoziiert sind.

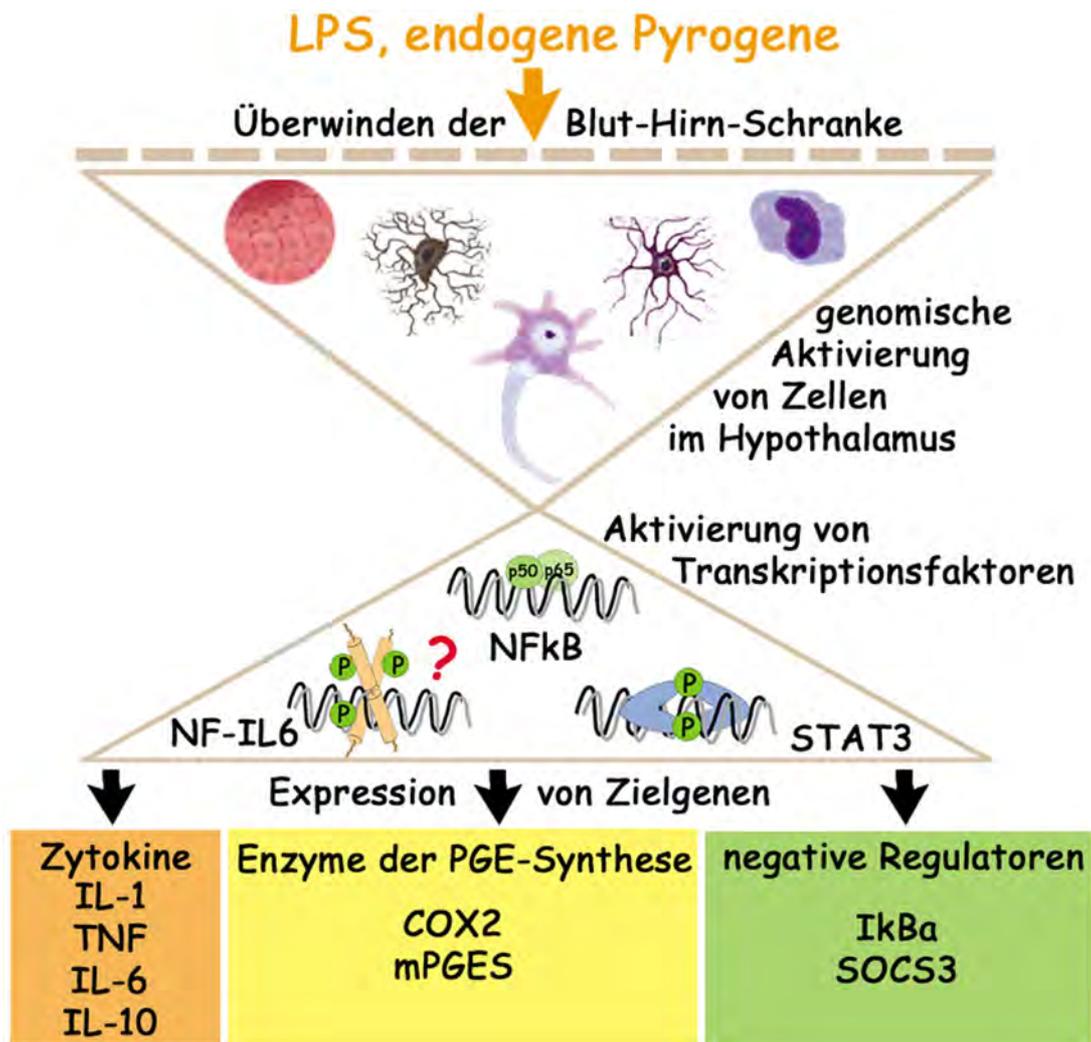


Abb. 4: Schema der genomischen Zellaktivierung nach peripherer Immunstimulation über charakteristische Transkriptionsfaktoren

Exogene oder endogene Pyrogene erreichen nach Überwinden der Blut-Hirn-Schranke (vgl. Abb. 2) das Gehirn. Dort binden sie an Zellen der Hirngefäße, der Blut-Hirn-Schranke oder des Gehirnparenchyms (v. l. n. r: Endothelzellen, Astrozyten, Neurone, Mikrogliazellen, perivaskuläre Makrophagen). Über spezifische Rezeptoren werden innerhalb dieser Zellen Signalkaskaden aktiviert. Diese führen zur Aktivierung und nukleären Translokation von Transkriptionsfaktoren (NF-κB, STAT3; genaues über die Beteiligung von NF-IL6 [Nuclear Factor-IL-6] ist bisher noch nicht bekannt). Das „Milieu“ aktivierter Transkriptionsfaktoren bedingt charakteristische Expressionsmuster ihrer Zielgene (Zytokine, Enzyme der Prostaglandinsynthese und endogene, negative Regulatoren der Transkriptionsfaktoren; Kästen unten). Die Akkumulation von NF-κB und STAT3 im Zellkern wurde bereits vielfach als Marker für zelluläre genomische Aktivierung bestimmter Hirnareale in frühen Phasen der Entzündungsreaktion herangezogen.

Bei Entzündungsreaktionen werden unter anderem STAT3 und NF-κB aktiviert (Akira, 1997; Nadjar et al., 2003). Diese Aktivierungen, bzw. die nukleären Translokationen, zeigen typische neuroanatomische Verteilungsmuster (Kozak et al., 2006; Rummel et al., 2006; Kano et al., 2003; Nadjar et al., 2005a) und werden durch primäre Mediatoren wie LPS, TNFα, IL-1β oder IL-6, die das Gehirn erreichen, ausgelöst. Das Zusammenspiel dieser Mediatoren bedingt ein „Milieu“ aktivierter Transkriptionsfaktoren, die durch gegenseitige Förderung oder Hemmung und verschiedene Auswirkungen auf die Expression von Zielgenen in verschiedenen Zellen miteinander interagieren

(Agrawal et al., 2003). Für genauere Informationen über die Beteiligung der primären Mediatoren im Einzelnen, bzw. in spezifischen Kombinationen an dem resultierenden „Cocktail“ aktivierter Transkriptionsfaktoren im Gehirn, bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen. Darüber hinaus liegen nur unzureichende Daten über die Bedeutung der kombinierten Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren für die Expression von Zielgenen und damit verbundene Krankheits-symptomen vor.

2.5.1.1. NF- κ B

NF- κ B als Mitglied der Transkriptionsfaktorfamilie *rel* liegt zytosolisch meist als Dimer aus den Proteinen p50 (DNA-bindend) und p65 (transaktivierend) vor. Durch Komplexbildung mit I κ B-(Inhibitor of κ B) Proteinen wird in ruhenden Zellen die nukleäre Translokation und somit die Initiation der Transkription verhindert (Übersicht: Baeuerle & Baltimore, 1996). Diese Inhibition wird erst durch einen aktivierenden Stimulus aufgehoben, wobei die I κ B zweifach phosphoryliert und anschließend ubiquitiniert werden, so dass ihr Abbau im 26S Proteasom erfolgt (siehe auch Abb. 5 und 6). Anschließend können die freien NF- κ B-Dimere in den Kern translozieren und an regulatorische Elemente („ κ B enhancer elements“) binden (Baeuerle & Henkel, 1994; Siebenlist et al., 1994; Chen et al., 1995). Eine negative Regulation von NF- κ B-vermittelten Reaktionen wird unter anderem dadurch erreicht, dass der Transkriptionsfaktor selbst die Expression von I κ B α forciert (Abb. 4), so dass sich anschließend an die Aktivierung wieder vermehrt inaktive NF- κ B-Komplexe zusammenfinden (Hanada & Yoshimura, 2002). Der endogene Inhibitor I κ B α wird auf inflammatorische Stimuli hin schnell und anhaltend im Gehirn exprimiert, in Endothelzellen von Gehirnkapillaren und in Mikrogliazellen im Parenchym (Laflamme et al., 1999; Laflamme & Rivest, 1999; Quan et al., 1997). Das anti-inflammatorische IL-10 kann eine verminderte Degradation von I κ B α bewirken und auf diese Weise NF- κ B-Wirkungen unterbinden (Lentsch et al., 1997). NF- κ B wird eine Schlüsselrolle für die Initiation von Inflammationen zugesprochen. Unter anderem ist eine Beteiligung an der Expression von Adhäsionsmolekülen und daraus resultierender Leukozytenmigration, sowie zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine bekannt (Chen et al., 1995; Lawrence et al., 2001). Andererseits kann NF- κ B aber auch an der Produktion anti-inflammatorischer Mediatoren wie TGF (transforming growth factor) - β 1 beteiligt sein (Lawrence, 2001).

2.5.1.2. STAT3

Die STAT-Familie umfasst bisher 7 Mitglieder, von denen STAT3 am weitesten verbreitet ist (Bhattacharya & Schindler, 2003). Nach Phosphorylierung der in ruhenden Zellen einzeln im Zytosol vorliegenden STAT3-Moleküle, können diese Homodimere oder Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren bilden und in dieser Form in den Nukleus translozieren (Gerhartz et al., 1996; Stahl et al., 1995; Wegenka et al., 1993; Zhong et al., 1994; siehe auch Abb. 7). Allerdings findet auch ein konstitutiver Im- und Export nicht-aktivierter STAT-Moleküle statt, denen eine Bedeutung als Koaktivatoren zugeschrieben wird (Meyer et al., 2002; Chatterjee-Kishore et al., 2000).

Die Signaltransduktion über STAT-Moleküle basiert auf rezeptorassoziierten Tyrosinkinase der JAK- (Janus-Kinase) Familie wie JAK2 (Lutticken et al., 1994; Stahl et al., 1994; vgl. Kap. 2.5.2.4.). Sie kann durch endogene JAK Inhibitoren der SOCS- (suppressor of cytokine signaling) Gruppe negativ reguliert werden (Krebs & Hilton, 2001; Yasukawa et al., 2000). SOCS3 vermittelt die Inhibition über die Bindung an Zytokinrezeptoren und damit verbundene Hemmung der JAK-Aktivität (Sasaki et al., 1999; Yasukawa et al., 1999; siehe auch Abb. 7). Somit dient SOCS3 als negativer Regulator STAT3-induzierender Signale wie IFN γ oder IL-6 (Cassatella et al., 1999). Eine direkte Aktivierung dieses negativen „feedbacks“ durch IL-1 β , TNF α oder LPS konnte ebenfalls nachge-

wiesen werden (Bode et al., 1999; Boisclair et al., 2000). Die negative Regulation durch SOCS3 wird von der STAT3-Aktivierung selbst initiiert (Abb. 4), indem dieser Transkriptionsfaktor die Expression des Inhibitors steigert, so dass hier von einem autoregulatorischen Mechanismus ausgegangen werden kann (Hanada & Yoshimura, 2002). SOCS3-Expression kann somit als indirekter Aktivierungsmarker von STAT3 angesehen werden (Lebel et al., 2000). Langfristig führt eine Zytokinstimulation jedoch wieder zum Abbau von SOCS3, was über Ubiquitinierung und Abbau in Proteasomen erreicht wird (Hanada & Yoshimura, 2002; Elliott et al., 1994).

STAT3 wird allgemein durch Zytokine der IL-6-, IL-10- und IFN-Familie beeinflusst (Kisseleva et al., 2002). Eine nukleäre Translokation von STAT3 infolge LPS-Stimulation wurde erstmals von Kongsman et al. für das OVLT gezeigt (Kongsman et al., 2000). Zwei im Rahmen inflammatorischer Reaktionen bedeutende, von STAT3 wahrscheinlich zumindest indirekt regulierte Zielgene, sind die Gene für COX2 und mPGES (Oka et al., 2007; Rummel et al., 2006). Eine konstitutiv erhöhte STAT3-Aktivierung wird häufig beim Vorliegen chronischer Inflammationen festgestellt (Hanada & Yoshimura, 2002).

2.5.2. Wege der Signalweiterleitung durch potentielle Mediatoren

2.5.2.1. Signaltransduktion durch IL-1 β

Die Signaltransduktion wird für alle Mitglieder der IL-1 Familie der Zytokine über die Rezeptortypen IL-1R-1 und -2 vermittelt, wobei IL-1R-1, einem Mitglied der Familie der toll-like Rezeptoren (TLR), als aktivierender Rezeptor eine zentrale Bedeutung zukommt (Conti et al., 2004; Dinarello & Savage, 1989; Heguy et al., 1992). Durch Bindung von IL-1 β an Vertreter dieses Subtyps kommt es zunächst zur Bildung von Heterodimeren mit dem Korezeptor IL-1RacP (IL-1-Rezeptor akzessorisches Protein; Dower et al., 1985; Greenfeder et al., 1995; Sims et al., 1989; siehe auch Abb. 5). Neben AP-1 (activator protein 1) wurde vor allem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Ligandenbindung am IL-1R-1 beschrieben (Übersicht: Bankers-Fulbright et al., 1996). Bei diesem Prozess sind einige Signalkoppler am Rezeptor notwendig (siehe Abb. 5). Für die Vermittlung von IL-1 β -bedingten Verhaltensänderungen im Rahmen des „sickness-behavior“ gilt NF- κ B als wichtigster Vermittler im Gehirn, was durch eine erhöhte Expression von I κ B α z.B. in den CVO bei peripherer Immunstimulation untermauert werden konnte (Quan et al., 1997).

2.5.2.2. Signaltransduktion durch LPS

Zur Auslösung der Signaltransduktion bildet LPS zunächst einen Komplex mit seinem Bindungsprotein LBP (LPS binding protein), das während inflammatorischer Reaktionen vermehrt im Serum vorliegt (Schumann et al., 1990). Lösliche oder an der Oberfläche von Monozyten bzw. Makrophagen exprimierte Rezeptoren der Klasse CD14 binden diesen Komplex (Arditi et al., 1993; Chen et al., 1992; Mathison et al., 1992; Schletter et al., 1995). Die vom Gesamtkomplex ausgelöste Signaltransduktion findet vor allem über den TLR4 statt (Abb. 5). TLR4 und IL-1R-1 besitzen als Mitglieder der gleichen Rezeptorfamilie mit der TIR (Toll-IL1-receptor homology domain) eine hoch konservierte gemeinsame Domäne (Fitzgerald & O'Neill, 2000). Daher teilen sich ihre Liganden, LPS und IL-1 β , gemeinsame Signalwege bei der Fieberinduktion und führen deshalb zu ähnlichen Reaktionen (Laflamme & Rivest, 2001; Rivest, 2003), die häufig über NF- κ B vermittelt werden (Conti et al., 2004). Die Aktivierung von NF- κ B über TLR erfolgt mechanistisch auf einem der Signaltransduktion am IL-1R-1 analogen Weg.

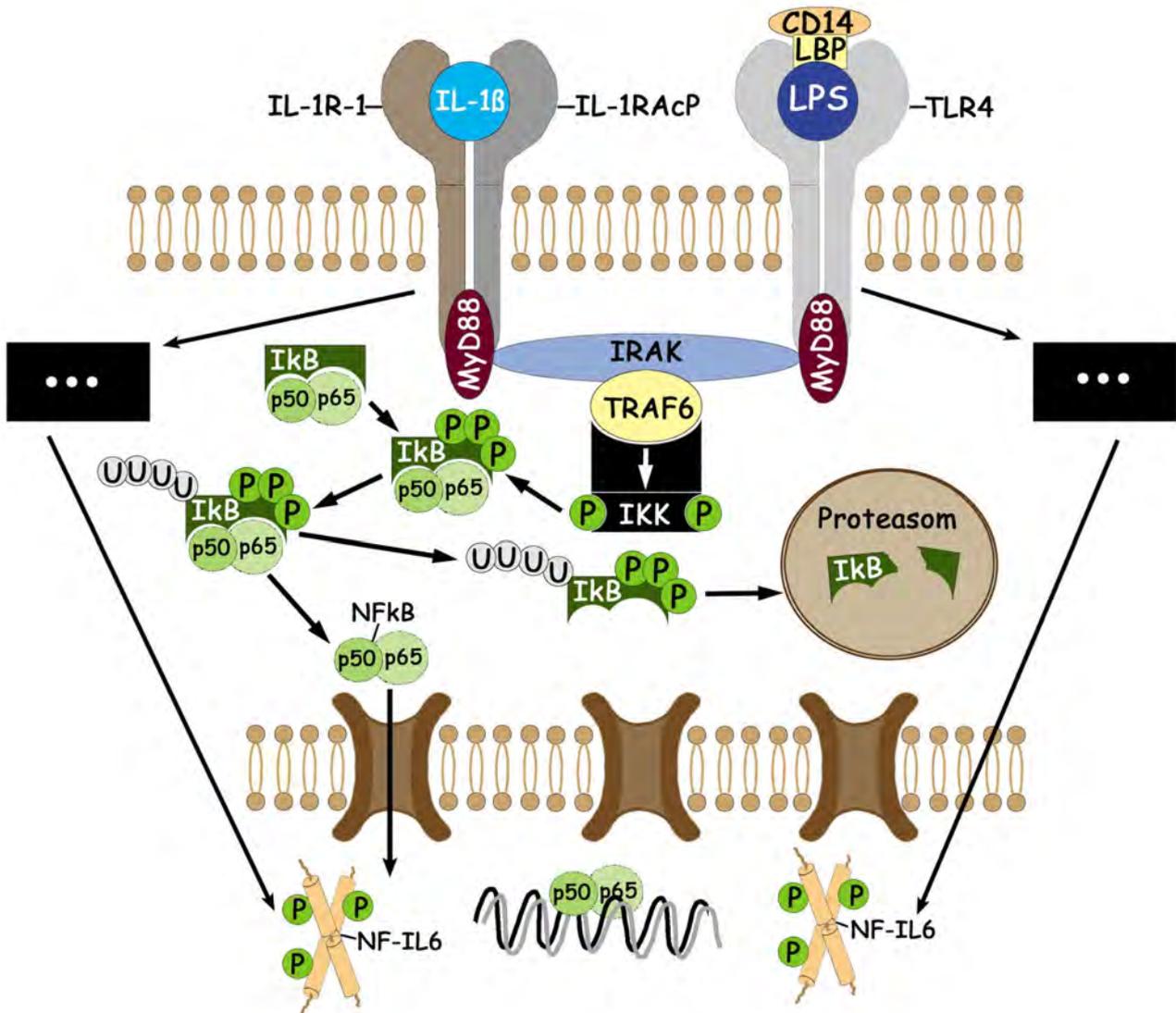


Abb. 5: Signaltransduktion durch NF-κB am IL-1R-1 oder TLR4

Die ähnlichen Signalwege am IL-1R-1 und TLR4 kommen durch die gemeinsame Domäne TIR (Toll-IL1-receptor homology domain) zustande. Zunächst wird die Ser/Thr Kinase IRAK (Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase) über eine Vermittlung von MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein) an den Rezeptor gebunden und autophosphoryliert (Cao et al., 1996b; Martin et al., 1994; Wesche et al., 1997). Anschließend bindet der TNFα Rezeptor assoziierte Faktor TRAF6 an IRAK (Cao et al., 1996a) und der IKK (IκB-Kinase-Komplex) wird aktiviert, welcher letztendlich die Phosphorylierung von IκB katalysiert (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997; Regnier et al., 1997). Dadurch wird zytosolisches NF-κB freigesetzt, welches in den Zellkern translozieren und dort die Transkription seiner Zielgene steigern kann (vgl. Kap. 2.5.1.1.). Nach Ubiquitinierung wird IκB im Proteasom abgebaut. Auch eine Aktivierung von NF-IL6 am IL-1R-1 und am TLR4 wurden bereits beschrieben (schwarze Kästen; vgl. Kap. 3.2.1.). Modifiziert nach Conti et al., 2004.

2.5.2.3. Signaltransduktion durch TNF α

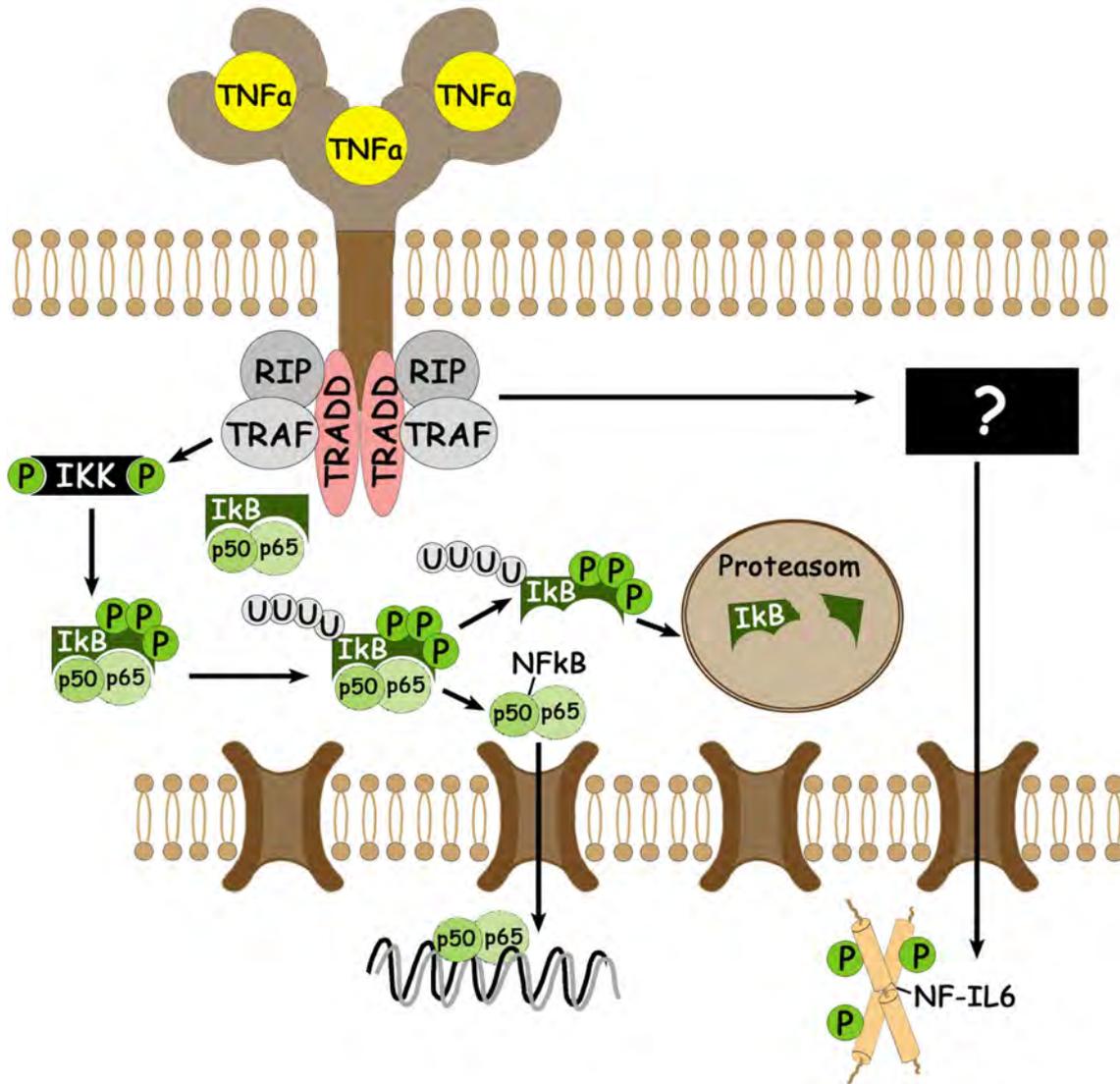


Abb. 6: Signaltransduktion am TNF α Rezeptor

Nach Ligandenbindung am TNFR-1 und Aufhebung der Aktivierungshemmung bindet das Adaptermolekül TRADD (TNF-receptor 1- associated DEATH domain protein) an den Rezeptor, welches die Bindung weiterer Proteine wie beispielsweise TRAF (TNF-receptor associated factor) oder RIP (Receptor-interacting protein) bedingt. Der Komplex aus TNFR-1, TRAF und RIP (Komplex 1) kann eine Aktivierung von NF- κ B bewirken (vgl. Abb. 5, Kap. 2.5.2.1.). Schwarze Kästchen deuten einen möglichen Signalweg an, der am TNFR-1 eine NF-IL6-Aktivierung bewirken könnte.

Drei Unterarten des TNF α -Rezeptors kommen vor, wobei dem TNFR-1 (auch p55) für inflammatorische Zustände die wichtigste Rolle zugeschrieben wird (Chen & Goeddel, 2002). Dieser liegt in inaktivem Zustand als Trimer vor (Chan et al., 2000). Als Homotrimer zirkulierender TNF α kann so mehrere TNF-Rezeptoren gleichzeitig aktivieren (Idriss & Naismith, 2000). Die Ligandenbindung bewirkt zunächst eine Freisetzung des Proteins SODD (silencer of death domain), so dass die vorherige Hemmung der Aktivierung aufgehoben wird und die Signaltransduktion beginnt (Jiang et al., 1999). Die Signalkaskade über mehrere Koppler (siehe Abb. 6) kann auch hier letztendlich zur Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges führen (Hsu et al., 1996a; Hsu et al., 1996; Hsu et al., 1995; Legler et al., 2003; Micheau & Tschopp, 2003; siehe auch Kap. 2.5.1.1., Abb. 5). Neben einer Aktivierung von AP-1 (Lee et al., 1997; Natoli et al., 1997; Reinhard et al., 1997) wurde auch

eine Steigerung der nukleären Konzentration von NF-IL6 infolge der TNF α -Rezeptorbindung gezeigt, die genauen Mechanismen sind aber bislang nicht bekannt (Yin et al., 1996).

2.5.2.4. Signaltransduktion durch IL-6

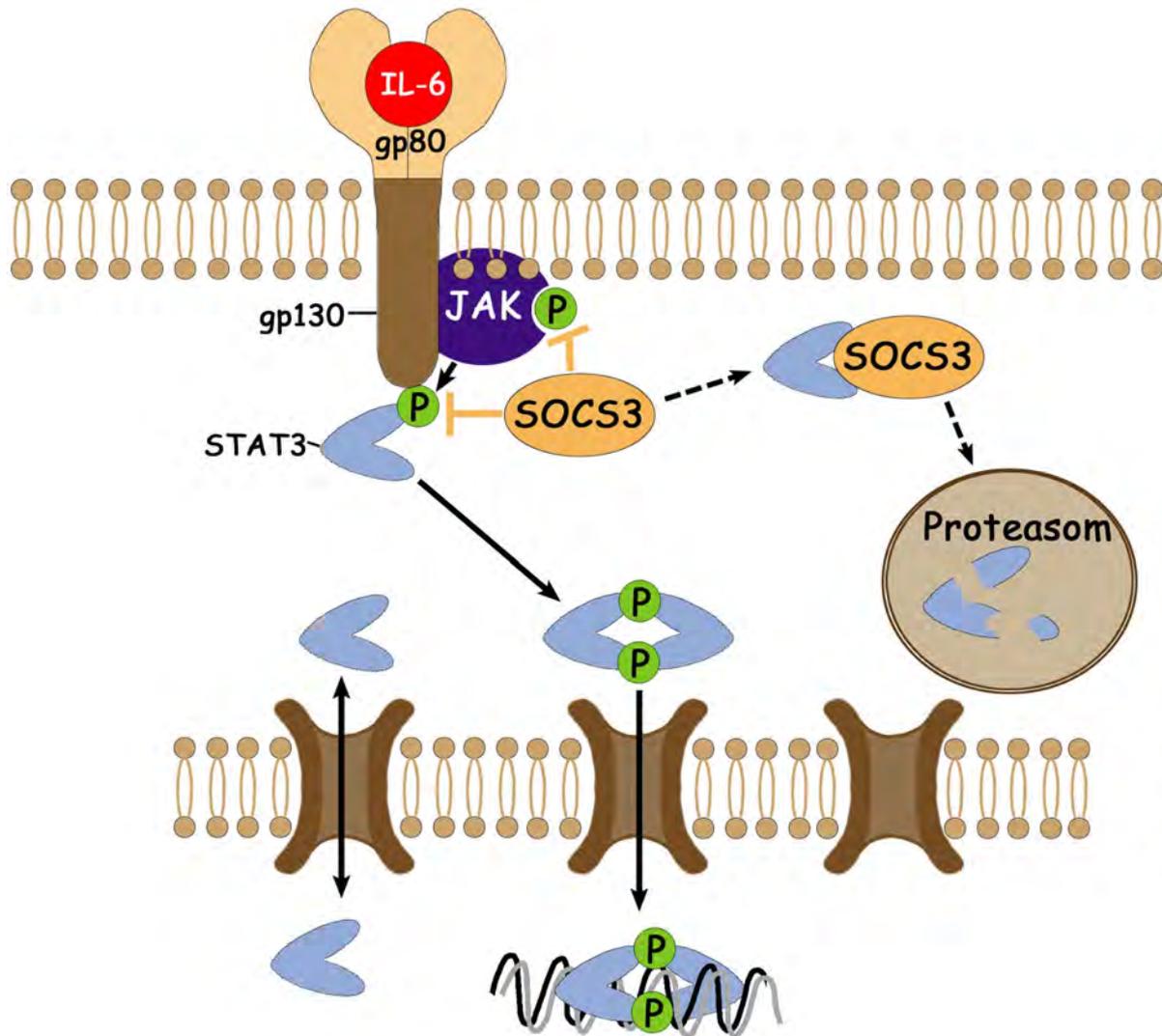


Abb. 7: Aktivierung von STAT3 am IL-6 Rezeptor

Von der Tyrosinkinase JAK2 phosphorylierte Rekrutierungsstellen dienen der Phosphorylierung von STAT3-Monomeren, die daraufhin dimerisieren, in den Zellkern translozieren und zur Induktion von Zielgenen führen. Ein konstitutiver Im- und Export nicht-aktivierter STAT3-Moleküle findet außerdem statt. Der endogene Inhibitor SOCS3 inhibiert die JAK-Aktivität am Rezeptor und könnte am vermehrten Abbau von STAT3 im Proteasom beteiligt sein (vgl. Kap. 2.5.1.2.).

Für IL-6 beginnt wie für alle Mitglieder der sog. IL-6-Familie die Signalkaskade mit der Bindung des Zytokins an einen zweiteiligen Rezeptor aus zytokinbindender- und Signaltransduktionseinheit. Erstere stellt in diesem Fall der IL-6 Rezeptor (IL-6R bzw. gp80, auch CD126) dar. Wie alle Zytokine dieses Typs entfaltet IL-6 seine Wirkungen über das Vermittlerprotein gp130 (Heinrich et al., 1998), welches als signaltransduzierender Anteil durch Interaktion mit IL-6R dimerisiert (Hibi et al., 1990; Murakami et al., 1993). Daraufhin werden konstitutiv an den zytoplasmatischen Anteil von gp130 (auch CD130) assoziierte Tyrosinkinasen der JAK- (Janus-Kinase-) Familie, JAK1, JAK2 und TYK2 durch Autophosphorylierung aktiviert, welche wiederum Tyrosin-Reste des zytoplasmati-

schen Anteils von gp130 phosphorylieren (Lutticken et al., 1994; Stahl et al., 1994; siehe Abb. 7,8). Zu diesen Motiven werden Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (STAT1 & STAT3) sowie die Tyrosin-Phosphatase SHP2 (Src-homology phosphatase) rekrutiert und dort ebenfalls phosphoryliert (Gerhartz et al., 1996; Stahl et al., 1995). Infolge der Phosphorylierungen können zum Einen STAT-Moleküle über ihre SH- (src-homology) 2-Domänen Homo- und Heterodimere bilden. Diese translozieren in den Nukleus, wo sie an responsive Elemente der Promotoren von IL-6-Zielgenen binden und deren vermehrte Transkription bewirken (Wegenka et al., 1993; Zhong et al., 1994). Die visuelle Darstellung der nukleären Akkumulation von STAT3, z.B. mittels Immunhistochemie, kann als Marker der Zellaktivierung, z.B. durch im Zuge inflammatorischer Reaktionen wirkendes IL-6 dienen und ermöglichte in der Vergangenheit einen guten Überblick über räumliche und zeitliche Aktivierungsmuster in entscheidenden Hirnarealen (Harre et al., 2002; Hübschle et al., 2001a; Hübschle et al., 2001a; Rummel et al., 2004; Rummel et al., 2005a). Dephosphorylierung und Rücktransport von STAT3-Molekülen ins Zytoplasma (Bhattacharya & Schindler, 2003; Haspel & Darnell, 1999) oder auch Abbau im Proteasom führen zur Inaktivierung von STAT3 und beenden die Signaltransduktion.

Ein alternativer Weg am IL-6R nimmt ebenfalls an der JAK seinen Ausgang. Über Adapterproteine und eine MAPK (mitogen-activated protein kinase) -Kaskade kommt es letztendlich zur Phosphorylierung und Aktivierung von NF-IL6, welcher dann ebenfalls als Homo- oder Heterodimer die Transkription von IL-6-Zielgenen steigern kann (Akira, 1997; Li et al., 2007; siehe Abb. 8). Auch die Proteinkinasen (PK) C und -A, sowie die p90RSK (ribosomal protein S6 kinase) könnten an der nukleären Translokation und Steigerung der Genexpression durch NF-IL6 beteiligt sein (vgl. Kap. 3.2.2.).

Interferone wirken über ihre spezifischen Rezeptoren auf ganz ähnliche Weise: So sind auch hier rezeptorassoziierte JAK beteiligt, die zur Rekrutierung und Aktivierung von STAT-Molekülen führen. Ihre Bindung an die sog. „gamma-activated sequence“ (GAS) führen so zur gesteigerten Expression von Zielgenen. Auch durch Bindung von STAT-Dimeren an Mitglieder der „interferon regulatory factor“ (IRF) -Familie und deren anschließende Bindung als „IFN-stimulated gene factor“ (ISGF) 3 an entsprechende DNA-Regionen (IFN-stimulated regulatory elements, ISRE) kann eine Zielgeninduktion stattfinden (Stark, 1998).

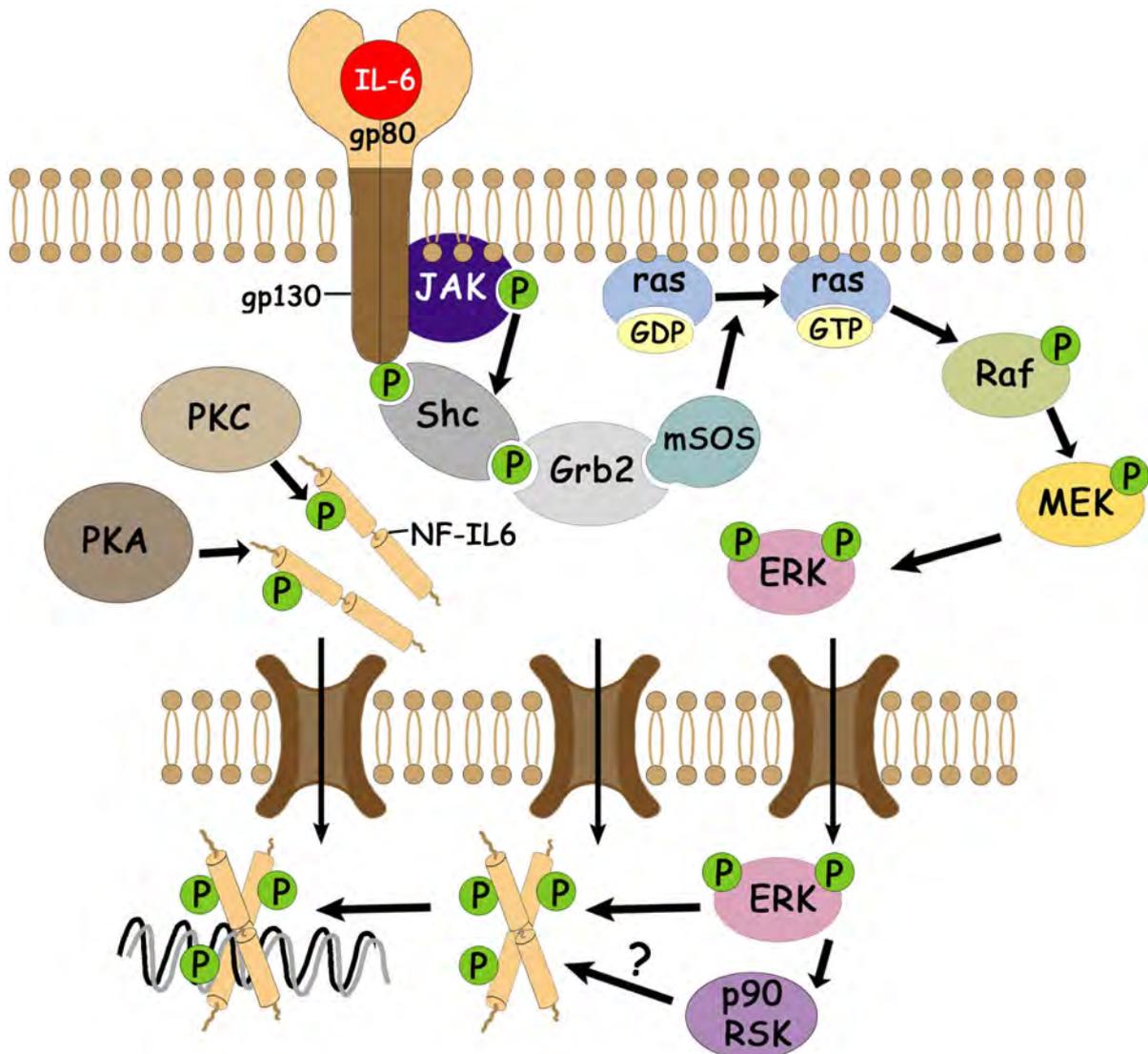


Abb. 8: Aktivierung von NF-IL6 am IL-6 Rezeptor

Über das Adapterprotein Grb (Growth factor receptor binding protein) -2 beginnt die Signalkaskade. Dieses interagiert, z.T. über das Protein Shc (Src homologous collagen), mit dem phosphorylierten Rezeptor (Akira, 1997; Cutler et al., 1993). Die Beteiligung weiterer Adapterproteine wird diskutiert, z.T. kann die Aktivierung aber auch ohne Vermittlung durch ein Adapterprotein ablaufen (Akira, 1997). Schließlich wird das „Guanin nucleotide exchange protein“ mSOS (mammalian son of sevenless) aktiviert und dadurch eine MAPK-Kaskade angestoßen: mSOS vermittelt den Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat) am kleinen G-Protein ras (reticular activating system). Aktives ras rekrutiert Raf (rapidly growing fibrosarcoma/rat fibrosarcoma), eine MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) zur Zellmembran und aktiviert sie dort. Über Raf erfolgt die Phosphorylierung von MAPK Kinasen (MAPKK) der MEK- (MAP Kinase/ERK Kinase) -Familie, die letztendlich MAPKn wie ERK (Extracellular regulated kinase) -1 oder -2 phosphorylieren. Diese können ebenso wie PKA, PKC oder p90RSK möglicherweise NF-IL6 phosphorylieren (vgl. Kap. 3.2.2.).

3. Der Transkriptionsfaktor NF-IL6

NF-IL6 ist als Mitglied der „CCAAT-enhancer-binding protein family“ (C/EBP) der Transkriptionsfaktoren ebenso unter dem Namen C/EBP β bekannt. Die Gruppe der C/EBP wurde erstmals von Johnson und McKnight (1989) erwähnt. Diese beschrieben eine Gruppe hitzestabiler Faktoren in Leber-Zellkernen der Ratte, die unter anderem mit dem sog. CCAAT-Box-Motiv zahlreicher zellulärer Genpromotoren interagieren können. Bis heute sind die Vertreter C/EBP α , β , γ , δ , ϵ und ζ bekannt (Ramji & Foka, 2002). In vielen Geweben kommen mehrere Mitglieder der C/EBP-Familie vor, die einerseits synergistische, andererseits aber auch antagonistische Funktionen erfüllen können (Ramji & Foka, 2002).

3.1. Charakterisierung von NF-IL6

Als Synonyme von C/EBP β sind neben NF-IL6 in bisherigen Veröffentlichungen die Bezeichnungen IL-6-DBP (IL-6-dependent DNA binding protein, Poli et al., 1990), LAP (Liver-enriched activating protein, Descombes et al., 1990) bzw. LIP (Liver-enriched inhibitory protein, Descombes & Schibler, 1991), AGP/EBP (α_1 -Acid Glycoprotein enhancer binding protein, Chang et al., 1990), CRP2 (C/EBP related protein 2, Williams et al., 1991) oder NF-M (Nuclear factor-myeloid, Katz et al., 1993) verwendet worden. NF-IL6 wurde ursprünglich als Regulator von IL-1- und IL-6-vermittelten Transkriptionen entdeckt (Akira et al., 1990; Isshiki et al., 1990; Poli et al., 1990).

3.1.1. Struktur

Wie alle C/EBP gehört NF-IL6 zur sogenannten Transkriptionsfaktor-Superfamilie „bZIP“, die sich durch die sog. bZIP-Domäne am C-Terminus auszeichnet. Diese setzt sich aus einer evolutionär hoch konservierten helikalen DNA-bindenden Region („basic region, b“) und dem daran anschließenden α -Helix-Dimerisierungsmotiv, das allgemein als Leucin-Zipper („ZIP“) bezeichnet wird, zusammen (Akira et al., 1990; Landschulz et al., 1988; Poli et al., 1990; Ramji & Foka, 2002; Williams et al., 1995; Williams et al., 1991). Zwei zentrale regulatorische (oder Repressions-) Domänen (RD1 und RD2) in unmittelbarer Nähe der basischen Region beherbergen Phosphorylierungsstellen für zahlreiche Proteinkinasen (Li et al., 2007; Williams et al., 1995). Am N-Terminus befindet sich die Aktivierungsdomäne, „transcription activation domain“ (TAD), welche die transkriptionale Antwort kontrolliert (Agre et al., 1989). In der Mitte des Proteins liegt die inhibitorische Domäne, die durch Maskierung der Aktivierungsdomäne TAD eine Interaktion des Transkriptionsfaktors mit dem basalen Transkriptionsapparat verhindert. Außerdem werden sowohl die Aktivierungsdomäne als auch die bZIP-Domäne aufgrund der stark gefalteten Tertiärstruktur von NF-IL6 durch Interaktionen mit RD1 und RD2 maskiert (Akira, 1997; Williams et al., 1995). Durch Phosphorylierungen von Ser- und Thr-Resten wird die TAD letztendlich freigegeben und eine Bindung an Promotoren ermöglicht (Kowenz-Leutz et al., 1994; Williams et al., 1995).

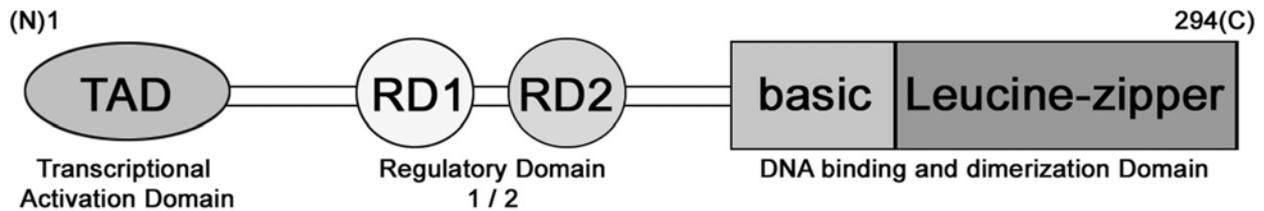


Abb. 9: Schematische Darstellung der Struktur von NF-IL6

Das für alle C/EBP charakteristische „bZIP“ Motiv setzt sich aus der basischen und der DNA-bindenden Region am C-Terminus zusammen (Leucine-zipper). RD: regulatory domain, TAD: transcription activation domain. (Modifiziert nach Li et al., 2007)

Es existieren verschiedene Isoformen von NF-IL6, die sich durch ihr Molekulargewicht unterscheiden: LAP* (Liver-enriched activating protein, 38 kDa), LAP (35 kDa) und LIP (Liver-enriched inhibitory protein, 20 kDa). Außerdem wurde von einer weiteren Isoform mit nur 14 kDa berichtet (An et al., 1996). Alle Isoformen entstehen aus einer einheitlichen NF-IL6 mRNA, welche aus dem intronlosen Gen *lap* transkribiert wird. LAP und LIP stellen die am häufigsten von Zellen produzierten Isoformen dar (Descombes & Schibler, 1991). In der Isoform LIP fehlt die Aktivierungsdomäne, so dass diese allgemein als dominant negativer Inhibitor gilt. Transkriptionsfaktor-Dimere, die LIP enthalten, sind nicht funktional (Descombes & Schibler, 1991; Ramji & Foka, 2002). Die Entstehung der verschiedenen Isoformen basiert auf dem sogenannten „leaky ribosome scanning“ Mechanismus (LRS), wobei die Translation einer mRNA durch unterschiedliche Startcodons an verschiedenen Stellen der gleichen mRNA initiiert wird. (Descombes & Schibler, 1991). Eine andere Entstehungsmöglichkeit für die verschieden langen NF-IL6 Formen besteht in einer regulierten Proteolyse (Welm et al., 1999).

3.1.2. Funktionsweise

Dimere aus bZIP Transkriptionsfaktoren bilden die Struktur eines umgekehrten Y, wobei jeder „Arm“ des Y dabei durch eine „basic region“ gebildet wird. Zusammen binden sie scherenartig an je eine Hälfte der palindromischen Erkennungssequenz in der großen Grube der DNA (Descombes & Schibler, 1991; Hurst, 1995; Kouzarides & Ziff, 1989; Landschulz et al., 1988; Turner & Tjian, 1989; Vinson et al., 1989).

Posttranskriptionale Modifikationen stellen eine entscheidende Regulationsebene der NF-IL6-Funktion dar, wobei Phosphorylierungen an verschiedenen Aminosäureresten eine Schlüsselrolle zukommt (Ramji & Foka, 2002). Sowohl die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors als auch seine DNA-Bindungsaktivität und sein Transaktivierungspotential können durch diese Modifikationen positiv wie negativ reguliert werden (Ramji & Foka, 2002). NF-IL6-Effekte können außerdem durch Steigerung der eigenen Gentranskription bzw. Proteinexpression bedingt sein. So steigern z.B. IL-1 β , IL-6, LPS und IFN γ die Effektivität NF-IL6-bedingter Reaktionen durch Steigerung der verfügbaren NF-IL6-Menge (Akira, 1997; Akira et al., 1995). Schließlich kann die Aktivität und Funktion von NF-IL6 auch über dessen Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren – meist aus der gleichen Familie – verändert werden, da NF-IL6 neben Homodimeren auch Heterodimere mit diesen bilden kann (Übersicht: Ramji & Foka, 2002).

3.2. Aktivierung, Signaltransduktion und Regulation

3.2.1. Aktivatoren von NF-IL6

3.2.1.1. Inflammatorische Stimuli

Ursprünglich wurde NF-IL6 als nukleärer Faktor beschrieben, der an das IL-1-responsive Element des IL-6-Gens bindet und dessen mRNA-Expression unter anderem durch Stimulation mit LPS, IL-1, IL-6 oder TNF α in verschiedenen Geweben induziert werden kann (Akira et al., 1990; Übersicht: Akira & Kishimoto, 1997). In murinen Makrophagen und primären Astrozyten können beispielsweise die Mediatoren LPS, IL-1 β , TNF α und IFN γ einzeln oder in Kombination eine Induktion der NF-IL6 mRNA bewirken und z.T. eine verstärkte Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors bedingen (Cardinaux et al., 2000; Pahan et al., 2002; Tengku-Muhammad et al., 2000). Neben Zytokinrezeptoren, wie dem IL-1R-1 (Giltiay et al., 2005), dem TNFR-1 (Yin et al., 1996) oder dem IL-6R (Akira, 1997) ist eine Vermittlung dieser aktivierenden Stimuli unter anderem auch über TLR4 möglich (Lu et al., 2009). Die Induktion von NF-IL6 impliziert teilweise die Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren, so ist beispielsweise STAT3 durch das sogenannte „tethering“ an der IL-6-vermittelten Induktion von NF-IL6 während der APR in der Leber beteiligt (Niehof et al., 2001). Die Besonderheit liegt hier darin, dass STAT3 nicht an den NF-IL6-Promotor selbst bindet, sondern an andere Proteinkomplexe, die an ein cAMP-responsive element (CRE) des Promotors gebunden vorliegen. An diesen Elementen des NF-IL6-Promotors findet außerdem die Induktionsvermittlung über den Transkriptionsfaktor cAMP-response-element-binding protein (CREB) statt (Niehof et al., 1997). Auch andere STAT-Moleküle können mit Vertretern der C/EBP-Familie, unter anderem NF-IL6 selbst interagieren und ebenfalls an den NF-IL6 Promotor binden (Foka et al., 2001).

3.2.1.2. andere Stimuli

In kortikalen Neuronen der Ratte wurde NF-IL6 als transkriptionaler Modulator identifiziert, der direkt von der neuronalen Aktivität beeinflusst wird (Sun et al., 2007). Verbunden mit dieser Aktivität ist auch eine NF-IL6-Induktion in kortikalen Astrozyten der Maus z.B. über Glutamat, VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) und Noradrenalin möglich (Cardinaux & Magistretti, 1996; Yano et al., 1996). Hypoxische Zustände können neben NF- κ B, CREB und AP-1 unter anderem in Endothelzellen und Cardiomyozyten auch NF-IL6 induzieren (Semenza, 2000; Yan et al., 1995). Außerdem sind gesättigte langkettige Fettsäuren (longchain SFA) in Endothelzellen der Coronararterien potente Induktoren von NF-IL6, was ebenfalls mit der Produktion inflammatorischer Mediatoren in Verbindung gebracht wird (Krogmann et al., 2011; Staiger et al., 2004).

Welche pro-inflammatorische Stimuli in welchem Maße an der Aktivierung von NF-IL6 im Gehirn beteiligt sind, welche Bedeutung den verschiedenen involvierten Signalwegen zukommt und auf welche Weise die NF-IL6-Aktivität in Verbindung mit anderen inflammatorisch bedeutsamen Transkriptionsfaktoren sich auf die Aktivierung von Zellen in regulatorischen Zentren des Gehirns auswirkt, ist bis dato nicht hinreichend bekannt.

3.2.2. Signaltransduktion der NF-IL6-Aktivierung

Posttranskriptionale Modifikationen in Form von Phosphorylierungen als mögliche Regulationsebene der NF-IL6-Aktivität sind an verschiedenen Stellen des Proteins und vermittelt durch unterschiedliche Proteinkinasen bekannt. Unter anderem wurden Phosphorylierungen über MAPK (Nakajima et al., 1993; Zhu et al., 2002), die Proteinkinasen (PK) C (Trautwein et al., 1993) PKG

(Zhao et al., 2005) und PKA (Trautwein et al., 1994) und p90 RSK (ribosomal protein S6 kinase) -1 oder -2 (Buck et al., 1999) nachgewiesen (vgl. Abb. 8)

3.2.2.1. Die JAK/MAP-Kinase-Kaskade

Allgemein werden MAPK-Kaskaden grob nach der Art des auslösenden Stimulus (mitogene Stimuli, z.B. Wachstum, Proliferation, Differenzierung oder Stressesstimuli, z.B. Inflammation) unterschieden (Kolch, 2000; Li et al., 2007). Eine NF-IL6-Phosphorylierung durch die Aktivität von MAP-Kinasen kann beispielsweise am IL-6 Rezeptor bei Ligandenbindung angestoßen werden (Akira, 1997; vgl. Abb. 8). Dabei erfolgt die letztendliche Phosphorylierung von NF-IL6 am Threoninrest Thr-235 über die MAP-Kinasen ERK-1 oder -2 im Zellkern. Diese Phosphorylierung kann beispielsweise das transaktivierende Potential von NF-IL6 steigern (Nakajima et al., 1993; Zhu et al., 2002).

3.2.2.2. Der p90 RSK-Weg

Die Phosphorylierung von NF-IL6 durch p90 RSK ist die einzige, die bisher tatsächlich für endogenen NF-IL6 in Mäusen gezeigt werden konnte (Bradley et al., 2003). Sie findet an Thr-217 (Maus), Ser-105 (Ratte) bzw. Thr-266 (Mensch) statt und führt *in vitro* zu einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors (Buck et al., 1999; Cieslik et al., 2005). Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der Bindung von NF-IL6 an Konsensussequenzen stimulierter Zellen und der p90 RSK-Aktivität nachgewiesen. Diese Kinase kann unter anderem von ERK1/2 über Phosphorylierungen aktiviert werden (Cieslik et al., 2005; Zhao & Siu, 1996). Am IL-6-Rezeptor könnte so möglicherweise eine gemeinsame oder parallele Phosphorylierung von NF-IL6 an Thr-235 über ERK1/2 und an Ser-105 über p90 RSK 1/2 durch die Aktivierung einer MAPK-Kaskade stattfinden (vgl. Abb. 8). Dies ist insbesondere im Hinblick auf die zweite Teilstudie der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung, in der über eine Hemmung der JAK2 die Signalkaskade am IL-6R unterbrochen werden sollte. Eine erfolgreiche Inhibition der Signalkaskade „downstream“ der JAK2 könnte somit durch eine verminderte Phosphorylierung von NF-IL6 sowohl an Thr-235 als auch an Ser-105 nachgewiesen werden.

3.2.2.3. Über PKA, PKC und PKG vermittelte Wege

Die Funktion möglicher Phosphorylierungen von NF-IL6 durch die Proteinkinasen A, C und G ist nicht eindeutig geklärt. Eine typische Phosphorylierungsstelle für PKA, die am Serinrest Ser-105 von NF-IL6 lokalisiert sein könnte (Trautwein et al., 1994), wurde ebenso wie die *in vitro* Phosphorylierung von NF-IL6 durch PKA nachgewiesen (Pelletier et al., 1998). So könnte eine Erhöhung von cAMP und folgende PKA-Aktivierung zur *de novo* Synthese von NF-IL6 führen (Schwaninger et al., 2000) oder aber dessen nukleäre Translokation vermitteln (Metz & Ziff, 1991). Auch mögliche Phosphorylierungsstellen für PKC auf dem NF-IL6-Protein, sowie eine Bindung der Kinase *in vitro* an dieses wurden beschrieben (Trautwein et al., 1993; Trautwein et al., 1994). Nach Stimulation mit Zytokinen soll wiederum eine Phosphorylierung an Ser-105 möglich sein (Trautwein et al., 1993; Trautwein et al., 1994). In Verbindung zu den Wegen aus 3.2.2.1. und 3.2.2.2. ist eine Aktivierung von ERK1/2 oder RSK durch PKC möglich (Cieslik et al., 2005), so dass die Effekte dieser Proteinkinase letztendlich auch auf einem Eingreifen in andere Signalkaskaden basieren könnten. Ein PKG-abhängiger Weg der NF-IL6-Aktivierung wurde von Zhao et al. (2005) beschrieben. Dabei bewirkt die Proteinkinase eine Dephosphorylierung von NF-IL6, was in diesem Modell das Aktivierungspotential von NF-IL6 steigert.

3.2.3. Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen

Unter anderem sind Interaktionen von NF-IL6 mit den Transkriptionsfaktoren STAT3, NF- κ B, CREB, AP-1 (c-Fos und c-Jun) und -2 bekannt. Während die Bildung von Heterodimeren aus NF-IL6 und Fos oder Jun zur Repression der NF-IL6-Aktivität führt (Hsu et al., 1994), kommt dem cAMP-responsiven CREB meist eine synergistische Funktion zu (Wilson & Roesler, 2002). Schon bei der Bildung von Dimeren kann die Interaktion von NF-IL6 mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren Einfluss auf dessen Aktivität haben. So wird die Zugänglichkeit der Aktivierungs- und der bZIP-Domäne von NF-IL6 nach der Bildung verschiedener Heterodimere durch Konformationsänderungen verschieden effektiv erhöht (Williams et al., 1995, vgl. Abb. 9). Das jeweils synergistische oder antagonistische Zusammenwirken der Heterodimere für einzelne Gene ergibt sich vor allem durch deren Promotorstrukturen (Akira et al., 1990; Chang et al., 1990; Descombes et al., 1990; Poli et al., 1990; Williams et al., 1991). An vielen Promotoren von inflammatorischen Genen sind z.B. Aktivierungen sowohl durch NF-IL6 als auch durch NF- κ B bekannt und die entsprechenden Bindungsstellen vorhanden (LeClair et al., 1992), außerdem wurden die Interaktion von NF-IL6 mit der p50 Untereinheit von NF- κ B und die synergistisch induzierende Funktion von NF-IL6 und NF- κ B (p65) am IL-6-Promotor charakterisiert (Matsusaka et al., 1993).

3.2.4. Negative Regulation

3.2.4.1. Negative Regulation mit Trib1

Die Serin/Threonin Kinasen Tribbles 1-3 gelten als Mitglieder der Familie der sog. „scaffold proteins“ als mögliche, zellspezifische Regulatoren von MAP-Kinase Funktionen (Ferrell, 2000; Levchenko et al., 2000; Sung et al., 2006; Williams et al., 1991). Der Name leitet sich vom Protein „tribbles“ in *Drosophila melanogaster* ab, das für die negative Kontrolle von C/EBP β bekannt ist (Groschans & Wieschaus, 2000; Mata et al., 2000; Seher & Leptin, 2000). Das nukleär vorkommende Trib1 ist für seine mögliche Interaktion mit den MAPK-Kinasen MEK1 und MEK4 bekannt, es steigert die Aktivität der in der Signalkaskade „downstream“ davon liegenden ERK1/2 und wird durch inflammatorische Stimuli in verschiedenen Zelltypen, z.T. über die Aktivierung von TLR reguliert (Kiss-Toth et al., 2004; Morrison & Davis, 2003; Yamamoto et al., 2007). IL-1 β oder TNF α können in verschiedenen Zellen (HUVEC, HeLa) zur vermehrten Expression von Trib1 führen (Kiss-Toth et al., 2004; Sung et al., 2006). Die durch inflammatorische Stimuli ausgelöste NF- κ B- und STAT3-Aktivität wird von Trib1 nicht beeinflusst (Kiss-Toth et al., 2004; Williams et al., 1991), während eine Regulation von NF-IL6 eindeutig gezeigt werden konnte: So führt Trib1-Defizienz zu einer erhöhten Bindungsaktivität von NF-IL6 und Trib1-Überexpression kann NF-IL6-Mengen und die Induktion möglicher Zielgene nach LPS-Stimulation deutlich reduzieren (Yamamoto et al., 2007). Die Einflüsse einer Trib1-Überexpression gleichen denen, die durch NF-IL6-Defizienz verursacht werden. In Hefezellen konnte Trib1 außerdem als Bindungspartner von NF-IL6 identifiziert werden, der bei Koexpression beider Proteine die DNA-Bindungsaktivität von NF-IL6 vermindert (Yamamoto et al., 2007).

3.2.4.2. Negative Regulation mit LIP

Die verkürzte Isoform von NF-IL6, LIP, wird als Antagonist der NF-IL6-vermittelten Transkription angesehen. Dies ergibt sich zum Einen aus der Bildung dominant-negativer Heterodimere mit den längeren, aktivierenden Isoformen LAP* und LAP und zum Anderen durch Konkurrenz von LIP- und LAP-Homodimeren um die verfügbaren DNA-Bindungsstellen (Ossipow et al., 1993). Eine Beeinflussung der Transkriptionsaktivierung durch das Verhältnis von LAP zu LIP wurde von

Descombes (1991) festgestellt. Überexpression von LIP inhibiert außerdem die Expression von iNOS als möglichem Zielgen von NF-IL6 in murinen Mikrogliazellen (Jana et al., 2001) und die Zytokin-induzierte Aktivierung des iNOS-Promotors in Astrozyten (Pahan et al., 2002). Einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des negativen Inhibitors LIP über IFN β kommt möglicherweise eine wichtige Rolle für die Replikation von Immundefizienzviren zu, welche im Fall des SIV (Simian Immunodeficiency Virus) auf diese Weise unterdrückt werden kann (Barber et al., 2006; Dudaronek et al., 2007; Honda et al., 1998; Weiden et al., 2000). Auf dem gleichen Regulationsmechanismus basierend wurde andererseits die Hemmung der Tumorrepression in Brustkrebszellen (über TGF β) durch LIP beschrieben (Arnal-Estape et al., 2010).

Gegen die rein antagonistische Funktion von LIP sprechen Untersuchungen am IL-6 Promotor von Lymphoblasten, wo nach LPS-Stimulation eine aktivierende Wirkung stark verkürzter NF-IL6-Isoformen, unter anderem LIP, gezeigt werden konnte, die über die bZIP-Domäne vermittelt wird, so dass das Fehlen der Transaktivierungsdomäne von LIP keine hemmenden Auswirkungen mit sich brachte. Dem Mechanismus scheint eine regulierende Funktion von bZIP-Domänen auf NF- κ B-Funktionen zugrunde zu liegen (Hu et al., 2000).

3.3. Bedeutung, Funktionen und Zielgene von NF-IL6

Generell spielt NF-IL6 eine Rolle für den Metabolismus, für Zellproliferation und -differenzierung, und bei Entzündungsreaktionen, wobei die jeweiligen Funktionen des Transkriptionsfaktors sehr zell- und organspezifisch ausfallen (Ramji & Foka, 2002).

Die Rolle, die NF-IL6 für den Metabolismus spielt, lässt sich anhand verschiedener Defizite bei "knock-out" Mäusen zeigen: Die Tiere zeigen Störungen in der Glykogenolyse und im Lipid- und Glucosestoffwechsel (Croniger et al., 2001; S. Liu et al., 1999). Neben der Leber kommt NF-IL6 am häufigsten im braunen und weißen Fettgewebe vor (Akira et al., 1990; Descombes et al., 1990; Poli et al., 1990). Für den Fettstoffwechsel und Wärmehaushalt kommt NF-IL6 als transkriptionaler Regulator des UCP1-Gens (uncoupling protein 1), welches als Schlüsselfaktor für Thermogenese durch braunes Fettgewebe (BAT) gilt, eine wichtige Bedeutung zu (Carmona et al., 2005). Außerdem sind defiziente Tiere kälteintolerant, was mit einer fehlenden Fettakkumulation zusammenhängt (Carmona et al., 2005; Tanaka et al., 1997). Im Rahmen endokriner Regulationsmechanismen wurde eine transkriptionsfördernde Wirkung von NF-IL6 am humanen CRH (corticotropin-releasing hormone)-Promotor nachgewiesen (Stephanou et al., 1997). Des Weiteren ist NF-IL6 für die ovarielle Entwicklung von Bedeutung, so dass defiziente weibliche Mäuse steril sind (Screpanti et al., 1995; Tanaka et al., 1995). Eine Rolle von NF-IL6 für die Replikation von HI-Viren (Jones et al., 1986; Nabel & Baltimore, 1987; Ruocco et al., 1996) und Sensibilisierung von CD4⁺-Zellen des Wirtes (Kinoshita & Taguchi, 2008) wird diskutiert. Auch für sogenannten ER-Stress, Störungen im Faltungsprozess der Proteine im Endoplasmatischen Reticulum (Harding et al., 2002; Kaufman, 2002; Patil & Walter, 2001), und oxidativen Zellstress (Kelicen & Tindberg, 2004) scheint NF-IL6 ein wichtiger Faktor zu sein.

3.3.1. Bedeutung für die Zelldifferenzierung und -proliferation

Neben Adipozyten, Hepatozyten, Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt und in der Mamma (Zusammenfassung: Akira, 1997; Ramji & Foka, 2002) spielt NF-IL6 für die Differenzierung von Myelozyten, vor allem von Makrophagen, eine Rolle (Natsuka et al., 1992). Auch bei der Reifung von Vorläuferzellen zu Neuronen unter Einfluss des neuronal growth factors (NGF) ist NF-IL6 offensichtlich beteiligt, ebenso wie an der neuronalen Reifung im Gehirn neonataler Ratten (Cortes-

Canteli et al., 2002). Am Promotor des unter anderem an Wachstum und Entwicklung neuronaler Zellen beteiligten Transkriptionsfaktors c-Fos wurde eine direkte Kooperation zwischen NF-IL6 und CREB nachgewiesen (Chen et al., 2003; Metz & Ziff, 1991). Es gibt aber auch Hinweise auf eine unter anderem NF-IL6-bedingte Förderung der Apoptose von Neuronen (Cortes-Canteli et al., 2002).

Im Allgemeinen wird NF-IL6 eine proliferationsfördernde Rolle zugesprochen. So ist der Transkriptionsfaktor in zahlreichen Tumoren vermehrt exprimiert (Buck et al., 1999; Buck et al., 2001; Greenbaum et al., 1998; Zhu et al., 2002) und z.T. wurde eine Förderung der Tumorgenese nachgewiesen (Zhu et al., 2002; Carro et al., 2010). Im humanen malignen Gliom führt die kombinierte Expression von NF-IL6 und STAT3 zur Umwandlung neuronaler Stammzellen zum mesenchymalen Phänotyp, was als Malignitätszeichen gilt (Carro et al., 2010). Es gibt aber auch Hinweise auf tumorsupprimierende Eigenschaften von NF-IL6 (promyeloische Leukämie, Duprez et al., 2003).

3.3.2. Bedeutungen im Gehirn

Für die Formung des Langzeitgedächtnisses bzw. die „long-term memory consolidation“ genannte Festigung neuer Erinnerungen im Hippocampus wird NF-IL6 inzwischen ebenfalls eine zentrale Bedeutung zugeschrieben, vor allem in der sog. transkriptionsabhängigen Phase, in der neue Proteine synthetisiert werden (Taubenfeld et al., 2001; Yukawa et al., 1998). Die konstitutive, starke Expression von NF-IL6 im Hippocampus wurde bereits früh nachgewiesen (Kuo et al., 1990).

Eine mögliche Rolle von NF-IL6 für Entwicklung und Verlauf von Hirntraumata und -schädigungen wird kontrovers diskutiert. So wurde NF-IL6 ein fördernder Einfluss auf die Entstehung von Hirnschäden im Rahmen postischämischer Entzündungsreaktionen zugeschrieben (Kapadia et al., 2006). Haltermann et al. zählen NF-IL6 hingegen zu den neuroprotektiven Faktoren, da ein Rückgang der NF-IL6-Aktivität die Apoptose von Neuronen nach Hypoxie verstärkte (Haltermann et al., 2008). Nach Verletzungen *in vitro* (Cortes-Canteli et al., 2004) und *in vivo* (axonal; Nadeau et al., 2005) kann NF-IL6 in Neuronen auf Protein- bzw. mRNA-Ebene induziert sein, und auch excitotoxische Hirnschädigungen durch Glutamat oder Kaininsäure (KA) bedingen eine erhöhte NF-IL6-Expression *in vivo* (Cortes-Canteli et al., 2008). Diese NF-IL6-Induktion wurde zum Einen mit inflammatorischen Effekten, wie der Induktion von COX2, in Zusammenhang gebracht (Cortes-Canteli et al., 2004). Zum Anderen überwogen wiederum neuroprotektive Einflüsse von NF-IL6, die sich durch eine Verminderung der Expression inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β und COX2 (Cortes-Canteli et al., 2008; Oprica et al., 2003), sowie verringerte Zellverluste und gesteigerte neuronale Regeneration (Nadeau et al., 2005) darstellten. Außerdem gibt es Anhaltspunkte für eine Regulation des proteolytischen Enzyms TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)-1 durch NF-IL6. TIMP-1 wird nach axonalen Verletzungen von Astrozyten ausgeschüttet und zeigt sich beispielsweise bei neuroinflammatorischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer erhöht (Fields et al., 2011).

3.3.3. Bedeutung für Inflammationen

Die Expression von NF-IL6 ist in verschiedenen Zelltypen (u.a. Hepatozyten, Makrophagen, Astroglia) durch inflammatorische Stimuli induzierbar (Akira et al., 1990; Alam et al., 1992; Cardinaux et al., 2000; Poli et al., 1990; Ramji et al., 1993; Tengku-Muhammad et al., 2000). NF-IL6-defiziente Mäuse zeigen unter anderem eine verminderte Expression von verschiedenen Akute-Phase Prote-

inen in der Leber und TNF α sowie eine verminderte bakterizide Aktivität der Makrophagen und gestörte T-Helfer-Funktionen (Poli, 1998; Screpanti et al., 1995; Tanaka et al., 1995). NF-IL6 wird auch eine Bedeutung für chronische Entzündungsprozesse beigemessen (Pope et al., 1999). In Neutrophilen Granulozyten ist NF-IL6 an der Induktion der Zytokin- und Chemokinproduktion beteiligt (Cloutier et al., 2007; Cloutier et al., 2009; McDonald et al., 1997), unter anderem gilt dies für IL-8, MIP (macrophage inflammatory protein) -1 α und MIP-1 β (Cloutier et al., 2009). Für den vielfach beschriebenen Synergismus zwischen IL-6 und Interferonen, bei dem ein „priming“ durch IL-6 die Reaktion auf Interferone verstärkt, ist NF-IL6 ebenfalls von Bedeutung (Bluyssen et al., 1996; Li et al., 2007; Weihua et al., 2000).

3.3.3.1. Regulation von Zytokinen

Als wichtige, möglicherweise unter Beteiligung von NF-IL6 regulierte Gene, kommen zahlreiche Vertreter der Zytokinfamilie in Frage. Die Regulation von IL-1 β über NF-IL6 nach Stimulation mit LPS oder TNF α wurde unter anderem von Zhang & Rom (1993) beschrieben, nachdem die Existenz einer NF-IL6-Bindungsstelle auf dem IL-1 β -Promotor bestätigt worden war (Nishizawa & Nagata, 1990). In Neutrophilen Granulozyten von NF-IL6-defizienten Mäusen ist die Expression sowohl von IL-6 als auch von IL-10 und IL-12 nach LPS-Stimulation stark vermindert (Akagi et al., 2008). Primäre gliale Zellkulturen dieser Tiere zeigen nach Stimulation unter anderem mit LPS eine verminderte IL-1 β -Expression (Cortes-Canteli et al., 2008). Für den TNF α - sowie den IL-8-Promotor wurde ein Zusammenwirken von NF-IL6 mit NF- κ B postuliert (Cloutier et al., 2009; Matsusaka et al., 1993; Pope et al., 1994; Stein & Baldwin). Die entsprechenden NF-IL6-Konsensussequenzen wurden von Pope et al. (1994) bzw. Mukaida et al. (1990) charakterisiert.

3.3.3.2. Regulation anderer inflammatorischer Mediatoren

Es gibt mögliche Bindungsstellen für NF-IL6 und NF- κ B auf dem COX2-Promotor (Kosaka et al., 1994). Je nach Zelltyp kann die Bedeutung von NF-IL6 für die COX2-Induktion verschieden sein. So zeigten Gorgoni et al. (2001) eine essentielle Bedeutung der NF-IL6-Expression für die COX2-mRNA-Induktion mit LPS oder IFN γ in Makrophagen, in denen bei vorliegender NF-IL6-Defizienz die COX2-Produktion vermindert war (Chen et al., 2003; Uematsu et al., 2002). Primäre gliale Zellkulturen defizienter Tiere zeigten nach LPS-Stimulation ebenfalls eine verminderte Expression von COX2 (Cortes-Canteli et al., 2008), während NF-IL6-defiziente Fibroblasten keine Beeinträchtigungen der COX2-Promotoraktivität aufwiesen (Gorgoni et al., 2001).

NF-IL6 ist außerdem essentiell für die LPS-induzierte mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES)-Induktion und damit die PGE₂-Produktion (vgl. Kap. 2.4.5.), die in einer Studie von Uematsu et al. (2002) in peritonealen Makrophagen von NF-IL6-defizienten Mäusen jeweils stark reduziert waren. Daher wurde für die Induktion der PGE₂-Produktion ein TLR4-MyD88-NF-IL6-abhängiger Weg vermutet. Es wurde darüber hinaus eine NF-IL6-Konsensussequenz auf dem iNOS-Promotor identifiziert (Löwenstein et al., 1993). Folgerichtig konnte die Induktion von iNOS durch die Hemmung der NF-IL6-Aktivierung verringert werden (Pahan et al., 2002). Außerdem finden sich Bindungsstellen für NF-IL6 in regulatorischen Regionen von weiteren Genen wie Lysozym (Goethe & Loc, 1994), MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1; Bretz et al., 1994) und MIP-1 α und - β (Cloutier et al., 2009). Eine Regulation des Adhäsionsmoleküls ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), das mit der Anheftung von Neutrophilen Granulozyten an Gefäßwände und deren Auswanderung aus dem Blutkreislauf assoziiert ist, durch NF-IL6 ist naheliegend. NF-IL6-defiziente Mäuse zeigen nach inflammatorischen Stimuli eine erniedrigte Expression, sowie eine geringere Anzahl ausgewanderter Neutrophiler Granulozyten in das betroffene Gebiet (Kapadia et al.,

2006). Verminderte Induktion von TLR1, SOCS3 und IL-1ra in NF-IL6-defizienten Tieren weisen auf deren Induzierbarkeit durch NF-IL6 zusätzlich zu den bereits genannten Zielgenen hin.

Eine weitere Möglichkeit für NF-IL6, Einfluss auf Entzündungsreaktionen zu nehmen, stellt eine Regulation der NF- κ B-Aktivität dar. So kann NF-IL6 die Menge an I κ B α in Makrophagen senken und somit die TNF α - oder LPS-bedingte Aktivierung von NF- κ B verstärken (Cappello et al., 2009; vgl. Abb. 5, 6). Dieser Regulationsmechanismus ist unabhängig von einer NF-IL6-Bindung an Zielgenpromotoren.

Obwohl die Erstbeschreibung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 schon über 20 Jahre zurückliegt (Akira et al., 1990; Landschulz et al., 1988), und er mit der Regulation vor allem peripherer inflammatorischer Signale in Verbindung gebracht wurde (Poli, 1998; Screpanti et al., 1995; Tanaka et al., 1995), ist über eine entsprechende Aktivierung im Gehirn neuroanatomisch und funktional, z.B. in Bezug auf inflammatorische Zielgene, wenig bekannt. Auch die Beteiligung von NF-IL6 an der Induktion zentralnervös induzierter Krankheitssymptome ist bisher kaum untersucht worden. Poli et al. schrieben dem Transkriptionsfaktor allerdings eine Rolle für die späte Phase der APR zu, was eine Rolle von NF-IL6 für die Aufrechterhaltung der Symptome nahelegte (Poli et al., 1998).

Die Charakterisierung und funktionale Einordnung von Aktivierungsmarkern, wie Transkriptionsfaktoren, die im Verlauf systemischer Inflammationen z.B. durch Zytokine im Gehirn aktiviert werden, ist ein wichtiger Aspekt für das Verständnis von Kommunikationswegen zwischen Peripherie und Gehirn, die eine zentralnervöse Kontrolle der resultierenden Symptome ermöglichen (Nadjar et al., 2005; Rummel et al., 2006; Tanabe & Tohnai, 2002). Derartige Symptome spielen nicht nur im Verlauf systemischer Infektionen, sondern auch für andere schwerwiegende Krankheitsbilder wie der Zytokin-vermittelten Auszehrung im Verlauf von AIDS-Erkrankungen (Chang et al., 1998; Macallan, 1999), der sog. Tumorkachexie (Tisdale, 1999) oder der Entwicklung von Depressionen (Dantzer et al., 1999) eine Rolle. Die Feinabstimmung zwischen verschiedenen Mediatoren im Gehirn und den von ihnen genutzten Kommunikationswegen, sowie deren Bedeutung für verschiedene Krankheitsbilder ist nach wie vor nicht hinreichend bekannt.

4. Zielsetzung der Arbeit

Eine mögliche Beteiligung von NF-IL6 an der Übermittlung von Signalen ins Gehirn, ihrer Weiterleitung und der Ausprägung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome, ist im Hinblick auf ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bedeutsam. Auch könnten potentielle Funktionen von NF-IL6, z.B. während der späten Phase inflammatorischer Reaktionen, Grundlagen für die Erarbeitung neuer therapeutischer Konzepte bieten (Zytokin-vermittelte, schwerwiegende Krankheitsbilder im Verlauf von AIDS, Tumorerkrankungen oder Depressionen, siehe S. 46). Die möglichst zielgerichtete und damit relativ schonende Inhibition von Signalwegen, die über IL-6 aktiviert werden, ist darüber hinaus auch für chronische Krankheitszustände von Bedeutung: In gealterten Individuen sind IL-6-Konzentrationen grundsätzlich erhöht (Bruunsgaard & Pedersen, 2003; Kim et al., 2011; Stowe et al., 2010), und werden mit verbreiteten Altersleiden wie Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht (Iida et al., 1992). Auch Adipositas geht mit erhöhten Konzentrationen an IL-6 einher (Eder et al., 2009), so dass gerade dieses Zytokin und die von ihm aktivierten Mechanismen von besonderem Interesse sind. Insbesondere STAT3 und NF-IL6 stellen außerdem, aufgrund ihrer noch nicht vollständig geklärten Rollen für die Entstehung und Regeneration traumatischer Hirnläsionen, wichtige mögliche Angriffsflächen entsprechender Therapien dar. Dies legt beispielsweise eine Studie von Zhao et al. (2011) nahe, in der die JAK2-STAT3 Aktivierung als wichtige Komponente der Neuroregeneration beschrieben wird. Eine detaillierte Aufdeckung von NF-IL6-Funktionen ist auch aufgrund seiner möglichen Bedeutung im Rahmen von HIV-Infektionen wünschenswert. So ist neben der Bedeutung der verkürzten NF-IL6-Form LIP im Modell des SIV (Simian Immunodeficiency Virus; vgl. S. 44) ein Synergismus von NF-IL6 und NF- κ B in der Replikation der Virus-RNA festgestellt worden (Jones et al., 1986; Nabel & Baltimore, 1987; Ruocco et al., 1996). Außerdem konnte NF-IL6 durch Hemmung der Transkription eines epigenetisch wirksamen, antiviralen Enzyms zur Sensibilisierung von CD4+ Zellen des Wirtes führen (Kinoshita & Taguchi, 2008). Hinweise auf eine Rolle von NF-IL6 für den Verlauf tumoröser Erkrankungen (vgl. Kap. 3.2.4.2., 3.3.1.; S. 44) unterstreichen zusätzlich die Wichtigkeit einer möglichst weitreichenden Charakterisierung dieses Transkriptionsfaktors vor allem auf funktionaler Ebene.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle des Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der Abfolge von Vorgängen und Signalkaskaden geleistet werden, die letztendlich an der Ausbildung von Fieber und den verschiedenen Komponenten des „sickness-behavior“ beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden drei eng in Zusammenhang stehende Teilstudien durchgeführt:

4.1. Charakterisierung der NF-IL6 Aktivität im Verlauf zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome

Der erste Teil der Studie basierte auf der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome durch systemische Verabreichung des exogenen Pyrogens LPS. Das Ziel dieser ersten Teilstudie umfasste folgende Punkte:

- Darstellung der Aktivität von NF-IL6 im zeitlichen Verlauf LPS-induzierter, zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome durch Analyse der Ausprägung der NF-IL6-Immunreaktivität in Abhängigkeit von der LPS-Dosis und der vergangenen Zeit seit der Injektion. Analog zu entsprechenden Studien für die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF- κ B sollten dadurch neue

Erkenntnisse über die Aktivierung funktionell bedeutsamer Gehirnregionen im Verlauf der systemischen Entzündungsreaktion gewonnen werden.

- Bewertung der Bedeutung einer *de novo* Synthese des Transkriptionsfaktors im Gehirn nach LPS-Stimulation *in vivo* im Verhältnis zur alleinigen Aktivierung vorhandener NF-IL6.
- Charakterisierung und Quantifizierung der vorkommenden NF-IL6-Isoformen nach LPS-Stimulation *in vivo*, vor allem im Hinblick auf das Vorkommen der aktivierenden (LAP) im Verhältnis zur hemmenden Form (LIP).
- Darstellung möglicher funktioneller Parallelen zwischen NF-IL6-Aktivität und der Bioaktivität inflammatorisch bedeutsamer Zytokine im Blutplasma.
- Darstellung möglicher funktioneller Parallelen zwischen NF-IL6-Aktivität und der Stärke der Ausprägung von typischen Krankheitssymptomen, sowie ihrer zeitlichen Abfolge (zu diesem Zweck wurden einige dieser Symptome wie Fieber, Anorexie, Adipsie und Lethargie parallel analysiert).
- Analyse der möglichen Bedeutung von NF-IL6 für ausgewählte potentielle Zielgene im Gehirn anhand der Darstellung von Korrelationen zwischen Expressionsmustern dieser Gene und der NF-IL6-Akkumulation in relevanten Gehirnstrukturen. Der Schwerpunkt lag dabei auf potentiellen Zielgenen, deren Produkte entscheidende Funktionen für die Entstehung der genannten Krankheitssymptome erfüllen.

4.2. Bedeutung JAK2-vermittelter Signalwege

Im zweiten Schritt sollte einer der möglichen Aktivierungswege (vgl. Kap. 3.2.2) und seine Bedeutung für die Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome näher beleuchtet werden. In früheren Untersuchungen war vor allem eine durch das endogene Pyrogen IL-6 ausgelöste Aktivierung von Zellen im Gehirn beobachtet worden, welche über JAK2 zur Phosphorylierung und Aktivierung sowohl von NF-IL6 als auch von STAT3 führt (Kap.2.5.2.4.). Daher sollte dieser JAK2-vermittelte Signalweg inhibiert werden. Dies erfolgte durch intracerebroventrikuläre Vorbehandlung von Tieren mit dem JAK2-Inhibitor AG490 im Vorfeld einer analog zur ersten Teilstudie durchgeführten LPS-Stimulation. Mit dieser Teilstudie sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Aufzeigen der Bedeutung der JAK2-vermittelten NF-IL6- und STAT3-Aktivierung für den Verlauf des Krankheitsgeschehens. Dazu wurden wiederum die in Teilstudie 4.1. genannten Symptome als Endpunktparameter aufgezeichnet.
- Darstellung möglicher Einflüsse der Aktivierungshemmung auf das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren (NF-IL6, STAT3, NF- κ B) anhand der Expression dieser Transkriptionsfaktoren im Gehirn.
- Identifikation der für den möglicherweise veränderten Krankheitsverlauf verantwortlichen Faktoren im Gehirn auf molekularer Ebene durch Analyse der potentiell veränderten Zielgenexpression (Zielgene analog 4.1.).
- Untersuchung möglicher systemischer Auswirkungen der zentralen Hemmung durch Bestimmung der Aktivität inflammatorisch bedeutsamer Zytokine im Blutplasma.

4.3. Spezifische Bedeutung von NF-IL6 und NF-IL6-Synthese

Abschließend sollte die Rolle von NF-IL6 für die Entstehung der LPS-induzierten Krankheitssymptome isoliert untersucht werden. Dazu diene im dritten Teil der Studie die möglichst weitgehende Ausschaltung der NF-IL6-Expression im Gehirn durch intracerebroventrikuläre Verabreichung einer entsprechenden siRNA. Zur Bestätigung einer erfolgten Herunterregulierung der NF-IL6-Transkription wurden potentiell veränderte Expressionsmuster von NF-IL6 im Gehirn herangezogen. Folgenden Fragestellungen sollte dabei nachgegangen werden:

- Aufzeigen möglicher Einflüsse von NF-IL6 auf den Verlauf des Krankheitsgeschehens. Dazu wurden wiederum die in Teilstudie 4.1. genannten Symptome als Endpunktparameter aufgezeichnet.
- Analyse der Bedeutung von NF-IL6 und dessen Expressionssteigerung für die Induktion inflammatorisch bedeutsamer Zielgene (analog 4.1.) im Zusammenhang mit dem möglicherweise veränderten Krankheitsverlauf.

Insgesamt sollten die Analysen im Rahmen dieser drei Teilstudien Zusammenhänge zwischen physiologischen Endpunktparametern, inflammatorischen Mediatoren und den von ihnen als Übermittler genutzten Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF-IL6 aufzeigen. Damit sollten neue Erkenntnisse auch zum therapeutischen Potential bekannter Strategien der Inhibition inflammatorischer Transkriptionsfaktoren gewonnen werden.

5. Studienaufbau

5.1. LPS-induzierte Entzündungsreaktionen

Das experimentelle Auslösen von Fieber und anderen zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen durch die Applikation eines exogenen Pyrogens (z.B. bestimmter Anteile von Mikroorganismen) bietet eine gute Möglichkeit, zugrundeliegende Mechanismen zu analysieren. Das am häufigsten verwendete hitzestabile Molekül LPS setzt sich aus einem Polysaccharidanteil, welcher die Antigenität vermittelt, und einem Lipid-A-Anteil zusammen, wobei letzterer das evolutiv hoch konservierte PAMP gram-negativer Bakterien darstellt (Holst et al., 1996; Rietschel et al., 1991). Systemisch appliziert, löst LPS in Abhängigkeit von der Dosis und der Umgebungstemperatur in Säugern eine generalisierte, inflammatorische Reaktion mit einem stereotypischen, dosisabhängig mehrphasigen und reproduzierbaren Fieber aus (Kluger, 1991). So bewirkt die intraperitoneale Injektion einer moderaten Dosis von 100 µg/kg KM LPS in Ratten bei ca. 24°C Raumtemperatur ein mehrphasiges Fieber von mindestens 6 - 8 Stunden Dauer. Entsprechend behandelte Tiere zeigen typisches „sickness-behavior“ (Dantzer et al., 2001; Kent et al., 1992a). Erst ab einer Dosis von 5 mg/kg KM ist bei Ratten mit einer LPS-induzierten Reaktion zu rechnen, die einem septischen Schock gleicht (Cartmell et al., 2002; Romanovsky & Szekely, 1998; Roth et al., 2006; Rudaya et al., 2005; Rummel et al., 2004). Dieses etablierte Modell diente unter Verwendung von hochaufgereinigtem, aus *E. coli* gewonnenem LPS in moderater Dosierung in der vorliegenden Arbeit als Grundlage für die Charakterisierung von NF-IL6 im Rahmen zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome im Zeitrahmen von 2 - 24 Stunden.

5.2. Einflüsse des JAK-Inhibitors AG490 auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen

Um die mögliche Aktivierung von NF-IL6 über die Tyrosinkinase JAK2 zu unterdrücken, kam der potentielle JAK2-Inhibitor AG490 (N-Benzyl-3,4-dihydroxybenzylidenecyanoacetamide, auch Tyrphostin B42) zum Einsatz. Die Gruppe der Tyrphostine, zu denen AG490 zählt, bewirkt durch eine Bindung an der Substratbindungsstelle von Tyrosinkinasen eine Funktionshemmung der Enzyme durch kompetitiven Antagonismus (Ruetten & Thiernemann, 1997; siehe Abb. 10). AG490 ist zellpermeabel und kann das Wachstum von Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), die eine starke JAK2-Expression aufweisen, deutlich hemmen und deren Apoptose induzieren (Datenblatt der Herstellerfirma). In verschiedenen Modellen wurde AG490 bereits zur Hemmung der JAK2 und über sie vermittelter Effekte verwendet: So zeigte sich im Modell des septischen Schocks durch Verabreichung sehr hoher LPS-Dosen (10 mg/kg KM) in Ratten unter anderem eine Senkung der TNF α -Konzentration im Serum, sowie eine Hemmung der Induktion von COX2 in der Lunge durch intravenöse Vorbehandlung mit AG490 (Ruetten & Thiernemann, 1997). Satriotomo et al. nutzten die intracerebroventrikuläre Applikation des Tyrphostins zur Eindämmung von Hirninfarkten nach Ischämie, wobei sie die Inhibition der Phosphorylierung von JAK2 und STAT3 im Zuge der post-ischämischen Inflammation direkt demonstrieren konnten. Neuronale Schädigungen infolge dieser Reaktion, die vor allem durch STAT3-Aktivierung über IL-6 und folgende Induktion von TNF α und IL-1 β vermittelt werden, konnten reduziert werden (Satriotomo et al., 2006). Eine Inhibition von LPS-induziertem Fieber wurde z.B. durch Applikation von Tyrphostin 46 erreicht, das intracerebroventrikulär vor der LPS-Stimulation verabreicht worden war (Tsushima & Mori, 2001). Auch Lin & Lin beobachteten einen antipyretischen Effekt von Tyrosinkinase-Inhibitoren (Genistein oder Lavendustin), die sie vor entsprechender Stimulation mit LPS

direkt ins OVLT injiziert hatten (Lin & Lin, 2000). In diesen verschiedenen Studien wurden die Tyrosinkinase-Inhibitoren je nach Applikationsmethode in Konzentrationen von 3 µg/Tier (Tsushima & Mori, 2001; entspricht in dieser Studie 8,6 - 10,7 µg/kg KM) bzw. 5 mg/kg KM (Ruetten & Thiernemann, 1997) eingesetzt und 2 Stunden bis zeitgleich mit der LPS-Stimulation verabreicht. Satriotomo et al. nutzten für das Ischämie-Modell eine kontinuierliche Gabe mittels osmotischer Pumpen. Für die vorliegende Arbeit wurde basierend auf den vorgenannten Ergebnissen (Ruetten & Thiernemann, 1997; Satriotomo et al., 2006; Tsushima & Mori, 2001) eine Konzentration von 3 µg/Tier gewählt (entspricht 10 – 12 µg/kg KM), die 60 Minuten vor der intraperitonealen Stimulation mit LPS in die Lateralventrikel appliziert werden sollten.

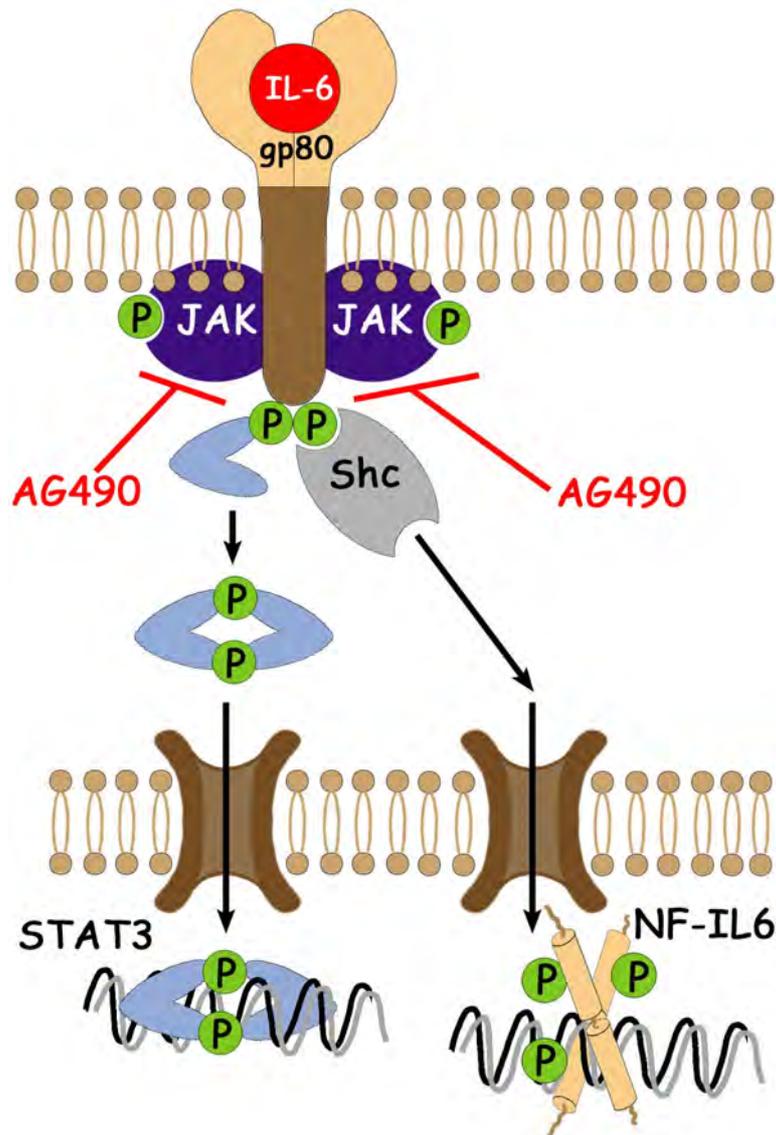


Abb. 10: Schematisch Darstellung der Hemmung der Signaltransduktion am IL-6 Rezeptor durch den JAK2-Inhibitor AG490

Das Tyrphostin AG490 wirkt als kompetitiver Antagonist an der Substratbindungsstelle der JAK2. Damit kann am IL-6R die über diese Tyrosinkinase vermittelte Aktivierung von NF-IL6 und STAT3 gehemmt werden (vgl. Abb. 7, 8).

Aufgrund möglicher Eigenwirkungen des vom Hersteller empfohlenen Lösungsmittels für AG490, DMSO (Dimethylsulfoxid) wie beispielsweise der verstärkten lokomotorischen Aktivität oral oder zentral behandelte Tiere (Colucci et al., 2008) oder dem vermehrten Auswandern polymorphker-

niger Granulozyten (Papadimitriou et al., 1967), wurde stattdessen Cremophor®EL (Polyoxyethylenglyceroltriricinoleat 35, DAC) als Lösungsmittel (25% in PBS) verwendet. Als nicht-ionogenes Lösungsmittel und Emulgator ist Cremophor®EL sowohl in Wasser als auch in zahlreichen organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Isopropanol, Chloroform etc. löslich. In wässriger Lösung mit bis zu 30% Cremophor®EL sind laut Hersteller lokale Irritationen nicht zu erwarten, orale oder intravenöse Verabreichung bewirkten bisher bis zu einer Menge von 10 bzw. 4 ml/kg KM keine toxischen Reaktionen (Datenblatt des Herstellers), so dass für die geplante Verwendung inflammatorische Reaktionen aufgrund des Lösungsmittels als unwahrscheinlich betrachtet werden konnten. Zudem dienten entsprechende Kontrollgruppen, denen nur das Lösungsmittel verabreicht wurde, zur Überprüfung möglicher Eigeneffekte des Reagenz (siehe auch Abb. 15, S. 68).

5.3. Einflüsse gegen NF-IL6 gerichteter siRNA auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen

Um NF-IL6 gezielt und isoliert ausschalten zu können, wurde eine sequenzspezifische siRNA verwendet, um die Expression des Transkriptionsfaktors zu unterdrücken. Der entwicklungs- geschichtlich hoch konservierte Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) als Element des „posttranscriptional gene silencing“ (PTGS) beschreibt die sequenzspezifische Inhibition der Genexpression durch doppelsträngige (ds) RNA (Kurreck, 2009). Der Vorgang wurde für Eukaryoten erstmals im Nematoden *Caenorhabditis elegans* von Fire und Mello (Fire et al., 1998) beschrieben, die durch Einschleusung einer dsRNA eine starke Verringerung endogener mRNA-Transkripte des homologen Gens erreichen konnten. Dafür wurde eine spezielle Art von RNA, erstmals als „small- oder short interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet, verantwortlich gemacht.

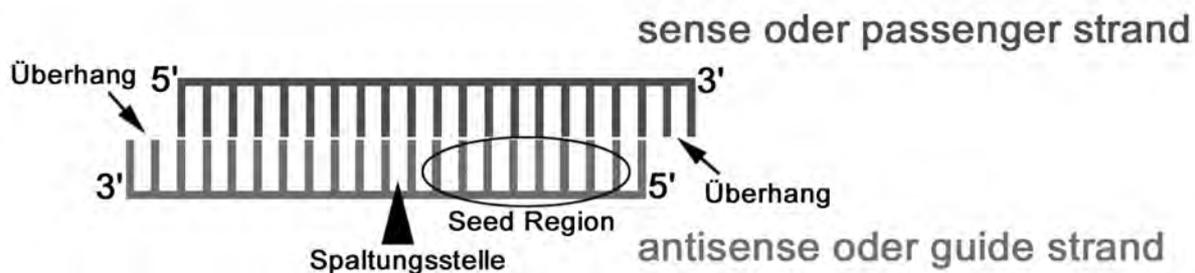


Abb. 11: Schematische Struktur einer siRNA

Nach der Prozessierung z.B. künstlich synthetisierter dsRNA entsteht die 21-25 nt lange siRNA, welche eine Monophosphatgruppe am 5'- und einen Dinukleotid-Überhang am 3' Ende besitzt (MacRae & Doudna, 2007). Die Nukleotide 2 - 8 („seed“ Region) des zur Zielsequenz komplementären „guide strand“ sind von besonderer Bedeutung für die Erkennung dieser Sequenz. (Modifiziert nach Kurreck, 2009)

Der zugrundeliegende Mechanismus kann in drei Schritte unterteilt werden (Siomi & Siomi, 2009; Abb. 12): (1) Prozessierung langer dsRNA in ca. 21 - 25 nt Fragmente durch die Endonuklease Dicer (Bernstein et al., 2001). (2) Ladung eines Einzelstrangs in den Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex). (3) Detektion und Spaltung der Ziel-mRNA im Transkriptom durch endogene Nukleaseaktivität des Argonaut-Proteins als Teil des RISC (Hutvagner & Simard, 2008; Jinek & Doudna, 2009; Song et al., 2004). Nach der Spaltung wird die Ziel mRNA von RNasen degradiert und das korrespondierende Protein kann nicht synthetisiert werden (Kurreck, 2009). In Zellkultursystemen oder im *in vivo* Modell kann, ohne die Halbwertszeit und „turnover-Rate“ des

auszuschaltenden Proteins zu berücksichtigen, im Allgemeinen nach 48 h mit einem „knockdown“ des Proteins gerechnet werden, die durchschnittliche Wirkdauer von siRNA beträgt, abhängig von Zielgen, Zielorgan und Spezies (Akhtar & Benter, 2007b) 5 - 7 Tage (Akhtar & Benter, 2007b; Christoph et al., 2006; Kurreck, 2009). Im Gegensatz zum „knockout Modell“ kann ein kompletter „knockdown“ des Proteins durch RNAi niemals erreicht werden.

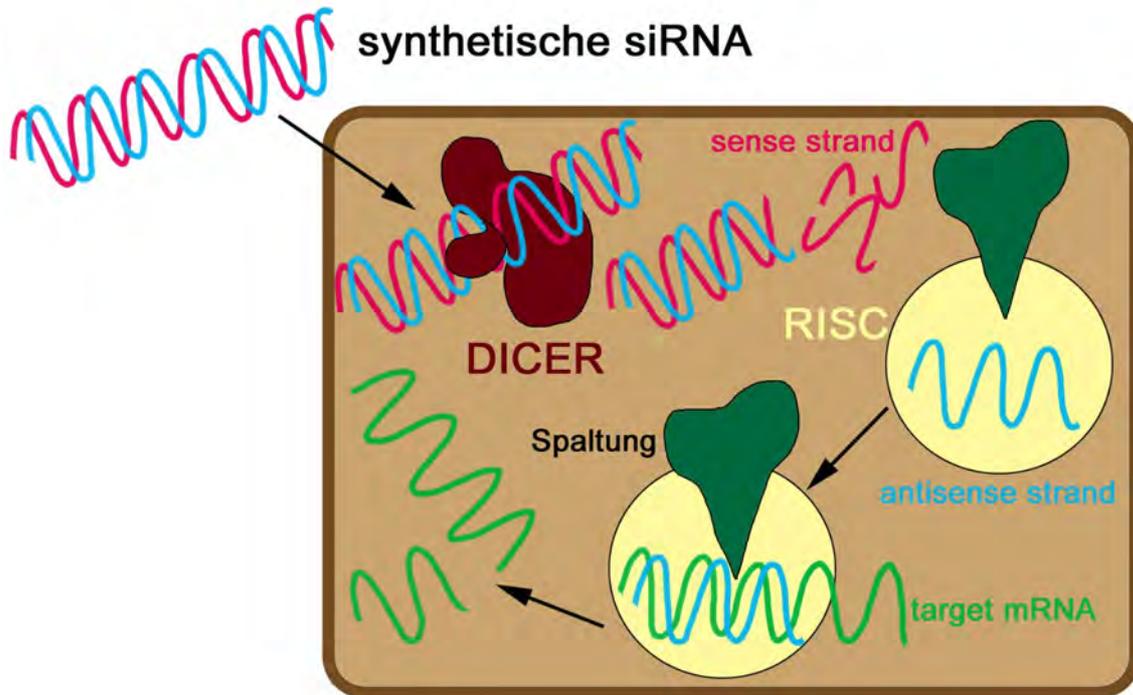


Abb. 12: Schematische Darstellung des Mechanismus der RNAi

Nach Einbringen der siRNA und Spaltung durch Dicer wird der „antisense“ oder „guide“ strand in den Proteinkomplex RISC aufgenommen. Mit seiner Hilfe wird die komplementäre Zielsequenz auf der mRNA erkannt und charakteristischerweise zwischen dem 10. und 11. Nukleotid durch das Argonaut-Protein (grün) gespalten (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001; vgl. Abb. 11). Schließlich folgt ihr Abbau, so dass das korrespondierende Protein nicht synthetisiert wird.

Obwohl durch gezielte Ausschaltung einzelner mRNA grundsätzlich spezifisch, birgt der Mechanismus der RNAi die Gefahr unspezifischer Nebeneffekte, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Interpretation beobachteter Auswirkungen erschweren. Zum Einen lassen sich bei der Anwendung der RNAi sog. „off-target“ Effekte beobachten, welche die unspezifische Ausschaltung zusätzlicher, von der siRNA nicht spezifisch „erkannter“ Gene umschreibt. Zum Anderen besteht für die Anwendung des Mechanismus der RNAi die Problematik einer Aktivierung des Interferon-Systems durch die eingebrachten Nukleotide über Vertreter der TLR-Familie (Sledz et al., 2003).

Verschiedene Transfektionssysteme dienen der Erleichterung der siRNA-Aufnahme in Zellen sowie zur Erhaltung ihrer Stabilität (Akhtar & Benter, 2007b). Als mehrfach negativ geladene Makromoleküle (polyanionische Struktur) können die Duplexe hydrophobe Zellmembranen nicht ohne Weiteres passieren (Kurreck, 2009). Im kationischen Liposomen-bildenden System erleichtert die positive Nettoladung des Transfektionsreagens die Formung von Komplexen mit den negativ geladenen Oligonukleotiden und zusätzlich Interaktionen mit ebenfalls negativ geladenen Zellmembranen (Agre et al., 1989; Abb. 13). Die Aufnahme in Zellen erfolgt für gewöhnlich über Endozytose unter Bildung von Endosomen (Juliano et al., 2008).

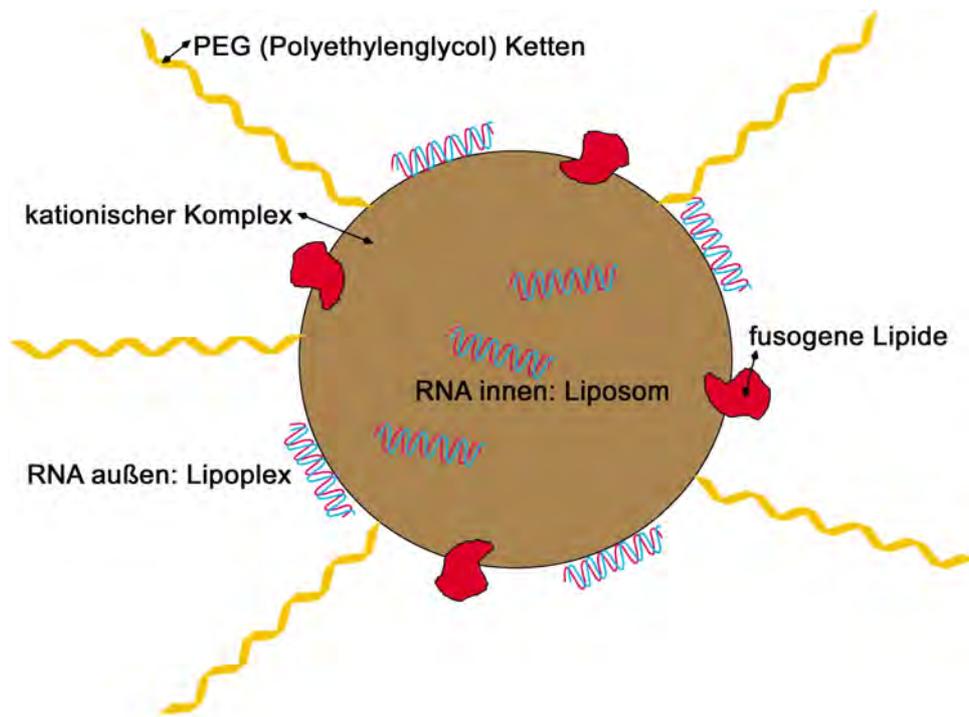


Abb. 13: Schematische Darstellung eines Liposoms oder Lipoplex' zur Einschleusung von siRNA in Zellen

Im Liposom befinden sich polyanionische siRNA-Duplexe im Inneren eines durch eine Phospholipid-Doppelschicht begrenzten Gebildes, während sie im Lipoplex an dessen Oberfläche adsorbiert vorliegen. Gekoppelte Polyethylenglycol- (PEG) Ketten stabilisieren die Partikel und erhöhen ggf. deren Zirkulationszeit im Blutkreislauf. Fusogene Lipide wie das neutrale L- α -Dioleoyl Phosphatidyl Ethanolamin (DOPE) dienen der Destabilisierung der Endosomenmembran nach Aufnahme des Liposoms/Lipoplex' in die Zelle und erleichtern somit die Freisetzung der siRNA ins Zytosol (Gilmore et al., 2006; Li & Szoka, 2007). (Modifiziert nach Akhtar & Benter, 2007b)

Statt gegen das selbe Ziel gerichtete siRNA mit unterschiedlichen Sequenzen als „pool“ einzusetzen, was das Risiko von „off-target“ Effekten erhöht (Kurreck, 2009), wurde in dieser Studie die anhand von *in vitro* Vortests als am wirksamsten eingestufte Sequenz für die *in vivo* Applikation ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden primäre, neurogliale Zellkulturen aus der *Area postrema* der Ratte mit den jeweiligen siRNA transfiziert. Die seit Jahren etablierten und in der Arbeitsgruppe vielfach genutzten, primären Zellkulturen (Hitzel, 2009; Ott et al., 2010; Rafalzik et al., 2008; Weber, 2009; Wuchert, 2008) aus den CVO der Ratte sind eine hierfür bestens geeignete Grundlage, da in diesen Zellen die *in vivo* als typisch angesehenen Eigenschaften weitestgehend erhalten bleiben (Morgan & Darling, 1994). Damit ermöglichte die Verwendung dieser Zellkulturen neben der Auswahl einer erfolgversprechenden siRNA-Sequenz erste Voraussagen der Auswirkung des Herunterregulierens bestimmter Gene *in vivo*. Als Endpunkte der Bewertung eines eventuellen „Gen-silencing“, dienten einerseits vergleichende immunzytochemische Untersuchungen der transfizierten Zellen und andererseits die Messung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6, die mit und ohne Zellstimulation durch LPS von diesen Zellen ins Kulturmedium abgegeben worden waren. In eigenen Vorversuchen sowie Versuchen in Vorgängerarbeiten (Wuchert et al., 2009) war der Zeitpunkt 6 Stunden nach einer Stimulation als besonders günstig ermittelt worden. Sowohl Zytokinkonzentrationen im Überstand als auch immunhistochemisch ermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren waren zu diesem Zeitpunkt besonders stark ausgeprägt. Die auf dieser Basis ermittelte, potentiell wirksamste Sequenz wurde, versehen mit einer Reihe

Modifikationen (vgl. Kap. II.A., S. 65), welche zu erhöhter Resistenz der siRNA gegenüber eines Abbaus durch Nukleasen sowie zur Minimierung von „off-target“ Effekten führen sollten, für die *in vivo* Studien eingesetzt. Als Grundlage der hier durchgeführten *in vivo* Transfektion diente eine Studie von Niizuma et al., in der die intracerebroventrikuläre Injektion von 5 µg einer entsprechend modifizierten siRNA einen effektiven „knock-down“ des Zielgens bewirkte (Niizuma et al., 2008). Das verwendete Transfektionsmedium aus einer 1 : 2 Mischung kationischer Lipide (jetSI™) in Ethanol und dem fusogenen Peptid DOPE in Chloroform, das auch von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich verwendet worden war (Guissouma et al., 2006; Hassani et al., 2005), wurde für die vorliegende Arbeit übernommen, ebenso wie die siRNA-Menge von 5 µg/Tier.

II. MATERIAL UND METHODEN

Technische Geräte

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
<i>Aqua bidest</i> Anlage	Milli-Q Biocel	Millipore, Eschborn
Autoklav	Systec 2540 EL	Systec, Wettenberg
Binokular	Nikon SMZ-V	Nikon, Tokio, Japan
Brutschrank	Nuaire™ US-Autoflow	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Dataport	Dietscan Analyser	Accu Scan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Digitale schwarz-weiß Kamera	Spot Insight	Diagnostic Instr. –Visitron Systems, Puchheim
Eismaschine	Icematic F120	CastelMAC S.p.A. Castelfranco Veneto, Italien
ELISA reader	Digiscan	Asys Hitech, Eugendorf, Österreich
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX50	Olympus Optical, Hamburg
Heißluftsterilisator	ED 115/E2	Binder GmbH, Tuttlingen
Homogenisator	SONOPULS	Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin
Klimakammer	10`US/+5 to +40 DU	Firma Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen
Kryostat	Typ HM 500 O	Microm GmbH, Walldorf
Lamina	Herasafe	Kendro Laboratory Product GmbH, Hanau
Mikroflow TM Sicherheitswerkbank Klasse 2	Modell 20229	Nunc, Wiesbaden
Minishaker/Vortex	MS1	IKA Works Inc. Wilmington, NC, USA
Molecular Imager®	ChemiDoc™ XRS Imaging System	BioRad, München
Perfusionsanlage		W.G.Kerkhoff Institut, Bad-Nauheim
pH-Meter	765 Calimatic	Kleinfeld Labortechnik, Hannover
Pipettiergerät	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Pipettierhelfer	Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
Power Supply	Power Pac 200	BioRad, München
Schermaschine	Typ GH 004	Aesculap, Tuttlingen
Schüttler	Typ 3011	Roth GmbH, Karlsruhe
Schüttler Rotomix	Type 50800	Barnstead International, Dubuque, IA, USA
Schwanenhalslampe	Intralux 500	Volpi AG, Zürich, Schweiz
Semi-Dry Blotter	Trans Blot® Semi-Dry Quick Reference Guide	BioRad, München
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy	Technomara, Fernwald
Spectrophotometer	DU ® 50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System		Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Stereotakter	Model 900	Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
Surgical Bone Drill System		Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Telemetrie - Dataport	DP-24 Dataport	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie - Empfängerplatte (30 x 22,5 x 3 cm)	RA -1000	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Telemetrie - Empfängerplatte (56×29×7 cm)	ER-4000 Receiver	Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA
Telemetrie - Sender 16 x 11 mm	VM-FH TR-3000	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie - Sender 23 x8 mm	T-4000 E-Mitter®	Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA
Thermoblock	QBT	VWR, Darmstadt
Tischrühr- und Heizgerät	Combimag	Roth GmbH, Karlsruhe
Tischrühr- und Heizgerät	PCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Ultraschall-Wasserbad	Bandelin Sonorex RK100	H. Kretschmer, Gießen
Vakuumpumpe	XF 54 230 50	Millipore, Eschborn
Waage zum Wiegen der Tiere	Satorius universal	Sartorius AG, Göttingen
Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen	P1210N; AE 50 und PM 2500	Mettler Toledo, Gießen
Wärmekissen		Fine Science Tools Inc., Heidelberg
Wärmematte		MarMed GmbH, Cölbe
Wärmematte	TR-100 FST+EA4013	Messmer Electronic, Dettenhausen
Wärmeschrank	Typ 5050 EK	Haereus, Hanau
Wasserbad	BF 15	Renner GmbH, Dannstadt
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific Waltham, MA, USA
Zentrifuge	Spectrafuge mini	neo Lab, Heidelberg
Zentrifuge für 96well Platten	PerfectSpinP	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Software

Programm:	Hersteller:
Accudiet 1.20	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
Adobe Photoshop, Version 5.5	Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim
DIETDAT, Version 1.70	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
Dietmax	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
EndNote Programm, Version X3	Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
Graph Pad Prism®, Version 5	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Metamorph, Version 5.05	Diagnostics Instruments – Visitron Systems, Puchheim
Open Office Writer, Version 3.2	Oracle, Redwood Shores, CA, USA
Quantity One® Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
StepOne Software, Version 2.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SigmaStat, Version 2.0	Jandel Scientific, CA-Corte Madera
Spot Insight Software	Diagnostics Instruments, Michigan, USA
Stat View®	Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA
Vital View Version 3.1	Respironics Inc–MiniMitter, Bend, OR, USA
Windows Microsoft Excel, Version 6.0	Microsoft Corporation, München
Windows Microsoft Word Version 6.0	Microsoft Corporation, München

Gebrauchsmaterial allgemein

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Glasflaschen	verschiedene Volumina	Schott AG, Mainz
Magnetrührstäbchen	PTFE ummantelt	Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben	Klasse A, 1-, 2- und 5 l	Roth GmbH, Karlsruhe
Messzylinder	Klasse A, 100- und 250 ml	Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten	verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Reaktionsgefäßständer		Roth GmbH, Karlsruhe
Schraubdeckeldosen	unsteril, 40 ml	Roth GmbH, Karlsruhe

Verbrauchsmaterial allgemein

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Einmalhandschuhe	aus Latex	UNIGLOVES ® GmbH, Troisdorf
Einmalhandschuhe N-Dex®	aus Nitril	Best Manufacturing Company, Menlo GA, USA
Labortücher	Kimtech Science	Kimberley-Clark Europe Limited, Reigate, England
Parafilm®		Roth Laborbedarf, Karlsruhe
Pasteur- Pipetten	einweg	MAGV, Rabenau
Pipettenspitzen	in verschiedenen Größen: 10-, 100-, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen mit Filter	in verschiedenen Größen: 10-, 100-, 1000 µl	Fa Eppendorf-Natheler -Hinz-GmbH, Hamburg
PS- Röhrchen	steril, 3,5-, 12-, 15-, 50 ml	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock Tubes	Reaktionsgefäße 3810, 0,5-, 1,5-, 2 ml	Fa Eppendorf-Natheler -Hinz-GmbH, Hamburg
Serologische Pipetten	steril: 2-, 5-, 10-, 25-, 50 ml	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Skalpellklingen	BB522	Aesculap-Werke AG, Tuttlingen

Die für die jeweiligen Methoden speziellen Ge- und Verbrauchsmaterialien sowie die verwendeten Chemikalien, Lösungen und Puffer sind am Anfang der entsprechenden Kapitel aufgeführt.

II.A. Versuchsmodelle

1. *In vitro* Modell

1.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Deckgläschen	15 x 15 mm Stärke 1	Menzel GmbH, Braunschweig
Mikro-12 Kammersysteme	Flexiperm®-	Haereus, Hanau
Pasteurpipetten	230 mm aus Glas	MAGV, Rabenau
Petrischale (Glas)	Ø 11 cm	MAGV, Rabenau
Petrischalen (Plastik)	94/16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen, steril	15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	FP 30/0,2 CA-S	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Teflonschläuche	Innendurchmesser 0,75- und 1,98 mm	Kronlab, Sinsheim

Chemikalien

Bezeichnung:	Hersteller:
B 27	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Carbogen	Messer Griesheim GmbH, Neuried
D-Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dispase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
Gey's balanced salt solution (GBSS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hank's buffered salt solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
HEPES Natriumsalz	
(N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamat (Monosodium-Salz)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Neurobasal-A	Invitrogen, San Diego, CA, USA
PBS	PAA, Cölbe
(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	
PBS (instant), pH 7,2 - 7,4	Ansatz aus PBS tablets in <i>Aqua bidest.</i> (1 Tablette/ 200 ml)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
Steriles Wasser für die Zellkultur	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin	Biochrom, Berlin
5 x siRNA Buffer	Dharmacon, Thermo Fischer Scientific Lafayette, CO, USA
Dharma FECT 1	Dharmacon, Thermo Fischer Scientific Lafayette, CO, USA

siRNA

Bezeichnung:	Hersteller:
ON-TARGETplus Non-targeting siRNA	Dharmacon, Thermo Fischer Scientific Lafayette, CO, USA

Bezeichnung:	Hersteller:
ON-TARGETplus Set of 4 LQ-0922 LQ-092218-00-0005 LQ-092218-00-0006 LQ-092218-00-0007 LQ-092218-00-0008	Dharmacon, Thermo Fischer Scientific Lafayette, CO, USA
RUM2RX (20 µM)	Riboxx GmbH, Dresden
RUM4RX (20 µM)	Riboxx GmbH, Dresden
RUM6RX (20 µM)	Riboxx GmbH, Dresden

Lösungen und Puffer

Bezeichnung:	Zusammensetzung/Herstellung:
1x si RNA Resuspension Buffer	Verdünnung von 5x siRNA Buffer 1:4 mit RNase-freiem H ₂ O; Zusammensetzung der fertigen Verdünnung: 6mM HEPES, pH 7,5; 0,2mM MgCl ₂
Dispase - Lösung	Dispase Trockensubstanz in HBSS- Puffer
Dispase - Gebrauchslösung (37°C)	Dispase I (1 ml) + 2 ml HBSS-Puffer; Enzymaktivität der Gebrauchslösung: 2 I.U./ml
GBSS - Lösung	Grundlage: GBSS Supplemente: Glucose (5 %); oxygeniert über CO ₂ - Flasche mittels Schlauchsystem mit Kanüle
HBSS – Puffer	HBSS unter Zugabe von 20 mM HEPES; oxygeniert über CO ₂ - Flasche mittels Schlauchsystem mit Kanüle
Inaktivierungs - Lösung (37°C)	1 mM EDTA in HBSS- Lösung
Kulturmedium für die primäre neurogliale Zellkultur (Neurobasal-A-Medium, NBA)	Grundlage: Neurobasal-A Supplemente: B 27 (Endkonzentration 2 %), Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) Glutamin (2 mM), (Endkonzentration 1 %)
Transfektionsmedium für die primäre neurogliale Zellkultur (NBA-X)	Grundlage: Neurobasal-A Supplemente: Glutamin (2 mM), (Endkonzentration 1 %)
Lipopolysaccharid (LPS)-Stocklösung (1 mg/ml)	Lösen von LPS in PBS (pyrogenfrei) Lagerung: - 20°C
LPS-Gebrauchslösung für <i>in vitro</i> Stimulation	Verdünnung der Stocklösung 1 : 10 mit NBA-X
siRNA Stocklösung für <i>in vitro</i> Transfektion	siRNA von Dharmacon: Lösung des 5 nmol RNA-pellets in 1x siRNA Resuspension Buffer zum Herstellen einer 20 µM Lösung
siRNA Gebrauchslösung für <i>in vitro</i> Transfektion	Verdünnung der Stocklösung 1 : 4 mit 1x-siRNA Resuspension Buffer zum Herstellen einer 5 µM Lösung
siRNA-Ansatz	siRNA Gebrauchslösung in NBA-X (Endkonzentration 25- oder 50 nM)
Transfektionslösung	0,1 % DharmaFECT in NBA-X
Transfektionsansatz	10 % Transfektionslösung und 10 % siRNA-Ansatz in NBA-X

1.2. Versuchsaufbau

Nach Gewinnung und Kultivierung neuroglialer Zellen aus der *Area postrema* (Kap. II.A., 1.3) wurden diese mit den verschiedenen siRNA bzw. Kontrollmedien inkubiert und anschließend 6 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS; 100 µg/ml) stimuliert (Kap. II.A., 1.4). Die Inkubationszeit wurde mit der Fixation der Zellen beendet und anschließend die immunzytochemische Auswertung (Kap. II.C, 1.4). vorgenommen. Des Weiteren wurde die Bioaktivität der Zytokine IL-6 und TNFα im Überstand des Mediums bestimmt (Kap. II.C, 2; siehe auch Kap. I., 5.3., S. 55).

1.3. Primäre Zellkultur der *Area postrema*

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in eigens zu diesem Zweck hergestellten Kulturgefäßen, die aus auf Deckgläschen fixierten, flexiblen Mikrokammern (Flexiperm) bestanden. Die Glasböden wurden im Anschluss an das Anheften an die Kammern für ein optimales Wachstum der neuroglialen Zellen zunächst mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml bei 4°C, 12-24 h) beschichtet, um die spätere Adhäsion der Zellen zu begünstigen. Membranschäden der wachsenden Zellen, die durch den Kontakt mit Lysin entstehen können, wurde durch die Entfernung von Lösungsresten mit sterilem *Aqua bidest.* vorgebeugt. Bis zur Aussaat der Zellen wurden die Kammern im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt.

Um möglichst keimarme Bedingungen zu schaffen, wurden die notwendigen Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchgeführt, die Präparation erfolgte unter Verwendung hitze- oder ethanolsterilisierter Instrumente. Vier bis sechs Tage alte neonatale Wistar-Ratten wurden zunächst mit einer Schere dekapitiert, Kopfhaut und Schädeldecke mit Schere und Pinzette entfernt, das Gehirn in seiner Gesamtheit entnommen und der Hirnstamm mit anhaftendem *Cerebellum* mit einem Skalpell vom *Cerebrum* abgetrennt. Bis zur nachfolgenden Feinpräparation wurden die Hirnteile in mit oxygeniertem GBSS-Puffer gefüllten Petrischalen auf Eis gelagert. Unter einem Binokular wurde die der *Medulla oblongata* aufsitzende *Area postrema* (Abb. 14) freipräpariert und bis zur enzymatischen Behandlung in eiskalten HBSS-Puffer überführt. Um die Zellen aus dem Gewebeverband, sowie interzelluläre Verbindungen vollständig zu lösen, wurde eine Kombination aus enzymatischer und mechanischer Dissoziation angewendet. Dazu wurde das Gewebe zunächst mit 2 ml der Protease Dispase-1 (2 I.U./ml) in oxygeniertem HBSS-Puffer bei 37°C 45 Minuten lang unter Einleitung von Carbogen inkubiert, um bei teilweiser Auflösung des Gewebeverbandes eine Schädigung der Zellmembranen zu verhindern (Frangakis & Kimelberg, 1984; Frangakis et al., 1982). Die anschließende Inaktivierung der Dispase erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 1 mM EDTA in HBSS-Puffer, woran sich drei weitere Waschschrte mit Neurobasal-A-Medium anschlossen. Mit einer 1 ml Pipette erfolgte dann die zusätzliche mechanische Zerkleinerung (Gebke et al., 1998; Jurzak, 1994) durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren der Gewebefragmente unter Vermeidung von Luftblasen, bis aufgrund einer milchigen Trübung auf einen ausreichenden Grad der Dissoziation geschlossen werden konnte. Je 300 µl der Zellsuspension wurden in eine Zellkulturkammer gegeben und die so präparierten Kammern anschließend bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5 % für ca. 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums, vor dem ersten Wechsel des Kulturmediums kam es erfahrungsgemäß zur Anheftung der Zellen am Boden der Kammern, während nicht-vitale Zellen und Zelltrümmer am nächsten Tag zusammen mit dem Medium verworfen wurden. Für eine Wachstums- und Ausdifferenzierungszeit von 5 - 6 Tagen, die der Transfektion vorausging, wurde das Medium zweitägig gewechselt.

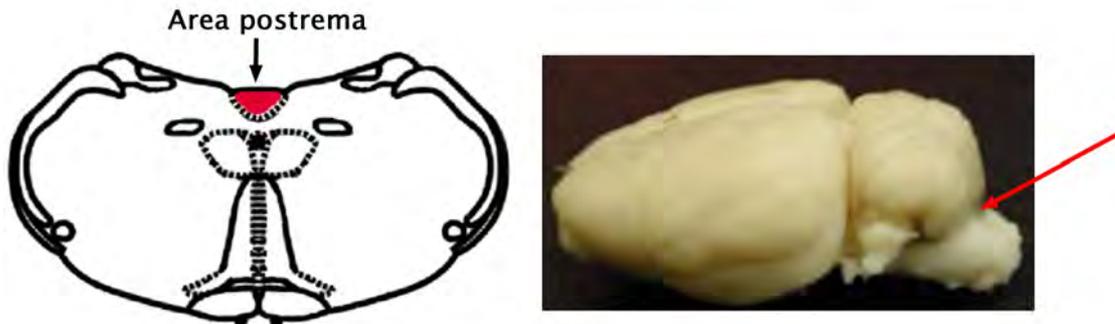


Abb. 14: Lokalisation der Area postrema

Schematische Darstellung der Area postrema im coronalen Querschnitt des Stammhirns (rot, links). Rechts: Frisch entnommenes Gehirn einer neonatalen Ratte; die Area postrema liegt im Bereich unterhalb der Pfeilspitze. Schema modifiziert nach Paxinos & Watson (1998).

1.4. Transfektion und Stimulation der Zellen

Die Transfektion wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenz DharmaFECT in einer Konzentration von 0,1 % in modifiziertem Kulturmedium (NBA-X) durchgeführt (Transfektionslösung, S. 61), dem kein Supplement B27 zugesetzt worden war. Dadurch sollte eine basale Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch im Supplement enthaltene Wachstumsfaktoren verhindert werden. B27 ist ein serumfreies Supplement, das speziell für die Ansprüche hippocampaler oder anderer Neuronen des neonatalen Rattegehirns entwickelt wurde (Herstellerangaben). Wegen der Gefahr einer erhöhten Zelltoxizität durch Antibiotika, die aufgrund der Permeabilisierung der Membranen durch das Transfektionsreagenz bestand, wurde hier auch auf die Zugabe von Penicillin und Streptomycin verzichtet. Die Transfektionslösung wurde bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubiert, ebenso wie die verschiedenen siRNA-Ansätze (S. 61), die ebenfalls mit NBA-X auf die gewünschte Konzentration (25- bzw. 50 nM) gebracht worden waren. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die siRNA-Ansätze jeweils 1 : 1 mit der Transfektionslösung gemischt, worauf nochmals für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Verdünnung (1 : 7) mit NBA-X ergab den gebrauchsfertigen Transfektionsansatz, mit welchem die Kulturen nach einmaligem Waschen mit NBA-X für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit 100 µg/ml LPS in NBA-X. Nach Sicherung des Überstandes für die Zytokinmessung (S. 97) und einmaligem Waschen mit NBA-X wurden dazu je 350 µl der LPS-Gebrauchslösung (37°C) auf die Kulturen gegeben und diese für weitere 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für die Kontrollgruppen erfolgte die entsprechende Inkubation stattdessen mit reinem NBA-X. Die Deckgläschen wurden nach erneuter Entnahme des Überstandes zur späteren Analyse entfernt und in eine 12-well Platte überführt. Die Zellen darauf wurden für die folgende Immunzytochemie 15 Minuten in eiskaltem, 4 % igem PFA fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. So konnte die Immunzytochemie entweder direkt im Anschluss oder nach bis zu zweiwöchiger Lagerung der Zellen bei 4°C durchgeführt werden.

2. *In vivo* Modelle

2.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Dental Cement Kit	Pink Opaque (STO-51458)	Stoelting Europe, Dublin, Irland
Dentalbohrer		Fine Science Tools, Heidelberg
Dentalbohrer - Bohrköpfe	1,35 mm (STO-51455-5)	Stoelting Europe, Dublin, Irland
Dermafil	Nahtmaterial, nicht resorbierbar: USP 2/0, EP 3	SMI AG, Hünningen, Belgien
Einstreu für Tierkäfige	SS14-H1505-219	Ssniff, Soest
Einstreu für Tierkäfige	Altromin animal bedding	Altromin GmbH und Co KG, Lage-Lippe
Fixateur für Dummy Cannula		Herstellung in der Campuswerkstatt
Standard Rattenfutter	Standard Rattenfutter R-Z V1324-000	Ssniff, Soest
I.C.V - Dummy Cannula (Mandrin)	C313DC; fits 2,5 mm guide, Länge 2,5 mm	Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf
I.C.V - Guide Cannula (Leitkanüle)	C313G, 2,5 mm	Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf
I.C.V - Internal Cannula (Injektionskanüle)	C313I to fit 2,5 mm, Länge: 4,5 mm	Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf
Knochenschrauben	1,59 mm O.D., Länge: 3,2 mm (STO-51457)	Stoelting Europe, Dublin, Irland
Kohrsolin extra	Instrumenten-Desinfektionsmittel	Bode Chemie, Hamburg
Mehrweg-Spritze	10 µl	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Operationsbesteck		Aesculap AG& Co.KG, Tuttlingen
Polypropylenschlauch	PP20	Portex Ltd., Hythe, UK
Pur-Zellin®	Zellstofftupfer	Paul Hartmann, AG, Heidenheim
Silkafix®	2,5 cm x 9,2 m	Lohmann Rauscher Int. GmbH & Co.KG, Rengsdorf
Skalpellklingen		Rüttgers GmbH & Co.KG, Solingen
Sterican®	Sterile Einwegkanülen; Ø 0,45 x 12 mm, 26 G; Ø 0,9 x 40 mm, 20 G	Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Einwegspritzen 1 ml	BD Plastipak®	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
Sterile Einwegspritzen 5 ml	BRAUN INJECT	Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Schlinggazetupfer	6 x 9 cm	Weisweiler GmbH & Co.KG, Münster
Surgicryl	Nahtmaterial, resorbierbar; USP 3/0, EP 2	SMI AG, Hünningen, Belgien
Tierfutter	Zucht-Diätfutter	Altromin GmbH und Co KG, Lage-Lippe
transparente Polycarbonat-Käfige	Typ IV (38 x 59 x 18 cm / B x T x H)	FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, Emmerdingen

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
transparente Polycarbonat-Käfige	Typ III (28 x 42 x 15 cm / B x T x H)	FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, Emmerdingen
Watteträger	meditip	Servopraxe GmbH, Wesel
Wärmematte für Kleintiere,		Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Zellstoff	ungebleicht 40 x 60 cm	ZVG Zellstoff Vertriebs GmbH, Troisdorf

Chemikalien

Bezeichnung:	Hersteller:
Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
AG490	Enzo Life Sciences International Inc. (BIOMOL), PA, USA
(N-Benzyl-3,4-dihydroxybenzylidenecyano-acetamide)	
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cremophor® EL (Polyoxyethylenglyceroltriricinoleat 35, DAC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cutasept® F Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie, Hamburg
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glucose-Lösung 40 % ad us. vet.	Belapharm, Vechta
Glucose-Lösung 5 % ad us. vet.	Belapharm, Vechta
H ₂ O ₂	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Isotone NaCl- Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
jetSI™ 10 mM	Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Frankreich
L-α-Dioleyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (DOPE)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lipopolysaccharid aus E. coli; Serotyp O111:B4	cat.: L-2630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	PAA, Cölbe
RNase freies H ₂ O	Invitrogen, San Diego, CA, USA

siRNA

Bezeichnung:	Hersteller:
Control siRNA (FITC Conjugate)	sc-36869 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Custom Oligo C/EBPβ mit siSTABLE Modifikation	
<u>Sequenz:</u> sense: GAGCGACGAGUACAAGAUGUU-3' antisense: 5'P-CAUCUUGUACUCGUCGCUCUU	Dharmacon, Thermo Fischer Scientific Lafayette, CO, USA Dharmacon, Thermo Fischer Scientific Lafayette, CO, USA
siSTABLE Non-targeting siRNA	

Lösungen und Puffer

Bezeichnung:	Zusammensetzung/Herstellung:
Lipopolysaccharid (LPS)-Stocklösung (1 mg/ml)	Lösen von LPS in PBS (pyrogenfrei) Lagerung: - 20°C
LPS-Gebrauchslösung (100 µg/ml)	Verdünnung von LPS-Stocklösung in PBS (pyrogenfrei) Lagerung: - 20°C
AG490-Gebrauchslösung (1,5 µg/µl; 5 mM)	Lösen von 1 mg AG490 in 667 ml Cremophor®EL Gebrauchslösung Lagerung: - 55°C
Cremophor-Gebrauchslösung: 25 % in PBS (im Folgenden als „Cremophor“ abgekürzt)	Mischen von 1 ml Cremophor®EL in 1 ml PBS (pyrogenfrei), Zugabe von 3 ml PBS, erneutes Mischen, Inkubation im Ultraschall-Wasserbad bei 37°C für 60 min; Lagerung - 20°C
DOPE-Lösung 80 mM	Lösen von 25 mg DOPE in 75 µl Chlorophorm (Glasbehälter) anschließend Zugabe von 340 µl Ethanol
künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, pH 7,4)	Bestandteile (in <i>Aqua bidest.</i>): 125 mM NaCl; 7,3 g/l 2,5 mM KCl; 0,19 g/l 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 0,17 g/l 26 mM NaHCO ₃ ; 2,18 g/l 2 mM CaCl ₂ ; 0,294 g/l 1 mM MgCl ₂ ; 0,203 g/l 25 mM Glucose ; 4,95 g/l
Lösung A für <i>in vivo</i> Transfektion	Herstellung aus DOPE-Lösung in jet-SI™ 10 mM in einer 1:5-Verdünnung; Endkonzentration DOPE: 20 mM
Lösung B für <i>in vivo</i> Transfektion	Herstellung aus 62,5 % Lösung A und 37,5 % Ethanol
Lösung C für <i>in vivo</i> Transfektion	Herstellung aus 7,2 % Lösung B, 12,5 % 40 % iger Glucose-Lösung und 80,3 % RNase freiem H ₂ O
siRNA Gebrauchslösung für <i>in vivo</i> Transfektion	Lösung der lyophilisierten siRNA-Pellets in 5 % iger Glucose-Lösung zum Erreichen einer 360 µM Lösung (≈ 5 mg/µl)
Injektionslösung ohne siRNA („vehicle“)	Herstellung aus Lösung C und 5 % iger Glucose-Lösung, 1:1
siRNA-Injektionslösung	Herstellung aus Lösung C und jeweiliger siRNA Gebrauchslösung, 1 : 1

Medikamente

Handelsname:	Wirkstoff:	Dosierung:	Hersteller:
Antisedan®	Atipamezolhydrochlorid	1 mg/kg	Pfizer GmbH, Berlin
Cepetor® KH	Medetomidin	siehe (S. 70)	cp-pharma GmbH, Burgdorf
Ketamin® 10 %	Ketaminhydrochlorid	siehe (S. 70)	Belapharm, Vechta
Metacam® Injektionslösung, 5 mg/kg	Meloxicam	2 mg/kg KM	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim
Vetranquil 1 %	Acepromazin	siehe (S. 70)	Albrecht GmbH, Aulendorf
Vidisic®-Augengel	Carbomer 40000-60000		Dr. Mann Pharma, Bausch & Lomb, Berlin
Xylazin 2%,	Xylazinhydrochlorid	siehe (S. 70)	cp-pharma GmbH, Burgdorf

2.2. Versuchsaufbau

Für alle drei Teilstudien wurde einem einheitlichen, jeweils entsprechend modifizierten Versuchsaufbau gefolgt. Dieser umfasste zunächst die Vorbereitung der Tiere (Operationen, Rekonvaleszenz, S. 70), an deren Anschluss die *in vivo* Versuche unter Erfassung physiologischer Daten (Kap. II.B) durchgeführt wurden (Injektion von Lipopolysaccharid, LPS in verschiedenen Dosen bzw. PBS in Kontrollgruppen; S. 74). Jeder Versuch endete mit der transkardialen Perfusion der Versuchstiere (Kap. II.C, 1.5.1), um das benötigte Material für die anschließende Erfassung biochemischer Parameter (Kap. II.C) zu gewinnen. Die zeitlichen Abläufe und die Einteilung der Versuchsgruppen sind nachfolgend dargestellt. Die verwendeten Substanzen werden auf den Seiten 64 - 66 aufgelistet. Zur Erklärung der Teilstudien siehe auch Kap I., 5.

Abb. 15: Versuchsgruppen der einzelnen Teilstudien

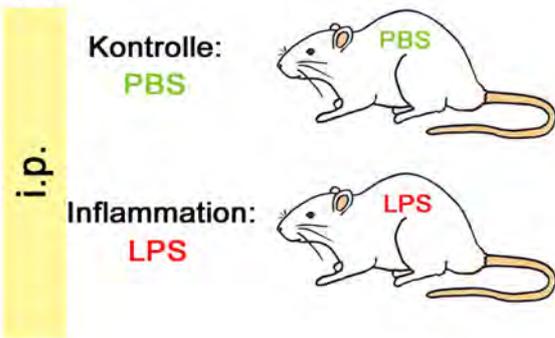
Abkürzungen: AG: JAK-Inhibitor AG490, Crem: Cremophor, i.c.v.: intracerebroventrikulär, i.p.: intraperitoneal, LPS: Lipopolysaccharid, nt: non-targeting RNA, PBS: Phosphate-Buffered Saline, si: anti-NF-IL6 siRNA vc:vehicle

In der ersten Teilstudie (1) wurden mit LPS (100 µg/kg oder 1 mg/kg, i.p.) injizierte Tiere ihren direkten Kontrollen gegenübergestellt, die stattdessen nur PBS als Lösungsmittel erhalten hatten. (2) Für die Inhibitionsstudie mit dem JAK-Inhibitor AG490 (AG) wurden mit dem Inhibitor behandelte Tiere (i.c.v.) hinsichtlich ihrer Reaktion auf i.p. appliziertes LPS (100 µg/kg) mit solchen verglichen, die stattdessen nur mit dem Lösungsmittel Cremophor (Crem) behandelt worden waren. Um Effekte der jeweils in den Ventrikel gegebenen Substanzen an sich erkennen zu können, wurde für jede dieser Substanzen (Crem, AG) außerdem eine Kontrollgruppe gebildet, der wiederum PBS i.p. injiziert wurde. Entsprechend wurde auch in der dritten Teilstudie vorgegangen (3), wobei hier das Lösungsmittel für die i.c.v.-Injektionen (vehicle, vc) einer nicht-zielgerichteten RNA einerseits (non-targeting, nt) und der anti-NF-IL6-siRNA (si) andererseits gegenüber gestellt werden musste. Dosierungen und methodische Ansätze für die Teilversuche wurden in Anlehnung an einschlägige Publikationen durchgeführt (siehe Kap. I., 5.).

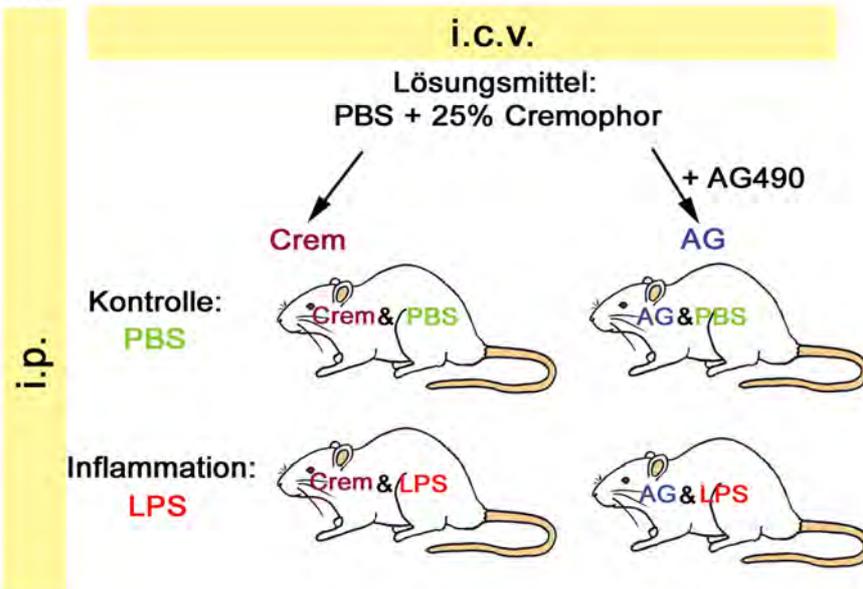
Abb. 16: Zeitlicher Ablauf der *in vivo* Versuche der einzelnen Teilstudien

(1) Die Injektion von Lipopolysaccharid (LPS, i.p.) erfolgte an Tag 8 des Versuchs, an diesem Tag (2-, 4-, 6-, oder 8 h später) oder am folgenden (24 h) wurde der Versuch durch Perfusion der Tiere abgeschlossen. (2) In der zweiten Teilstudie wurde der JAK-Inhibitor AG490 an Tag 8 eine Stunde vor der LPS-Injektion appliziert (i.c.v.), nachdem der Trinktest (Beschreibung S. 74) einen Tag zuvor ein zufriedenstellendes Ergebnis geliefert hatte. Die Perfusion erfolgte 8- bzw. 24 h nach der intraperitonealen Injektion (3). Für die dritte Teilstudie wurde auf den Trinktest verzichtet, da praktisch für alle vorherigen Implantationen der i.c.v. Kanülen im Trinktest eine funktionelle Platzierung bestätigt werden konnte und deshalb diese zusätzliche Prozedur mit den Tieren als nicht zwingend notwendig erachtet wurde. Der korrekte Sitz der Kanüle wurde für diese Teilstudie später anhand coronaler Gehirnschnitte verifiziert (siehe auch Abb. 80, S. 185). Die Injektion der siRNA (i.c.v.) erfolgte 24 h vor der LPS-Gabe und die Perfusion 4- bzw. 24 h danach.

(1)



(2)



(3)

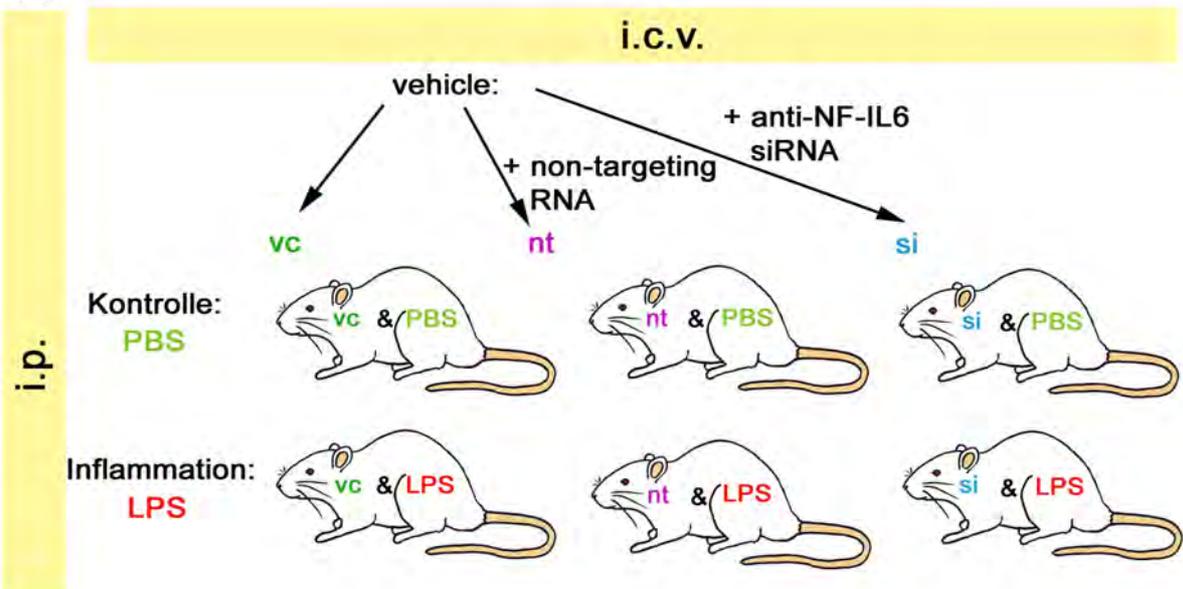


Abb. 15

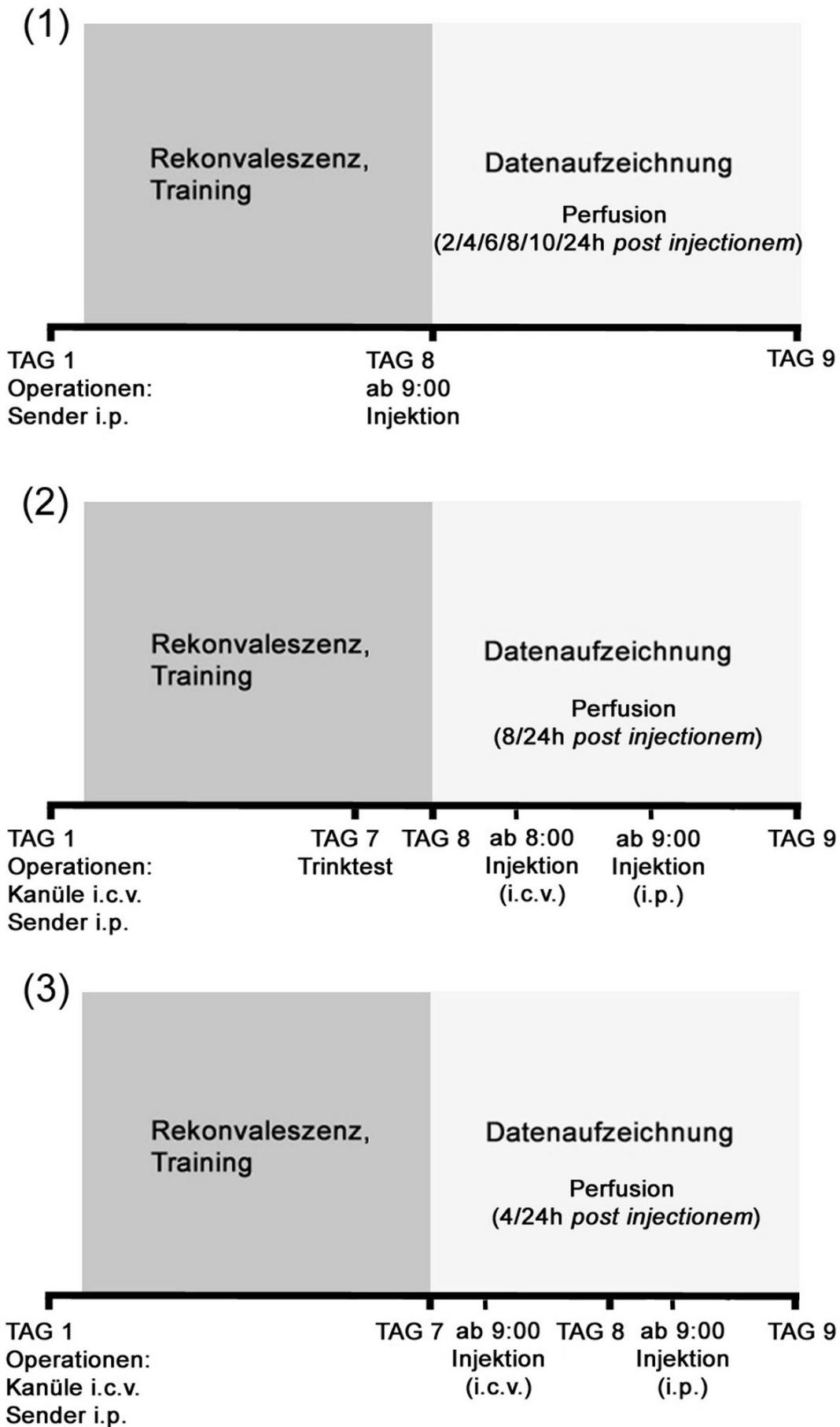


Abb. 16

2.3. Tiere

Die für alle Versuche verwendeten Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) stammten aus der institutseigenen Zucht, deren Elterntiere von Charles River WIGA (Sulzfeld) bezogen wurden. Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgten bei einer konstanten Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchte von 50 % und einem 12 / 12 Stunden hell / dunkel Rhythmus (Licht von 7:00 bis 19:00 Uhr). Zur Aufzucht der Jungtiere zusammen mit dem Muttertier in den ersten Tagen dienten transparente Polycarbonat – Käfige Typ IV, im Anschluss an das Absetzen (110 ± 10 g Körpermasse, KM) wurden Gruppen von bis zu fünf, nach Geschlechtern getrennten Tieren in Polycarbonat – Käfige Typ III umgesetzt, wo sie bis zum Versuchsbeginn verblieben. Während der gesamten Zeit wurden Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Für die Versuche an primären neuroglialen Zellkulturen wurden männliche Tiere im Alter von 4 – 6 Tagen verwendet, für alle anderen Versuche wurden die ebenfalls rein männlichen Tiergruppen anhand ihrer KM zusammengestellt, die jeweils zwischen 250 ± 50 g lag. Vor dem Beginn der Studie wurden beim RP Hessen die durchzuführenden Tierversuche per Antrag genehmigt (Projektnummer GI 18/2 51/2008) bzw. angezeigt (V54-19, c20/15c GI18/2).

2.4. Operationen

Die nachfolgend beschriebenen operativen Eingriffe wurden z.T. einzeln (alleinige Implantation von Radiotransmittern) oder in Kombination (Radiotransmitter und intracerebroventrikuläre Kanüle) vorgenommen. Im Falle mehrerer Teiloperationen wurden diese alle im gleichen Zeitraum vorgenommen, so dass jedes Tier nur einmal in Narkose gelegt wurde.

2.4.1. Intraperitoneale Implantation der Radiotransmitter

Narkose

Am Versuchstag wurde den Tieren mindestens eine Stunde vor Einleitung der Narkose das Analgetikum Meloxicam in einer Dosierung von 2 mg/kg KM subkutan (s.c.) verabreicht, um die perioperative Analgesie zu gewährleisten. Die Injektionsnarkose erfolgte als Mischspritze intraperitoneal (Mischung A: 0,25 mg/kg KM Medetomidin, 60 mg/kg KM Ketamin; Mischung B: 5 mg/kg Xylazin, 50 mg/kg Ketamin, 0,5 mg/kg Acepromazin). Zur Überprüfung der Narkosetiefe und um die Schmerzfreiheit des Tieres zu gewährleisten wurden der Cornealreflex und der Flexorreflex an der Zwischenzehnhaut herangezogen. Bei zufriedenstellender Narkosetiefe waren beide Reflexe nicht auslösbar. Eventuelle Nachdosierungen beider Mischungen während der Operation wurden i.m. vorgenommen. Die Narkose mit Mischung A wurde frühestens 40 Minuten nach der letzten Narkoseinjektion mit Atipamezol (1,0 mg/kg KM intramuskulär, i.m.) teilantagonisiert.

Implantation

Die Operation wurde auf einer mit Zellstoff gepolsterten Wärmematte durchgeführt. Um das Austrocknen der *Corneae* zu verhindern, wurde in beide Lidspalten Vidisic®-Augengel eingebracht. Zunächst wurde das Operationsfeld in einem Bereich von 3 cm kranial und 3 cm kaudal des Nabels mit einer Breite von ca. 4 cm geschoren und die haarfreie Zone drei mal mit Cutasept®-Lösung desinfiziert (Einwirkzeit eine Minute). Vom *Umbilicus* beginnend erfolgte die Inzision der Haut nach kaudal. Das Unterhautgewebe wurde stumpf von der Bauchmuskulatur gelöst und anschließend die Bauchhöhle entlang der *Linea alba* mittels Stichinzision eröffnet. Mit einer Schere nach Metzenbaum wurden die Wundränder vorsichtig erweitert und der Sender durch die Öffnung in die Peritonealhöhle eingebracht. Im Anschluss wurde die Wunde in zwei Schichten

verschlossen, wobei die Muskulatur fortlaufend und mit resorbierbarem Nahtmaterial, die Haut mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial in Einzelheften vernäht wurde.

Nachsorge

In der Aufwachphase diente eine Wärmematte zur Vermeidung eines starken Absinkens der Körpertemperatur der Tiere. Eine weitere Injektion mit Meloxicam wurde 24 Stunden *post operationem* ebenfalls s.c. verabreicht, wobei die Dosis auf 1 mg/kg herabgesetzt wurde. Die Beurteilung des Genesungsfortschritts und des Allgemeinbefindens der Tiere erfolgte täglich auf Grundlage der Untersuchung der Operationsnaht, von Verhaltensbeobachtungen sowie der Kontrolle der Futter- und Wasseraufnahme und der Körpermasse.

2.4.2. Intracerebroventrikuläre Implantation der Leitkanüle

Narkose

Es wurde eine Injektionsnarkose analog zur Implantation der Radiotransmitter durchgeführt.

Implantation

Zur Vorbereitung des Operationsfeldes wurden die Haare im Bereich vom lateralen Augenwinkel bis zum Nackenansatz geschoren. Für alle folgenden Manipulationen wurde das Tier auf einer konstant temperierten Wärmematte (37°C) platziert, um das Absinken der Körpertemperatur unter der Operation einzudämmen und Vidisic®-Augengel zum feucht halten der *Corneae* aufgetragen. Die Narkosetiefe wurde in regelmäßigen Abständen durch Auslösen des Flexorreflexes überprüft und über die Gesamtdauer der Operation wurden dem Tier 4 ml sterile Kochsalzlösung s.c. injiziert, um das Flüssigkeitsdefizit einzudämmen. Um den Kopf im Stereotakter zu fixieren, wurden zwei schlank zulaufende metallische Stifte mit abgerundeten Spitzen („ear bars“, Abb. 17) an beide Seiten seitlich in den Gehörgang eingeführt, die *Meati acustici externi* palpatorisch aufgesucht und die Stäbe anschließend an ihre Positionierung am Stereotakter fest geschraubt. Als weiterer Fixationspunkt diente das Auflegen der Schneidezähne auf eine höhenverstellbare Stütze, wobei der Oberkiefer in dieser Position über einen gepolsterten Nasenbügel gehalten wurde. Auf diese Weise wurde horizontales oder vertikales Ausweichen des Schädels während der Manipulationen verhindert und seine zentrale Lage im Stereotakter sichergestellt. Im Anschluss an die Desinfektion des Operationsfeldes mit Cutasept®-Lösung wurde die Haut über der Medianen auf einer Länge von 2 cm eröffnet und die Schädeldecke durch stumpfe Präparation freigelegt. Zum lateralen Spreizen der Wundränder wurden zwei beschwerte Häkchen an diesen befestigt. Nach Ablösen des Periost mit einem Skalpell wurde der freiliegende Schädel durch Benetzung mit 30 % -igem Wasserstoffperoxyd (H₂O₂) desinfiziert und lokal gebleicht, außerdem konnten auftretende Blutungen auf diese Weise gestillt und das Operationsfeld somit übersichtlich gehalten werden. Aufgrund des Bleichereffekts waren außerdem die Kreuzungspunkte der bindegewebigen Knochennähte besser darstellbar. Zur Ausrichtung der Leitkanüle mittels Mikromanipulatoren (Anterior-, Lateral- und Tiefenkoordinate) wurde die Kreuzung der *Suturæ interfrontalis*, *sagittalis* und *coronalis* (*Bregma*, Abb. 17) aufgesucht, um anhand dessen die Koordinaten für die Position der Kanüle über dem lateralen Ventrikel (Abb. 18) festlegen zu können. Diese basierten auf den topographischen Daten des stereotaktischen Gehirnatlas für Ratten (Paxinos & Watson, 1998). Dafür wurde zunächst die Leitkanüle, die über ein Halterungssystem am Stativ des Stereotakters befestigt war, mittels Mikromanipulatoren auf die exakten Koordinaten des *Bregma* eingestellt. Ausgehend von diesem Punkt wurde die Kanüle um 1,5 mm nach lateral (rechts) und 0,8 mm nach kaudal verschoben und der entsprechende Punkt auf der Knochenplatte markiert (Abb. 17). An dieser Stelle wurde mit Hilfe

eines Dentalbohrers ein Loch von ca. 2 mm Durchmesser in den Schädelknochen bis auf die *Dura mater* gebohrt. Für die spätere Fixierung der Kanüle wurden drei weitere Löcher in den Schädelknochen gebohrt, die idealerweise auf drei verschiedenen Knochenplatten platziert sein sollten. In diese vorgebohrten Löcher wurden Knochenschrauben gesetzt und mit dem Schädelknochen fest verschraubt. Anschließend wurde das Operationsfeld mit steriler Kochsalzlösung von Knochenmehl gereinigt, die *Dura mater* im Bereich des Bohrlochs mit einer Einwegkanüle (Ø 0,45 x 12 mm, 26 G;) eröffnet und die Leitkanüle langsam auf den eröffneten Bereich abgesenkt, bis sie den Schädelknochen berührte. Zur sicheren Befestigung wurden die Leitkanüle und die drei Schrauben mit Dentalzement aneinander und am Schädelknochen verankert, anschließend der Kanülenhalter am Stativ vorsichtig abgehoben und die Leitkanüle mit einem Mandrin (Dummy Cannula) verschlossen (Abb. 18).

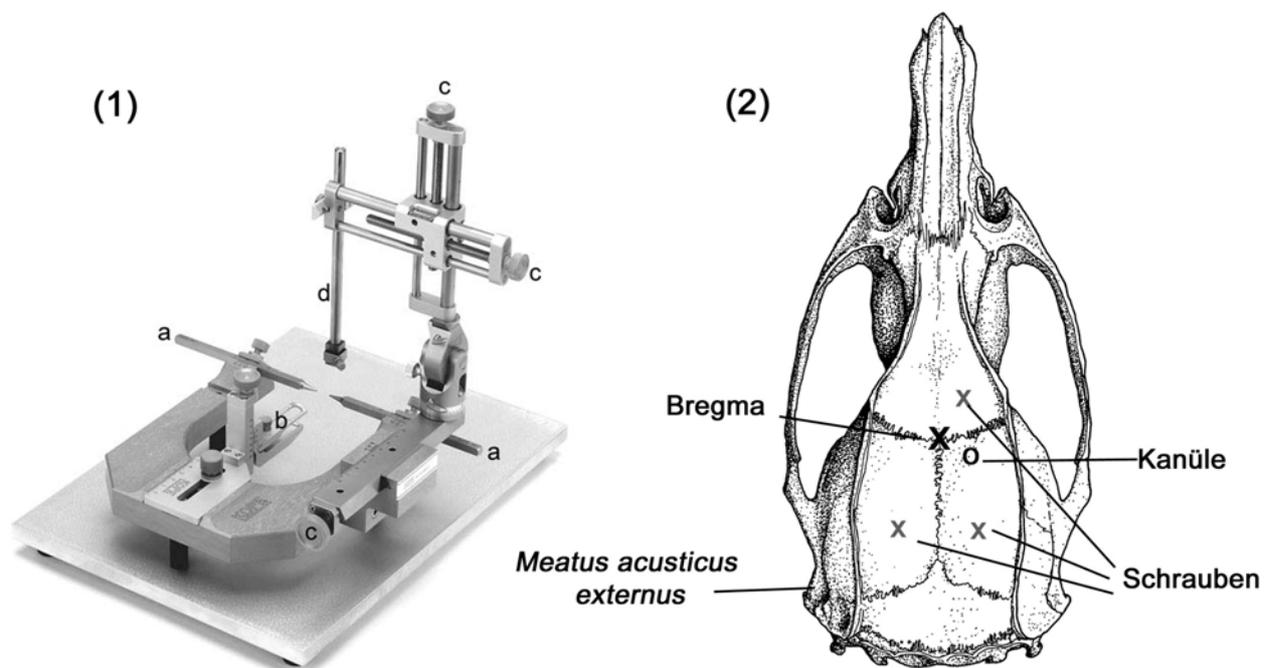


Abb. 17: Stereotaktische Apparatur nach Kopf und Positionierung der Leitkanüle am Rattenschädel

(1): (a) „ear bars“ zur Fixation des Schädels, (b) höhenverstellbare Stütze, (c) Mikromanipulatoren zum Einstellen der Anterior-, Lateral- und Tiefenkoordinate, (d) Stativ mit Kanülenhalterung zur Fixation der Leitkanüle. (2) Der *Meatus acusticus externus* diente links und rechts als Fixationspunkt durch die „ear bars“. Vom *Bregma* aus wurde der Punkt auf der Knochenplatte ausgemessen, an dem die Leitkanüle implantiert werden sollte (Kreis). Die mögliche Platzierung der Knochenschrauben ist durch Kreuze gekennzeichnet. Modifiziert nach Paxinos & Watson (1998).

Nachsorge

Es wurde ebenso verfahren wie nach den Operationen zur alleinigen intraperitonealen Senderimplantation, allerdings wurde die volle Dosis Meloxicam (2 mg/kg KM) über zwei weitere Tage im Anschluss an die Operation verabreicht.

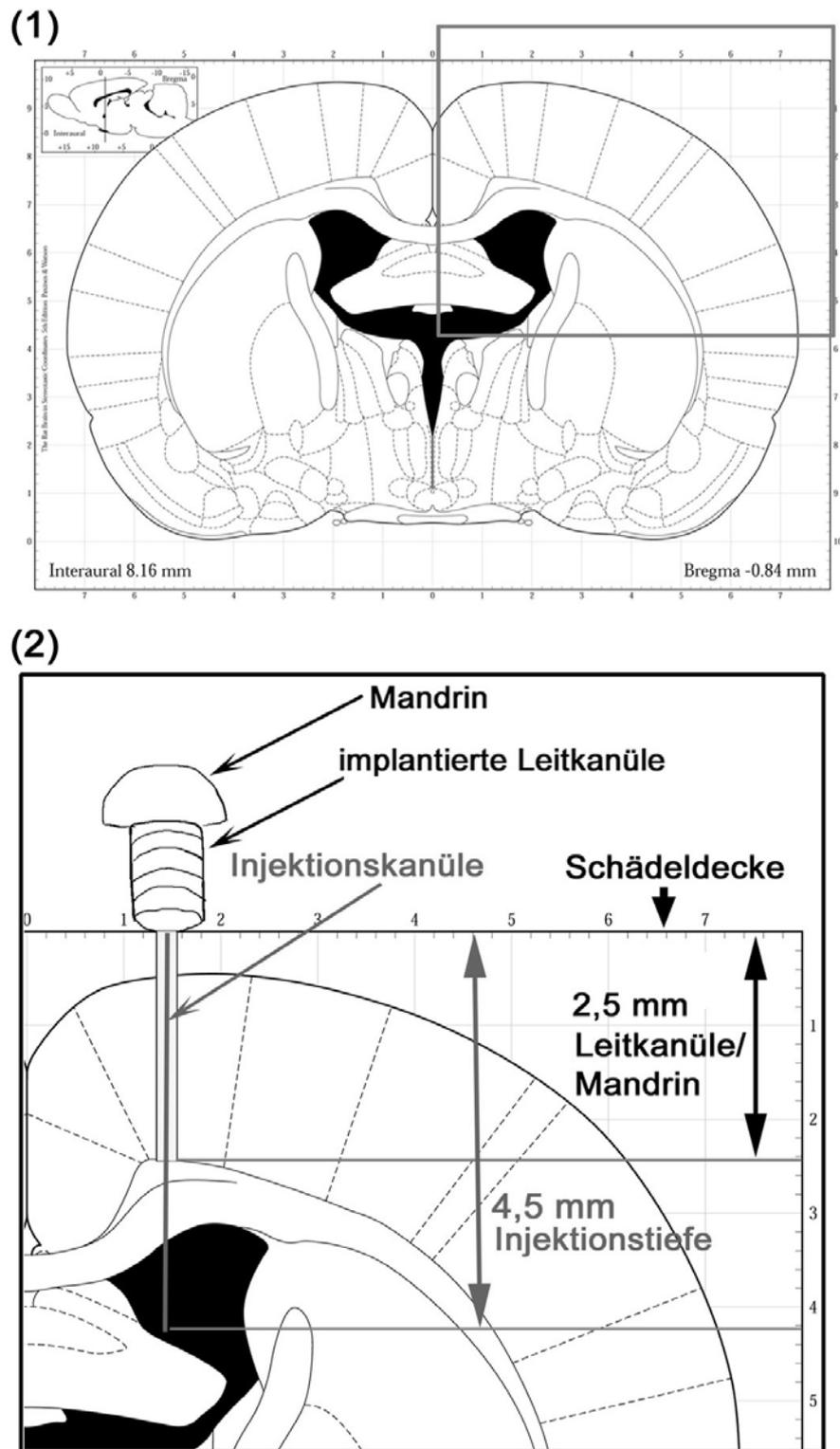


Abb. 18: Positionierung von Leitkanüle, Mandrin und Injektionskanüle im Querschnitt

(1) coronaler Schnitt durch das Gehirn der Ratte auf Ebene der implantierten Kanüle (Bregma -0,84 mm). Der umrandete Bereich wird in (2) vergrößert dargestellt. (2) Die Leitkanüle reicht von der Schädeldecke aus 2,5 mm ins Hirngewebe, der Mandrin als vorübergehender Verschluss erreicht mit ebenfalls 2,5 mm noch nicht den Ventrikel, so dass dieser bis zur Injektion (Injektionstiefe 4,5 mm) nicht eröffnet wird. Modifiziert nach Paxinos & Watson (1998).

2.5. Injektionen

2.5.1. Intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid

Die Injektionsdosis betrug 100 µg/kg bzw. 1 mg/kg KM (Lösungen siehe S. 66), die erforderliche Menge wurde mit einer sterilen Einwegspritze aufgezogen und mit pyrogenfreiem PBS (Phosphate-Buffered Saline) aufgefüllt, um ein Injektionsvolumen von 1 ml zu erreichen, welches je zur Hälfte beidseitig der Medianen in die *Regio umbilicalis* injiziert wurde. Tieren der Kontrollgruppe wurde auf die gleiche Weise ein entsprechendes Volumen an pyrogenfreiem PBS verabreicht (Abb. 15). Alle intraperitonealen Injektionen erfolgten zwischen 9:00 und 11:30 in der Hellphase des Beleuchtungszyklus. (Siehe auch Abb. 16)

2.5.2. Intracerebroventrikuläre Injektionen

Alle i.c.v. Injektionen wurden zu Beginn der Hellphase zwischen 8:00 und 9:00 Uhr am wachen Tier über einen Zeitraum von mindestens 2 Minuten durchgeführt, um ein möglichst schonendes Einbringen des Volumens in den Ventrikel zu gewährleisten und eventuell auftretende Reaktionen des Tieres direkt dokumentieren zu können. Dazu wurde der Mandrin der Leitkanüle abgeschraubt und die Injektionskanüle so weit wie möglich eingeführt, wobei bei der ersten Injektion der Ventrikel erstmalig eröffnet wurde (Abb. 18). Im Anschluss an die Injektion wurde der Mandrin wieder verschlossen. Durch vorheriges Training war es möglich, die Injektionen im Käfig am frei beweglichen Tier durchzuführen, ohne es in die Hand nehmen zu müssen.

Vorbereitung

Ein transparenter Polypropylenschlauch mit aufgesteckter i.c.v. Injektionskanüle wurde nach Desinfektion in 70 % igem Ethanol über Nacht und mehrmaligem Spülen mit pyrogenfreier, 0,9 % iger Kochsalzlösung blasenfrei mit dieser gefüllt und anschließend eine kleine Luftblase aufgezogen. Diese grenzte die zu injizierende Lösung, von der 5 - 10 µl ebenfalls blasenfrei aufgezo- gen wurden, gegen die Kochsalzlösung ab. Über Markierungen am Schlauch konnte die Bewegung der Luftblase während der Injektion beobachtet und damit die Durchgängigkeit des Systems visuell kontrolliert werden.

AT II I Trinktest

Zwei Tage vor der geplanten Injektion und frühestens 7 Tage *post operationem* (Abb. 16) wurde in der zweiten Teilstudie ein Angiotensin-II- (AT II) Trinktest durchgeführt, um den korrekten Sitz der Kanüle zu überprüfen. Dazu wurden 2 µl einer Lösung aus 25 ng/µl humanem Angiotensin-II in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) injiziert. Die stark dipsogene Wirkung des AT II bewirkte bei richtigem Sitz der Kanüle eine schnelle Trinkantwort, die in der Regel innerhalb der ersten 5 Minuten im Anschluss an die Injektion auftrat und über das Waagensystem (S. 78) direkt abgelesen werden konnte. Tiere, die eine spontane Wasseraufnahme von weniger als 8 g innerhalb der ersten 10 Minuten zeigten, wurden am Folgetag erneut getestet und nach zweimaligem negativen Testergebnis vom Versuch ausgeschlossen, da dies auf eine inkorrekte Platzierung der Kanüle hindeutete. Dies kam allerdings nur einmalig vor.

Injektion von AG490

Die Injektion von jeweils 2 µl der AG490-Gebrauchslösung (S. 66) erfolgte nach oben beschriebener Methode jeweils eine Stunde vor der intraperitonealen Injektion. Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen des Lösungsmittels (Cremophor) allein. (Siehe auch Abb. 15)

Injektion von siRNA

Die siRNAs wurde in der vom Hersteller als „siSTABLE“ bezeichneten, speziell für *in vivo* Versuche modifizierten Form eingesetzt (siehe auch Auflistung verwendeter siRNA, S. 65). Zur Herstellung der Trägerlösung wurde das Transfektionsreagenz jetSI™, eine Mischung kationischer Lipide, nach dem vom Hersteller gelieferten Protokoll verwendet (<http://www.polyplus-transfection.com/>). Alle Schritte der Herstellung wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zunächst wurde aus jetSI™ und L- α -Dioleoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (DOPE, fusogenes Lipid) eine Basislösung A hergestellt (S. 66). Am Injektionstag wurde die benötigte Menge der Lösung B und C entsprechend dem Protokoll frisch angesetzt (S. 66). Lösung C diente nach 10 - 30 minütiger Inkubation bei RT letztendlich als Lösungsmittel („vehicle“) für die verschiedenen siRNA Gebrauchslösungen (360 pmol/ μ l). Die fertige Injektionslösung (S.66) enthielt 2,5 μ g/ μ l RNA bei einer Endkonzentration von 5 % Glucose und konnte nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei RT verwendet werden. Die Injektionen erfolgten innerhalb der folgenden 30 Minuten, da die Inkubationszeit der Injektionslösung laut Herstellerangaben zwischen 30 und 60 Minuten liegen sollte. Anhand dieser Vorgehensweise erhielt letztlich jedes Tier 5 μ g bzw. 360 pmol der jeweiligen siRNA in insgesamt 2 μ l der Trägerlösung. Zur einmaligen Überprüfung des Transfektionserfolges wurde mit leichter Abwandlung entsprechend früheren Studien (Niizuma et al., 2008) einem Tier das gleiche Volumen einer ebenso aufbereiteten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten RNA verabreicht, deren Verteilungsmuster im Gehirn nach 24 Stunden am Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden konnte. Das Volumen der jeweiligen Injektionslösung (siRNA oder „vehicle“, S.66) wurde auf die oben beschriebene Weise in den Ventrikel eingebracht.

II.B. Erfassung physiologischer Daten

1. Telemetrie

1.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Futterbehälter		institutseigene Herstellung
Messkäfig mit Deckel	30 x 24 x 22,5 cm (L x H x B)	W. G. Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim
Waagschale für Tiere		institutseigene Herstellung
Handelsübliche Wasserflaschen für Kleintiere mit speziellem Tränkenippel		Accuscan Instruments, Columbus, OH, USA

1.2. Versuchsbedingungen

Die telemetrischen Untersuchungen fanden in einer Klimakammer statt. Einstreu und Umweltbedingungen wurden entsprechend der Aufzuchtphase angepasst. Die Temperatur wurde auf $25 \pm 1^\circ \text{C}$ eingestellt und der hell / dunkel Rhythmus beibehalten, so dass nur eine kurze Umgewöhnungs- und Anpassungsphase notwendig war. Eine konstante Einstellung der relativen Luftfeuchte bei 50% wurde ebenfalls vorgenommen. Während aller telemetrischen Aufzeichnungen wurden die Tiere einzeln in speziellen Messkäfigen (30 x 22,5 x 24 cm; L x H B) aus transparentem Plexiglas gehalten. Die Käfige waren jeweils neben einem abnehmbaren, belüfteten Deckel mit einem verschließbaren Übergang durch die Seitenwand ausgestattet, über den das auf einer Waage platzierte Futter jederzeit erreicht werden konnte. Um die Futteraufnahme präzise bestimmen zu können, wurden die analog in der Zucht verwendeten Futter-Pellets für die Dauer des Versuchs in pulverisierter Form angeboten. Das ebenfalls *ad libitum* zur Verfügung gestellte Wasser war für die Tiere über eine Nippeltränke, die mittels eines Schlauchs mit der ebenfalls auf einer Waage platzierten Wasserflasche verbunden war, erreichbar. Die Tiere wurden einen Tag vor der geplanten Operation zur Gewöhnung in die Klimakammer verbracht und in die Messkäfige umgesetzt. Bis zum Zeitpunkt der Injektionen wurden sie täglich zwischen 8:00 und 9:00 Uhr gewogen und an die Fixation in der Hand gewöhnt, um zum Einen die notwendigen Nachsorgeuntersuchungen im Anschluss an die Operation durchführen zu können und zum Anderen den Stress am Tag der Injektion auf ein Minimum zu reduzieren. Tiere mit implantierter Leitkanüle, die außerdem für i.c.v. Injektionen vorgesehen waren, wurden zusätzlich an das Auf- und Zuschrauben des Mandrins und andere Manipulationen an der implantierten Kanüle gewöhnt. So konnte gewährleistet werden, dass die Tiere am Versuchstag die erforderlichen Maßnahmen während des eingeplanten Injektionszeitraums tolerierten.

1.3. Messung von Körpertemperatur und lokomotorischer Aktivität

Zur stressfreien Aufzeichnung der intraabdominalen Körpertemperatur sowie der lokomotorischen Aktivität der Versuchstiere wurden 8 Tage vor Versuchsbeginn telemetrische Sender (Radiotransmitter, Abb. 19) des Typs VM-FH TR-3000 oder T-4000 E-Mitter® intraperitoneal implantiert. Das Prinzip dieser Art der Temperaturerfassung beruht auf einem wärmeempfindlichen Transistor mit negativem Temperaturkoeffizienten (NTC), der proportional zur Temperaturänderung ein Radiofre-

quenzsignal (Hz) verändert. Steigende Impulsraten zeigen hierbei Temperaturerhöhung, sinkende Impulsraten Temperatureniedrigung an; basierend auf den Referenzfrequenzen für $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und $41,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Eine unter dem Messkäfig positionierte Empfängerplatte dient zur Registrierung der Signale, die dann mittels eines Datenübertragungssystems aufgezeichnet werden können (Abb. 20). Gleichzeitig wird in diesem System die lokomotorische Aktivität der Tiere erfasst. Ein zu diesem Zweck im Sender enthaltenes Trägheitselement generiert Signale, die in Abhängigkeit von seiner Entfernung und Ausrichtung zum Empfänger in ihrer Stärke variieren. Von der Platte registrierte Änderungen der Signalstärke korrelieren somit mit der lokomotorischen Aktivität der Tiere und werden als „activity counts“ in einem festgelegten Zeitintervall (in diesem Fall 5 Minuten) erfasst (Harkin et al., 2002).

Während der Sender des Typs TR-3000 mit einer Knopfzelle versorgt wird, erfolgt die Energieversorgung im Modell T-4000 mittels Induktion durch eine Kupferspirale. Aufgrund der Notwendigkeit regelmäßiger Batteriewechsel besteht der TR-3000 aus zwei ineinander gesteckten Polyethylenzylindern, welche vor der Implantation in Paraffin eingebettet worden waren, um die Elektronik des Senders nach Implantation vor peritonealer Flüssigkeit zu schützen und Irritationen in der Peritonealhöhle aufgrund einer rauen Oberfläche zu minimieren. Die mittels passender Empfängerplatten (RA-100 für Sender TR-3000; ER-4000 Receiver für Sender TR-4000) im 5-Minuten-Abstand empfangenen Daten wurden an einen Computer übermittelt und mit dem Programm Vital-View® aufgezeichnet. Bereits einige Tage vor Versuchsbeginn wurde das System gestartet, um zum Einen die ordnungsgemäße Funktion der Sender zu überprüfen und zum Anderen für alle Tiere Basalwerte zu ermitteln.



Abb. 19: Telemetrischer Sender (Typ T-4000 E-Mitter®)

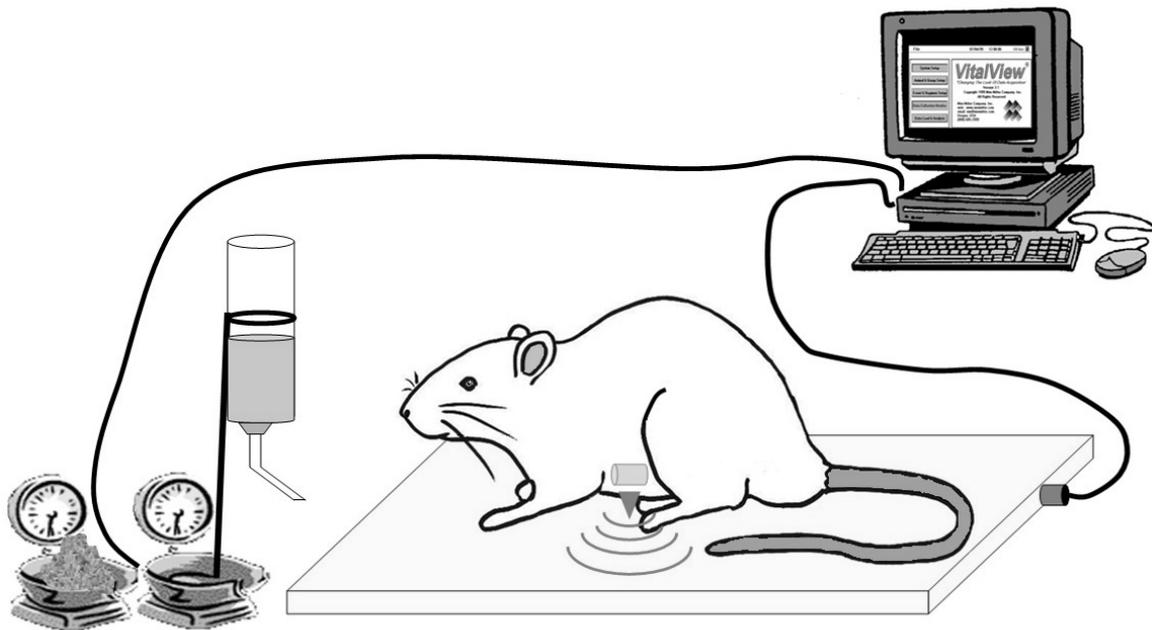


Abb. 20: Versuchsaufbau für telemetrische Messungen

Die Temperatur- und Aktivitätsdaten des intraperitoneal implantierten Radiotransmitters werden auf die Empfängerplatte übertragen und die entsprechenden Daten mit der geeigneten Software aufgezeichnet. Futter- und Wasseraufnahme werden über ein Waagensystem erfasst und ebenfalls an den Computer übermittelt.

1.4. Messung von Futter- und Wasseraufnahme

Zusätzlich zur Aufzeichnung der Körpertemperatur und Aktivität wurde die tägliche Futter- und Wasseraufnahme der Tiere erfasst. Dies ermöglichte der Aufbau der Messkäfige, der die Platzierung von Futterschale und Wasserflasche auf einer Waage vorsah (Abb. 20). Die alle fünf Minuten erhobenen Daten der Waagen wurden an einen Dataport übermittelt und mittels der Programme AccuDiet oder Dietmax sowohl als Einzelereignisse als auch als kumulative Werte aufgezeichnet.

1.5. Auswertung und Statistik

Körperkerntemperatur

Die Daten zur abdominalen Körpertemperatur wurden jeweils über einen Zeitraum von $t = -120$ Minuten bis zum jeweiligen Ende des Versuchszeitraums aufgezeichnet. Zur graphischen Darstellung der verschiedenen Gruppen im Zeitverlauf wurden die Mittelwerte mit Standardfehler von 15 Minuten Intervallen herangezogen (Excel®, Prism®). Für den statistischen Vergleich der LPS-stimulierten Gruppen mit den jeweiligen Kontrollen wurde mit Hilfe der Programme SigmaStat bzw. Stat View® eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen durchgeführt, der sich ein post-hoc Test nach Bonferroni anschloss.

Zum Teil wurde außerdem die Stärke der Fieberreaktionen anhand des Fieberindex beurteilt. Dieser wurde aus der Integration der Fläche unterhalb der Fieberkurve auf Basis einer zuvor ermittelten, durchschnittlichen Basaltemperatur berechnet (Abb. 21). Die Basaltemperatur ergab sich in der vorliegenden Arbeit aus den gemittelten Temperaturwerten der zwei Stunden vor der LPS-Injektion. Die berechneten Flächen (Excel®) wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben und graphisch dargestellt. Zur statistischen Beurteilung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit nachfolgendem Newman-Keuls post-hoc Test durchgeführt (Prism®). Statistisch signifikante Unter-

schiede wurden für alle Temperatureauswertungen an einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgemacht.

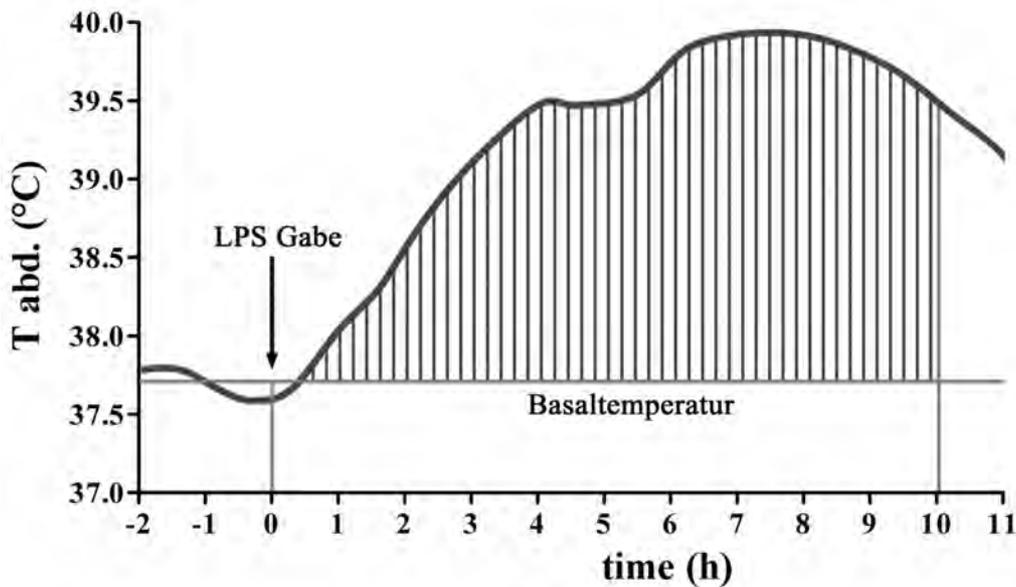


Abb. 21: Berechnung des Fieberindex

Die Berechnung erfolgt auf Basis der Basaltemperatur (horizontale Linie). Diese ergibt sich aus der mittleren Temperatur innerhalb der 2 h vor der Injektion. Der Fieberindex über einen Zeitraum von 10 h wird aus dem Integral der schraffierten Fläche gebildet und kann damit als Maß für die Stärke des Fiebers angesehen werden.

Lokomotorische Aktivität

Die Darstellung der lokomotorischen Aktivität erfolgte auf Basis kumulativer Werte: Die alle 5 Minuten aufgezeichneten „counts“ (Kap. II.B, 1.3) wurden für jedes Tier vom Punkt $t = 0$ (Injektionszeitpunkt, i.p.) bis zum Versuchsende zusammengezählt und diese Werte innerhalb der Gruppen wiederum als Mittelwert mit Standardfehler für den Vergleich mit den anderen Gruppen genutzt. Bei 24 Stunden dauernden Versuchen wurden auf gleichem Wege außerdem die kumulative Aktivität in der Hell- und in der Dunkelphase des Versuchstages berechnet (Excel®), da die Nacht die eigentliche aktive Phase der Tiere darstellt. Unterschiede wurden mit Hilfe des Programms Prism® statistisch berechnet, wobei für die Analyse von lediglich zwei Gruppen ein parametrischer t-Test, für mehrere Gruppen eine einfaktorielles ANOVA mit nachfolgendem Newman-Keuls post-hoc Test durchgeführt wurde. Für signifikante Unterschiede wurde wiederum eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ vorausgesetzt.

Futter- und Wasseraufnahme

Die insgesamt aufgenommenen Futter- bzw. Wassermengen innerhalb des jeweiligen Versuchszeitraums wurden für jede Versuchsgruppe gemittelt und die verschiedenen Gruppen untereinander verglichen. Für Versuchszeiträume von 24 Stunden wurde zusätzlich zwischen in der Hell- und in der Dunkelphase aufgenommenem Futter und Wasser unterschieden, denn aufgrund der Nachtaktivität der Tiere waren im Allgemeinen größere Unterschiede in dieser Versuchsphase als tagsüber zu erwarten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen wurden wiederum anhand des parametrischen t-Tests (zwei Gruppen) bzw. einer einfaktorielles ANOVA mit anschließendem post-hoc Test nach Newman-Keuls ermittelt (Prism®) und $p < 0,05$ als signifikant festgelegt.

2. Entwicklung der Körpermasse

Für die Beurteilung der Körpermassenentwicklung der Tiere im Versuchszeitraum wurden diese täglich zwischen 8:00 und 9:00 Uhr gewogen und die jeweilige Körpermasse dokumentiert. Vom Zeitpunkt der Operation an konnte so ein Verlauf der Körpermassenentwicklung dargestellt werden, welcher zum Einen die normale Weiterentwicklung der noch im Wachstum befindlichen Tiere im Anschluss an die Operationen dokumentierte, und zum Anderen Aufschluss über den Einfluss der applizierten Substanzen auf die Körpermasse erlaubte.

2.1. Auswertung und Statistik

Die Entwicklung der Körpermasse unter den jeweiligen Versuchsbedingungen wurde unter zwei Gesichtspunkten bewertet: Zum Einen wurde für jede Gruppe die im Versuchszeitraum erfolgte Zu- oder Abnahme als absolute Werte (Mittelwert mit Standardfehler) ermittelt, zum Anderen wurden die Veränderungen der Ausgangsmasse prozentual, bezogen auf die ursprüngliche Körpermasse am Morgen des Versuchstages berechnet (Excel®) und diese Werte gemittelt und mit Standardfehler dargestellt. Bei Unterschieden mit $p < 0,05$ wurde auch hier nach einem parametrischen t-Test (zwei Gruppen) bzw. einer einfaktoriellen ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc Test (mehrere Gruppen) von statistischer Signifikanz der beobachteten Unterschiede ausgegangen (Prism®).

II.C. Erfassung biochemischer Parameter

1. Immunzytochemie / Immunhistochemie

1.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Alufolie		Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläschen	24 x 50mm und 24 x 60 mm, Stärke 1	Menzel GmbH, Braunschweig
Einwegkanülen Sterican®	0,9 x 40 mm, 0,45 x 12 mm und 0,4 x 20 mm	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegspritzen	1-, 5 ml	BD Plastipak, Becton-Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter 604	1/2 (Ø 240 mm)	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Fettstift	Pap-Pen	G. Kisker, Steinfurt
Inkubationskästen mit Deckel	20 x 30 x 5 cm	Biochem Instrumente GmbH, Weilburg
Klebeband	Silkafix® 2,5 cm x 9,2 m	Lohmann Rauscher International GmbH & Co.KG, Rengsdorf
Multi-Wellplatten	12-fach	MAGV, Rabenau
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH, Braunschweig
Objektträgermappen	für 20 Objektträger	LAT-Labor- und Analysen-Technik GmbH, Garbsen
Parafilm®		Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Indikatorpapier		Merck, Darmstadt
Pinsel	Rotmarderhaar	Renensis, Flensburg
Rasierklingen	752/1/SS	Campden Instruments Limited, Loughborough, UK
Reaktionsgefäße	0,5-; 1,5-; 2- und 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
serologische Pipetten	1-, 5-, 10- und 25ml	Sarstedt, Nümbrecht

Chemikalien

Bezeichnung:	Hersteller:
4'6 – Diamidin – 2'Phenylindol Dilaktat (DAPI; Anregungswellenlänge 359 nm)	MoBiTec, Göttingen
Citifluor® (Glycerol in PBS- Lösung)	Cityfluor LTD, London, UK
Di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Ethanol, unvergällt	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Schmidt, Dillenburg
Immersionsöl (Refraktionsindex 1,51)	Olympus Optical, Hamburg
Kalibrierlösung für pH-Meter: Qualilab Pufferlösung pH 6,8 und 9,27	Kleinfeld Labortechnik, Hannover
Lipopolysaccharid aus <i>E. coli</i> ; Serotyp O111:B4	cat.: L-2630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Normal donkey serum (NDS)	PAA, Pasching, Österreich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt

Bezeichnung:	Hersteller:
Phosphate-Buffered Saline Tablets (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
Tissue Freezing Medium®	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Triton-X-100 (t-Octylphenoxyethyl-Ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Lösungen und Puffer

Bezeichnung:	Zusammensetzung/Herstellung:
0,2 M Na ₂ HPO ₄ - Lösung (Stocklösung A)	27,6 g Na ₂ HPO ₄ (137,99 g/mol) in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
0,2 M NaH ₂ PO ₄ - Lösung (Stocklösung B)	35,6 g NaH ₂ PO ₄ (177,9 g/mol) in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
DAPI - Inkubationslösung	DAPI 1:1000 in PBS
Inkubationspuffer für Immunzytochemie (Block-Lösung)	10 % FKS in PBS - T
Inkubationspuffer für Immunhistochemie (mit Triton-X-100) (Block-Lösung)	10% NDS in PBS; Zugabe von 0,1 - 0,3% Triton-X-100 (siehe Tab. 1)
Inkubationspuffer für Immunhistochemie (ohne Triton-X-100) (Block-Lösung)	10% NDS in PBS
Paraformaldehyd - Lösung (PFA); 20 % (Stocklösung)	Ansatz von PFA (Pulverform) in <i>Aqua bidest.</i> , unter Rühren bei 65°C, Zugabe von wenigen Tropfen 1 N NaOH bis zur Klärung der Lösung; Filtration mit Faltenfilter (Ø 240mm); abkühlen lassen auf Eis
Paraformaldehyd - Lösung (PFA); 2 %	Ansatz aus PFA-Stocklösung in PBS (1:10)
Paraformaldehyd- Lösung (PFA); 4 %	Ansatz von PFA (Pulverform) in PBS, unter Rühren bei 60°C; Filtration mit Faltenfilter (Ø 240mm); abkühlen lassen auf Eis
PBS (Phosphatpuffer), pH 7,2 - 7,4, 0,1 M	28 % Stocklösung A + 72 % Stocklösung B in <i>Aqua bidest.</i>
PBS (instant), pH 7,2 - 7,4	Ansatz aus PBS tablets in <i>Aqua bidest.</i> (1 Tablette/ 200 ml)
PBS - T (für Immunzytochemie)	PBS unter Zugabe von 0,05 % Triton-X-100
Physiologische NaCl - Lösung, 0,9 %	0,9 % NaCl in <i>Aqua bidest.</i>

Medikamente

Handelsname:	Wirkstoff:	Hersteller:
Narcoren®	Pentobarbital - Natrium	Merial, Hallbergmos

1.2. Grundlagen der Methode

Das Prinzip der Methode beruht auf spezifischen Antikörpern, deren Paratope mit den Epitopen zu detektierender Antigene interagieren, wobei durch die Sichtbarmachung der entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe das Vorhandensein bzw. die Lokalisation des Antigens dargestellt werden kann. Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper gehörten der Hauptklasse IgG an und waren zumeist polyklonal.

Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch indirekte Immunfluoreszenz (Coons, 1958). Dabei dient ein sekundärer, mit einem Fluorochrom markierter Antikörper der Detektion der primären Komplexe. Dieser richtet sich gegen das Fc-Fragment der Wirtsspezies des primären Antikörpers (Abb. 22). Die Sichtbarmachung erfolgt letztendlich durch Anregung des an den Antikörper gekoppelten, fluoreszierenden Farbstoffs mit einer geeigneten Wellenlänge mit Hilfe eines mit den entsprechenden Anregungsfiltern ausgestatteten Fluoreszenz-

mikroskops (Anregungswellenlängen der Sekundärantikörper, siehe Tab. 3). Infolge dieser Anregung emittieren die Fluorochrome längerwelliges Fluoreszenzlicht (Emissionswellenlänge), welches nach Passieren des Sperrfilters sichtbar wird. Zusätzlich zur doppelten Markierung durch verschiedene Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellkerne mit Hilfe einer DAPI-Kernfärbung sichtbar gemacht. Diese Färbung beruht auf der selektiven Bindung des Farbstoffes an DNA, so dass durch die Entstehung von DNA-DAPI Komplexen unspezifisch alle Zellkerne angefärbt werden (Anregungswellenlänge DAPI S. 81).

Die Methode bietet neben der Möglichkeit von Mehrfachmarkierungen den entscheidenden Vorteil einer hohen Sensitivität, verbunden mit einer geringen Hintergrundfärbung. Allerdings ist die Haltbarkeit der Schnitte aufgrund des Ausbleichens der Farbstoffe insbesondere bei Anregung im UV-Bereich zeitlich begrenzt.

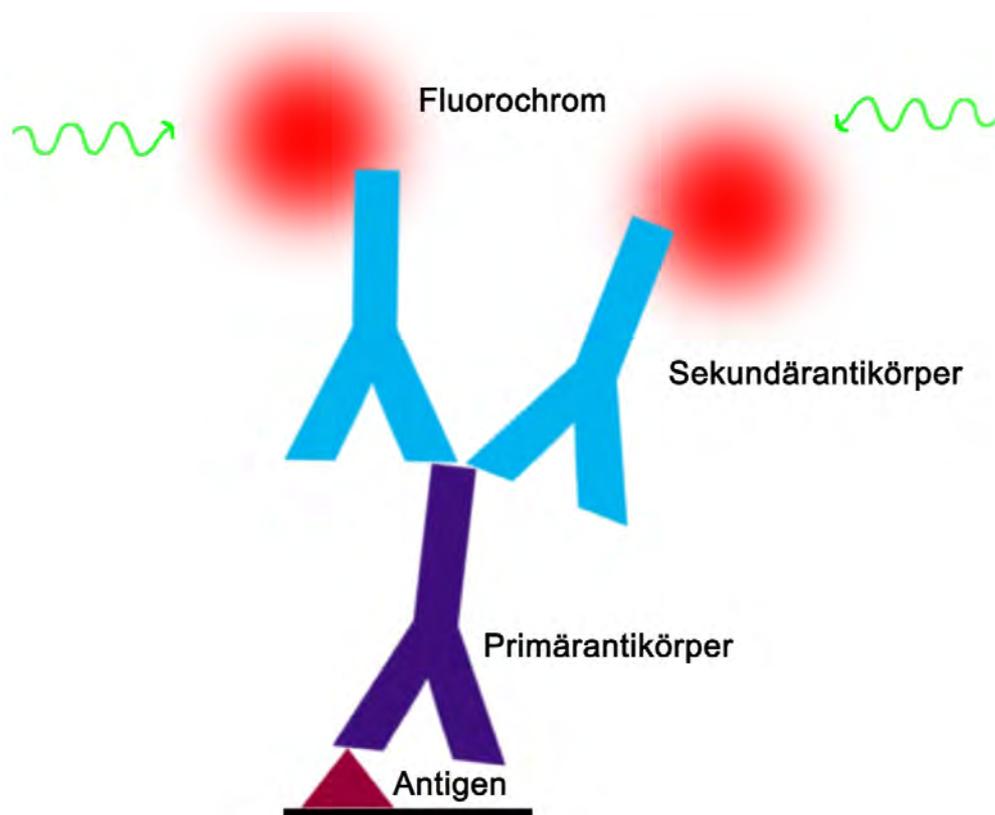


Abb. 22: Schematische Darstellung der Immundetektion durch indirekte Immunfluoreszenz (Indirekte Zwei-Schritt-Methode)

Ein primärer Antikörper bindet spezifisch an das im Gewebe vorliegende Antigen (Protein, Peptid, Polysaccharid, Lipid oder Polynukleotid), bzw. eines seiner Epitope. Mit einem Fluorochrom markierte Sekundärantikörper sind gegen das Fc-Fragment der Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet und binden an diesen. Nach Anregung durch Licht mit der Excitationswellenlänge (grün) emittieren die Fluorochrome Licht einer spezifischen, anderen Wellenlänge (rot, z.B. CyTM3), was fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Modifiziert nach Luttmann et al. (2006).

1.3. Antikörper

Primärantikörper

Nukleäre (NF-IL6, p-NF-IL6, STAT3 p-STAT3, NF-κB) oder perinukleäre Signale (COX2) wurden mittels Antikörpern aus unterschiedlichen Spezies detektiert. Zur gleichzeitigen Markierung verschiedener Zellphänotypen wurden außerdem Antikörper gegen sogenannte spezifische Zellmarkerproteine eingesetzt, deren Verwendung in der Vergangenheit zuverlässige Ergebnisse erbracht hatte (verwendete Kombinationen von Antikörpern zur Doppelmarkierung: siehe Tab. 1). Zur Darstellung von Endothelzellen wurde ein gegen das Protein „von Willebrand Faktor“, vW, gerichteter Antikörper eingesetzt, während in Astrozyten ein zytoplasmatisches Intermediärfilament, das sogenannte „glial fibrillary acidic protein“, GFAP, markiert wurde. Die Antikörper „ED1“ und „ED2“, dienen der Markierung der Oberflächenproteine CD (cluster of differentiation) 68 und CD163, die an den Membranen von aktivierten Mikrogliazellen bzw. perivaskulären Makrophagen vorkommen. Die Gruppe der zur Synthese von Stickstoffmonoxyd befähigten Neuronen wurde über Detektion des Enzyms neuronale NO-Synthase, nNOS, sichtbar gemacht, während andere Neurone über die zwei Subtypen des „microtubule associated protein“ MAP2a und-b markiert wurden. Je zwei Primärantikörper wurden zusammen in einer Inkubationslösung mit Inkubationspuffer angesetzt. Dabei wurden unspezifische Reaktionen aufgrund der Spezies sowie Kreuzreaktionen zwischen den beiden Antikörpern durch Kontrollversuche ausgeschlossen, in denen jeweils einer der zu kombinierenden Antikörper durch das Antiserum nicht-immunisierter Vertreter der Wirtsspezies ersetzt wurde (Tab. 2). Um die Spezifität der beiden NF-IL6 Antikörper zu verifizieren, wurden am Schnitt zusätzliche Negativkontrollen durchgeführt. Schnitte wurden dabei, statt mit der Primärantikörperlösung, mit einer Mischung aus dem Antikörper und dem zu detektierenden Peptid selbst inkubiert (Tab. 2), so dass spezifische Antikörperbindungsstellen durch dieses Antigen abgesättigt wurden und damit zu detektierende Signale nicht mehr in der Immunfluoreszenz nachweisbar waren (Konzentrationsverhältnis IgG : Peptid = 1 : 10). Für andere benutzte Antikörper (STAT3 und NF-κB) lagen entsprechende Ergebnisse analoger Versuche aus vorhergehenden Studien bereits vor (Rummel et al., 2004; Rummel et al., 2006; Voss et al., 2006).

Sekundärantikörper

Die mit verschiedenen Fluorochromen markierten Sekundärantikörper wurden in einer Konzentration von 1 : 500 ebenfalls im jeweiligen Inkubationspuffer angesetzt (Tab. 3).

Antigen:	Spezies, Typ:	Verdünnung/ Anteil Triton X:	Katalog-Nr./ Hersteller:
NF-IL6	goat polyclonal IgG	1:250; 0 %	sc-150-G; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
NF-IL6	rabbit polyclonal IgG	1:5000; 0,3 %	sc-150 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-NF-IL6 (Ser 105)	rabbit polyclonal IgG	1:250; 0,1 %	sc-16994; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-STAT3 (Tyr 705)	mouse polyclonal IgG	1:200; 0,1 %	sc-8059; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
NF-κB	goat polyclonal IgG	1:500	sc-372; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
vW	rabbit polyclonal IgG	1:2000	A 008202, Dako Deutschland GmbH, Hamburg
vW	sheep polyclonal IgG	1:3000	SARTW-IG, Affinity Biologicals, Ancaster, Ontario, Canada
GFAP	mouse polyclonal IgG	1:2000	MAB3402; Millipore, Billerica, MA, USA
CD68	mouse polyclonal IgG	1:1000	MCA341R; AbD Serotec; Oxford, UK
CD163	mouse polyclonal IgG	1:500	MCA342R; AbD Serotec; Oxford, UK
NOS1	rabbit polyclonal IgG	1:500	sc-648; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
COX-2	goat polyclonal IgG	1:2000	sc-1747; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
MAP (2a+2b)	mouse polyclonal IgG	1:600	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US

Tab. 1: Liste der verwendeten Primärantikörper

Spezies:	Protein:	Katalog-Nr./ Hersteller:
rabbit	NF-IL6	sc-150; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
normal rabbit serum	control IgG	sc-2027; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
normal goat serum	control IgG	sc-2028; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
normal mouse serum	control IgG	sc-2025; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Tab. 2: Liste der verwendeten Peptide und Immunsereen

Fluorochrom/ Excitationsmaximum	aus Spezies:	gegen Spezies:	Katalog-Nr./ Hersteller:
Alexa Fluor® 488 (495 nm)	donkey IgG	rabbit	AZA21206, MoBiTec GmbH, Göttingen
		mouse	AZA21202, MoBiTec GmbH, Göttingen
		sheep	AZA11015, MoBiTec GmbH, Göttingen
		goat	AZA11055, MoBiTec GmbH, Göttingen
Alexa Fluor® 350 (346 nm)	goat IgG	mouse	A11045, Molecular Probes, Eugene, USA
Cy™3 (550 nm)	donkey IgG	goat	cat. 705-165-147, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
		rabbit	cat. 711-165-152, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA

Tab. 3: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

1.4. Immunzytochemie

1.4.1. Versuchsprotokoll

Die fixierten Zellen wurden entweder direkt oder innerhalb von 14 Tagen nach Fixation in PFA (4 %) immunzytochemisch untersucht (S. 63). Alle Inkubationsschritte wurden zur Permeabilisierung der Zellen unter Zugabe von 0,05 % Triton-X-100 und nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Arbeitsschritt	Bedingungen/Vorgehen	Dauer
waschen	PBS	3x5 min
blocken	RT, Block-Lösung (10 % FKS)	1 h
Inkubation I: Primärantikörper	4°C, feuchte Kammer in Block-Lösung	36 - 48 h
waschen	PBS-T	3x5 min
Inkubation II: Sekundärantikörper	RT, feuchte Kammer, abgedunkelt	120 min
waschen	PBS-T	3x5 min
Inkubation III: DAPI-Lösung	RT, abgedunkelt	8 min
deckeln	mit Citifluor auf Objektträger, Deckgläschen zuvor kurz in <i>Aqua bidest</i> dippen	

Tab. 4: Protokoll der Immunzytochemie

Die Inkubation in Inkubationspuffer (Block-Lösung) diente dabei der Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Zellen.

1.4.2. Auswertung

Zum Nachweis eines erfolgreichen „knock-down“ der Genexpression durch RNAi wurden nukleäre NF-IL6-Signale durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Zur Diskriminierung der NF-IL6-expri-

mienden Zelltypen wurde eine Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen CD68 für aktivierte Mikroglia, GFAP für Astrozyten oder MAP2a +b für Neuronen vorgenommen. Die Kernfärbung mit DAPI diente zur Verifizierung der nukleären Lokalisation der Signale und zur Erkennung möglicher Zellschädigungen der Kulturen. (Näheres zu Mikroskopie: S.91.) Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte anhand der Dichte und Intensität der NF-IL6-Signale in den Zellkernen, die Effekte der verschiedenen siRNA darauf wurden qualitativ miteinander verglichen.

1.5. Immunhistochemie

Für die Durchführung der Immunhistochemie an Gehirnschnitten der Tiere musste das Gewebe zunächst gewonnen und aufbereitet werden.

1.5.1. Perfusion und Organentnahme

Alle Tiere, deren Gehirne für immunhistochemische Untersuchungen verwendet werden sollten, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 4 und 24 Stunden nach der intraperitonealen Injektion transkardial perfundiert (siehe auch Abb. 16). Hierzu wurden die Tiere zunächst mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®) i.p. in eine tiefe Narkose versetzt und nach Aussetzen des Flexorreflexes an einem Gitter auf der Perfusionswanne in Rückenlage fixiert. Die Bauchhöhle wurde *praeumbilical* eröffnet und der Schnitt bis zum *Diaphragma* und beidseitig entlang des Rippenbogens verlängert. Die letzten Rippen wurden durchtrennt und das *Diaphragma* mit einer Schere vom Rippenbogen abgelöst. Das *Sternum* wurde nach kranial geklappt, um das Herz und die großen Gefäße freizulegen. Nach stumpfem Ablösen des Herzbeutels und im Anschluss an die Blutentnahme aus dem rechten Ventrikel (S. 97) wurde der linken Ventrikel mit einer spitzen Schere eröffnet und die an der Spitze mit einem Stück Polypropylenschlauch versehene Perfusionskanüle durch die Öffnung bis in den Ursprung der Aorta vorgeschoben. Über das Schlauchsystem der Perfusionsanlage stand die Perfusionskanüle über einen Dreiwegehahn mit einer abgedichteten Flasche mit eiskalter, physiologischer Kochsalzlösung in Verbindung, von der 200 - 300 ml mittels eines Pumpensystems mit einem relativ konstanten Druck von 120 mm Hg in den Blutkreislauf des Tieres eingebracht wurden. Ein Schnitt in das rechte Herzohr ermöglichte den Wiederaustritt der Flüssigkeit aus dem Tierkörper, so dass schrittweise das gesamte Blut ausgespült werden konnte. Als Zeichen der vollständigen Entblutung wurden die Blässe der Leber und Lunge herangezogen, die Perfusion wurde beendet, wenn die aus dem Herz austretende Flüssigkeit farblos war.

Im Anschluss an die Perfusion wurde das Rückenmark durchtrennt, die Kopfhaut bis zum *Os nasale* vom Schädel abgelöst und die dem Schädel anliegenden Anteile der Kau- und Halsmuskulatur, das umliegende Bindegewebe sowie die Wirbelkörper der ersten zwei Halswirbel entfernt. An den *Condyl*i beginnend und nach kranial fortschreitend wurden die einzelnen Schädelplatten bis zum *Bregma* abpräpariert und das Gehirn auf diese Weise freigelegt. Nach Entfernen der *Dura mater* und der Durchtrennung der austretenden Hirnnerven wurde das gesamte Gehirn aus dem *Cavum cranii* entfernt, wobei lediglich die Hypophyse im *Sella turcae* am Tierkörper zurückblieb. Sie wurde anschließend separat entnommen und unverzüglich auf einer planen Fläche aufliegend und in Tissue Freezing Medium® eingebettet in Trockeneis schockgefroren. Nach Durchtrennung des restlichen Gehirns an der *Fissura transversa cerebelli*, wurden die entsprechenden Anteile (*Cerebrum* und *Cerebellum* mit Stammhirn) auf gleiche Weise eingefroren. Der Bereich des Hypothalamus wurde zusätzlich vorher mit Tissue Freezing Medium® überschichtet, um die spätere Herstellung von Gefrierschnitten von guter Qualität zu erleichtern. Zur Aufbewahrung der Hirnteile

wurden diese in eine Lage Parafilm gefolgt von einer Lage Aluminiumfolie eingewickelt und bis zur Anfertigung der Hirnschnitte bei - 55°C zum Schutz vor Austrocknung in luftdicht verschlossenen Kunststoffbeuteln gelagert.

1.5.2. Herstellen von Gehirnschnitten am Kryostat

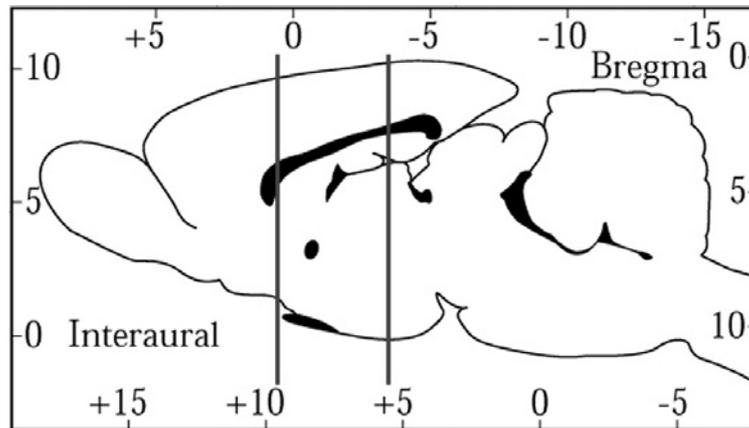


Abb. 23: Sagittalschnitt durch das *Cerebrum* der Ratte

Aus dem zwischen den grauen Linien liegende Bereich wurden die Schnitte für die Immunhistochemie gewonnen. Modifiziert nach Paxinos & Watson (1998).

Am Kryostat wurden bei einer Innenraumtemperatur von - 20 bis - 25°C und einer Objekttemperatur von - 8 bis - 13°C von den Gehirnen der perfundierten Tiere 20 µm dicke, coronale Schnitte angefertigt und auf vorgekühlte, mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gezogen. Poly-L-Lysin diente dabei der optimale Adhäsion der Schnitte am Objektträger, da anionische Anteile von Zelloberflächen mit dem polykationischen L-Lysin-Polymer interagieren (Mazia et al., 1975). Das *Cerebrum* wurde mit Hilfe von Tissue Freezing Medium® auf den Objektblock aufgefroren und von rostral beginnend geschnitten. Der entsprechende Bereich (*Bregma* 0,50 mm bis - 3,5 mm; Paxinos & Watson, 1998; Abb. 23) umfasste vom *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) beginnend den *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO), das *Organum subfornicale* (SFO), die *Eminentia mediana* (ME) sowie den *Nucleus arcuatus* (ARC). Von jeder der Regionen wurden mindestens 15 Schnitte gesammelt und die jeweils dazwischen liegenden Bereiche als 40 - 80 µm dicke Schnitte übereinander auf einen Objektträger gestapelt, um später für die Analysen mittels PCR und Western Blot genutzt werden zu können (siehe Kap. 3.3 bzw. 4.3). Dazu wurden der Hypothalamus und die jeweils dorsal und an beiden Seiten lateral gelegenen Gebiete ausgeschnitten und mittig durchtrennt, so dass zwei etwa gleich schwere Gewebeproben vorlagen. Die abgeschnittenen Anteile des cerebralen Cortex wurden ebenfalls gesammelt (Abb. 26). Das *Cerebellum* mit Stammhirn wurde auf gleiche Weise, allerdings von kaudal beginnend geschnitten, wobei die *Area postrema* (AP) in ihrer gesamten Ausdehnung auf Objektträgern gesammelt wurde (*Bregma* - 14,28 mm bis - 12,28 mm; Paxinos & Watson, 1998).

Die fertigen Schnitte wurden bis zum Beginn der immunhistochemischen Untersuchungen bei - 55°C gelagert.

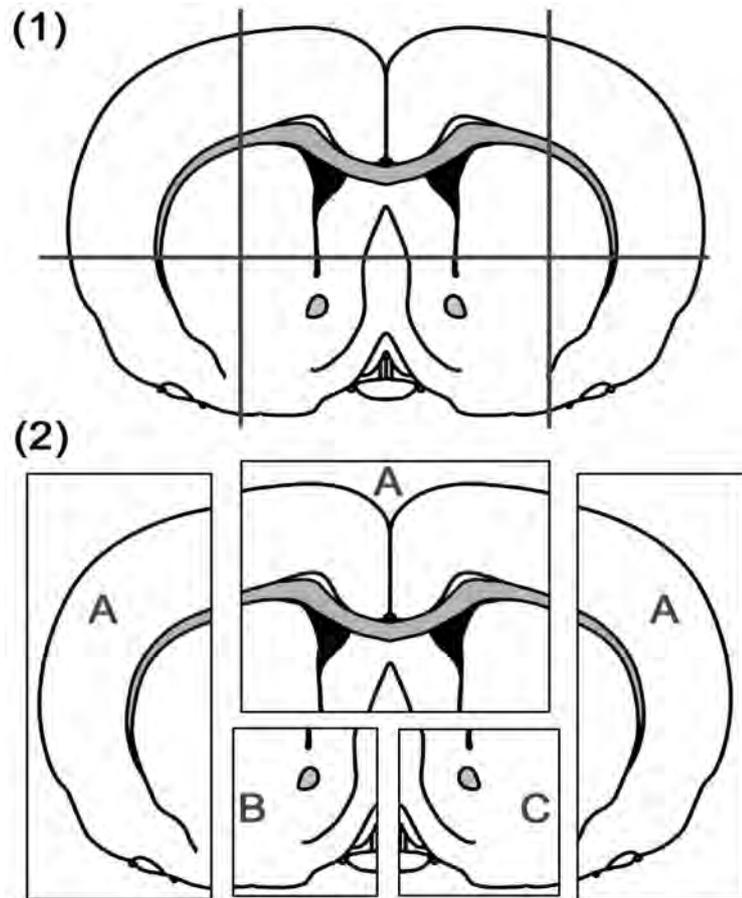


Abb. 24: Gewinnung der Gewebeproben für quantitative *real-time* PCR und Western Blot

Mindestens 15 übereinander gestapelte Hirnschnitte (hier schematisch dargestellt) wurden den Markierungen (1) entsprechend in 5 Teilstücke aufgeteilt. Die Teilstücke A (2) wurden insgesamt als „cerebraler Cortex“ mittels quantitativer *real-time* PCR oder Western Blot analysiert, die vorwiegend hypothalamischen Anteile B und C wurden als „Hypothalamus“ ausgewertet.

1.5.3. Versuchsprotokoll

Durch Fixierung des Gewebes mit 2 % igem PFA vernetzen sich reaktive Gruppen in Polypeptiden, wodurch in der vorliegenden Arbeit die Antigene für den Prozess der Immunhistochemie geschützt und in ihrer ursprünglichen Form erhalten wurden. Die Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde wiederum durch Inkubation mit Inkubationspuffer (Block-Lösung) erreicht, der neben einem Serumanteil (10 % NDS) für die verschiedenen Protokolle 0,1 bis 0,3 % des Detergens Triton X zur Verbesserung der Durchlässigkeit der Zellmembranen enthielt (siehe auch Tab. 1). Alle Arbeitsschritte, die fluoreszierende Sekundärantikörper bzw. DAPI beinhalteten, sowie alle Folgeschritte bis zur Mikroskopie wurden unter möglichst lichtarmen Bedingungen durchgeführt, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern. Im Einzelnen wurde die Immunhistochemie nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Arbeitsschritt	Bedingungen/Vorgehen	Dauer
Schnitte aufwärmen	- 20°C im Kryostat	5-10 min.
trocknen	bei RT, Umrandung der Schnitte mit Fettstift (Pap-Pen)	5 - 7 min
Fixation	bei RT, mit PFA 2 %	10 min
waschen	bei RT, mit PBS	3x5 min
blocken	bei RT, mit Block-Lösung in feuchter Kammer	60 min
Inkubation I: Primärantikörper	bei 4°C, in feuchter Kammer Ansatz in Block-Lösung, ca. 300 µl/Schnitt	20 - 24 h
waschen	bei RT, mit PBS	3x5 min
Inkubation II: Sekundärantikörper	bei RT, in feuchter Kammer, abgedunkelt Ansatz in Block-Lösung, ca. 300 µl/Schnitt	120 min
waschen	bei RT, mit PBS, abgedunkelt	3x5 min
Inkubation III: DAPI-Lösung	bei RT, abgedunkelt	10 min
waschen	bei RT, mit PBS, abgedunkelt	3x5 min
deckeln	2 - 4 Tropfen Citifluor®, Lagerung bei 4°C	

Tab. 5: Protokoll Immunhistochemie

Die fertig gedeckelten Objektträger wurden in lichtundurchlässigen Mappen bei 4°C bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop gelagert, wobei die mögliche Gesamtlagerungszeit abhängig von den verwendeten Primärantikörpern von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen reichte.

Im Rahmen der RNAi-Teilstudie eingesetzte RNA, die mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) markiert war, (S. 75) konnte nach einem verkürzten Protokoll fluoreszenzmikroskopisch in Hirnschnitten sichtbar gemacht werden. Um sicherzustellen, dass bei dem verwendeten Protokoll nicht nur Neurone die RNA aufnahmen, wie in vorhergehenden Studien gezeigt werden konnte (Niizuma et al., 2008), sondern auch andere Zelltypen, wurde in einem Teil der Schnitte zusätzlich CD68 (aktivierte Mikroglia) detektiert. Zur Sichtbarmachung dieser Zellen wurde ein Sekundärantikörper mit blauem Emissionsspektrum verwendet. Für diese Schnitte wurde daher auf eine DAPI-Kernfärbung verzichtet.

Arbeitsschritt	Bedingungen/Vorgehen	Dauer
Schnitte aufwärmen	- 20°C im Kryostat, abgedunkelt	5-10 min.
trocknen	bei RT, Umrandung der Schnitte mit Fettstift (Pap-Pen), abgedunkelt	5 - 7 min
Fixation	bei RT, mit PFA 2%, abgedunkelt	10 min
waschen	bei RT, mit PBS, abgedunkelt	3x5 min
Inkubation I: a) Primärantikörper	bei 4°C, in feuchter Kammer, abgedunkelt Ansatz in Block-Lösung, ca. 300 µl/Schnitt	20 - 24 h
b) DAPI-Lösung	bei RT, abgedunkelt	10 min
waschen	bei RT, mit PBS, abgedunkelt	3x5 min
deckeln	2 - 4 Tropfen Citifluor®, Lagerung bei 4°C	

Tab. 6: modifiziertes Protokoll zur Detektion FITC-markierter RNA

1.5.4. Mikroskopie

Direkt im Anschluss an die Immunzytochemie/-histochemie wurden die Schnitte fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, wobei ein FITC-Filter (ARW 450 - 490 nm) sowie ein Rhodamin-Filter (ARW 510 - 530 nm) zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe eingesetzt wurden. Alexa 488® emittiert grünes Licht im Wellenlängenbereich von 510 - 540 nm, Cy3™ rotes Licht im Bereich 630 - 660 nm. Die maximale Excitationswellenlänge von DAPI liegt bei 358 nm, es wird daraufhin blaues Licht einer Wellenlänge von 461 nm emittiert, während FITC nach Anregung bei 492 nm ein Emissionsmaximum bei 518 nm (grün) aufweist und Alexa 350® Licht einer Wellenlänge von 442 nm (blau) emittiert.

Von allen zu untersuchenden Zellkulturen bzw. Hirnregionen wurden von den drei einzelnen Farbkanälen (rot, grün, blau) mit einer digitalen schwarz-weiß Kamera bei verschiedenen Vergrößerungen Fotos aufgenommen, die mit Hilfe des Programms Metamorph zu einem dreifarbigem Bild zusammengefügt wurden. Auf diese Weise war es zusätzlich zur Betrachtung der Einzelsignale möglich, die nukleäre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren zu bestätigen und außerdem die Phänotypen reaktiver Zellpopulationen zu beurteilen.

1.5.5. Auswertung und Statistik

Qualitative und semiquantitative Beurteilungen

Zur rein qualitativen Darstellung der Induktion von NF-IL6, p-NF-IL6, STAT3, p-STAT3, NF-κB und COX2 wurden Helligkeit und Kontrast der Fotos angepasst (Photoshop), um eine bessere Sichtbarkeit der Signale zu erreichen und die beobachteten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen möglichst deutlich darzustellen.

Für die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse wurden in der ersten Teilstudie zunächst semiquantitative Maßstäbe angelegt: Ein 7-Punkte Bewertungssystem diente dabei wiederum zur Beurteilung der Dichte und Intensität der beobachteten Signale (NF-IL6-positive Zellkerne). Bei gleicher Vergrößerung wurden diese für jede Hirnregion mit einem fiktiven Wert zwischen 0 (= -) und 3 (= +++) beurteilt (siehe Tab. 7). Diese Werte wurden für jedes Tier sowie nochmals für jede Tiergruppe arithmetisch gemittelt, um die beobachteten Unterschiede in der Immunreaktivität (I.R.) im Zeitverlauf in Tabellenform darstellen zu können.

-	0
(+)	0,5
+	1
+(+)	1,5
++	2
++(+)	2,5
+++	3

Tab. 7: Symbole und Zahlenwerte der semiquantitativen Beurteilung der IR

Quantitative Beurteilungen: Zellzählungen

Im Rahmen der Untersuchungen zum Zeitverlauf der durch LPS (100 µg/kg KM) induzierten NF-IL6-IR wurden die Signale auf Original-Fotos bei 40-facher Vergrößerung gezählt. Pro Schnitt wurden jeweils zwei, z.T. mittig leicht überlappende Bilder links und rechts der Mittellinie ausgewertet (Abb. 25, A). Innerhalb festgelegter Grenzen für jede Region (OVL, *Bregma* 0,40 bis 0,60 mm; SFO, *Bregma* -0,80 bis -1,10 mm; AP, *Bregma* -13,70 bis -14,20 mm; ME, *Bregma* -2,80 bis -3,20 mm; MnPO, *Bregma* 0,00 bis -0,20 mm; Paxinos & Watson, 1998) wurden für jedes Tier alle gefärbten Schnitte fotografiert und ausgewertet, was 2 - 10 Schnitten pro Tier entsprach. Beschädigte Schnitte wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Zunächst wurden nur die roten NF-IL6-Signale mit Hilfe der manuellen Zählfunktion in Metamorph markiert, um anschließend durch Überlagerung mit dem blauen Kanal sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um nukleäre und damit relevante Signale handelte, welche eine weitere Markierung erhielten (Abb. 25, a, b). Für die Berechnungen wurden die Mittelwerte (alle Tiere einer Gruppe) der Mittelwerte (alle Schnitte eines Tiers) herangezogen. Statt absolute Zellzahlen pro Schnitt anzugeben, wurden die Signale auf das Volumen des untersuchten Bereichs im Schnitt bezogen, indem die ausgezählte Fläche auf dem Foto mit der Schärfentiefe des Mikroskops multipliziert wurde. Die Berechnung der Schärfentiefe erfolgte hierbei nach der Formel von M. Berek (Berek, 1927), wobei die Numerische Apertur (NA) von 0,75, die mittlere benutzte Wellenlänge von 565 nm und die Gesamtvergrößerung von 40 eingesetzt wurden, während es sich beim Wert von 350 µm um einen vom Hersteller des Mikroskops angegebenen Parameter handelt.

$\text{Wellenlänge in } \mu\text{m} / 2 \times \text{NA}^2 + 350 \mu\text{m} / \text{NA} \times \text{Gesamtvergrößerung}$
--

Damit stellen die letztendlichen Zahlen die mittlere Dichte an Signalen pro mm³ dar, die in einem Schnitt von der jeweils untersuchten Region eingenommen wurden. Die auf diese Weise gewonnenen Werte für alle untersuchten Zeitpunkte wurden graphisch als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt, und mittels einfaktorieller ANOVA mit angeschlossenen Newman-Keuls post-hoc-Test auf signifikante Unterschiede (p < 5 %) untersucht (Prism®).

Für die Darstellung der prozentualen Anteile der verschiedenen NF-IL6-reaktiven Zellpopulationen wurden Originalfotos in 100-facher Vergrößerung ausgewertet, von denen pro Schnitt 2 - 4, aus der Mitte der untersuchten Hirnregion angefertigt worden waren (Abb. 24, A - C). Hier musste zunächst die Gesamtzahl der Zellkerne im Bildausschnitt unter Zuhilfenahme des blauen Kanals bestimmt werden. Überlagerung mit dem roten Kanal ermöglichte dann die Markierung derjenigen Nuklei, die NF-IL6-IR zeigten. Im letzten Schritt wurde die Kolokalisation dieser nukleären Signale mit den jeweiligen Zellmarkerproteinen durch zusätzliche Betrachtung des grünen Kanals festgehalten (Abb. 24, a-c). Bezogen auf die Gesamtheit aller Kerne wurden so die Anteile NF-IL6-posi-

tiver Zellen insgesamt und die jeweiligen Anteile NF-IL6-positiver Endothelzellen, Astrozyten, aktivierter Mikrogliazellen, perivaskulärer Makrophagen und NO-positiver Neuronen ermittelt. Wiederum entsprechen die Zahlen den Mittelwerten (alle Tiere in einer Gruppe) der Mittelwerte (alle Schnitte eines Tiers). Diese Mittelwerte mit Standardfehler dienten auch der graphischen Darstellung.

Korrektur der Zählergebnisse

Beide Zählungen bergen per se die Gefahr einer Überschätzung der tatsächlichen Anzahl, da durch die Schichtdicke von 20 µm die Wahrscheinlichkeit besteht, dass Anteile einer angeschnittenen Zelle in zwei aufeinanderfolgenden Schnitten zu sehen sind, so dass diese Zelle zweimal in die Zählungen eingeht. Zu diesem Zweck wurde eine potentielle Überzählung mittels der Korrektur nach Abercrombie herausgerechnet (Abercrombie, 1946). Dabei wird anhand des mittleren Durchmessers der Zellkerne ein Korrekturwert (CV) berechnet und die Zellzahlen anschließend durch den resultierenden Korrekturfaktor (CF) dividiert (T = Schnittdicke; h = mittlerer Durchmesser der gemessenen Zellkerne).

$$CV = T / T + h; CF = 1 / CV$$

$$\text{tatsächliche Zellzahl} = \text{Zählwert} / CF$$

Die benötigten Kerndurchmesser stammten aus separaten Messungen, in denen zunächst ein Durchschnitt für alle DAPI-gefärbten Zellkerne ermittelt wurde, um die Gesamtzahl der gezählten Kerne korrigieren zu können. Eine Population Kerne, in denen ein NF-IL6-Signal erkennbar war, wurde nochmals vermessen und das Ergebnis gemittelt, so dass die Zahlen NF-IL6-immunreaktiver (i.r.) Zellen im Zeitverlauf und in der prozentualen Darstellung mit dem passenden Faktor korrigiert werden konnten. Für die Korrektur der unterschiedlichen Zellpopulationen mussten schließlich noch die mittleren Durchmesser der Kerne von Endothelzellen, Astrozyten, aktivierten Mikrogliazellen perivaskulären Makrophagen und NO-positiven Neuronen erhoben, und die prozentualen Anteile mit dem entsprechenden Korrekturwert korrigiert werden.

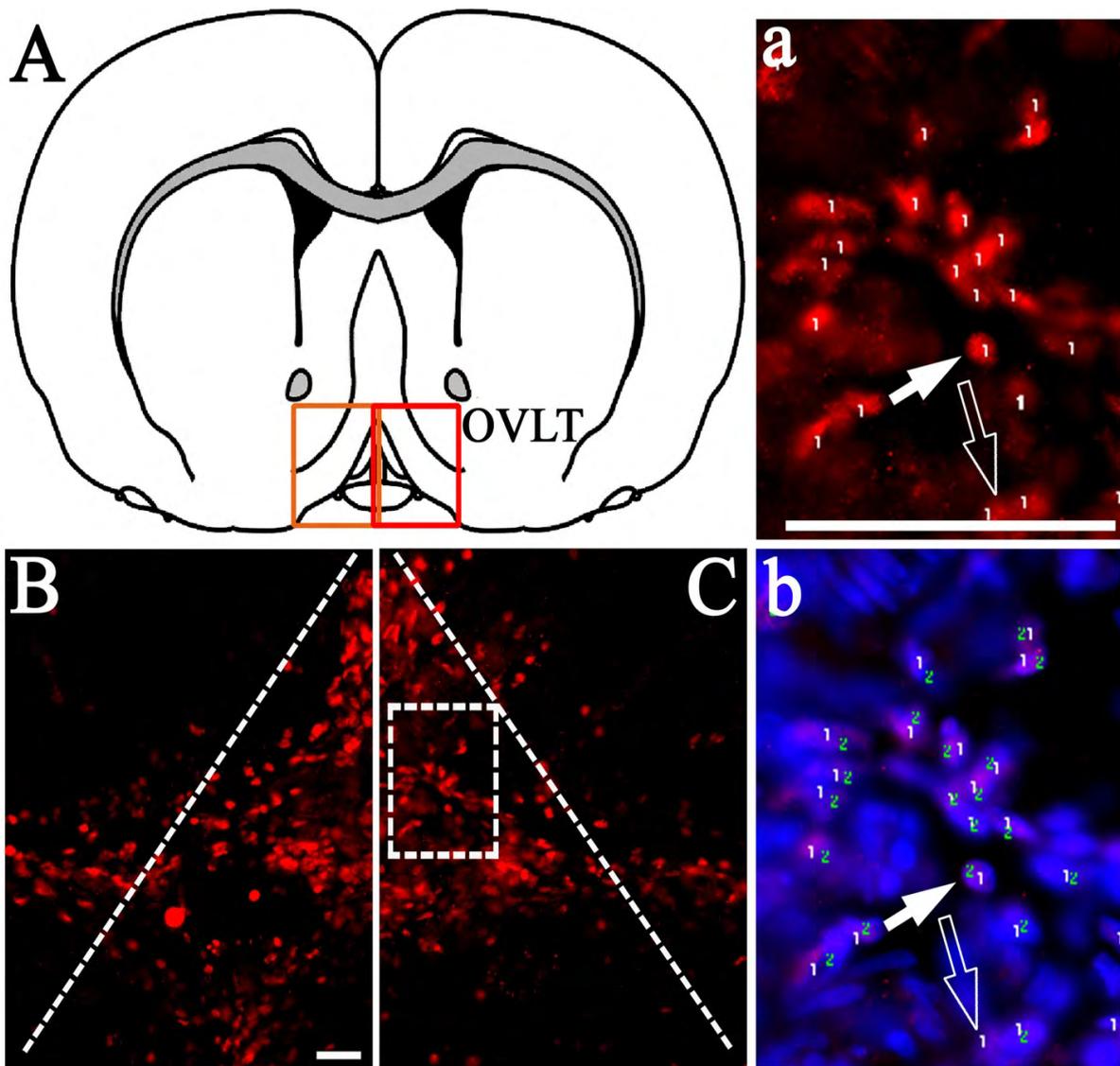


Abb. 25: Zählung NF-IL6-immunreaktiver Zellkerne am Beispiel des OVLT

Der schematische Überblick (A) zeigt die Regionen, aus welchen Fotos (40-fache Vergrößerung) zur Zählung herangezogen wurden (Kasten rot/orange). B und C zeigen zwei Beispiele dieser Fotos, in denen die tatsächlich ausgezählte Fläche mit gestrichelten Linien dargestellt ist. Das gestrichelte Kästchen zeigt den in a und b vergrößert dargestellten Ausschnitt an. Zur Zählung wurden die erkennbaren, roten NF-IL6-positiven Kerne markiert (a) und nach Überlagerung mit dem blauen Kanal, der alle Zellkerne anzeigt, überprüft, ob es sich um nukleäre Signale handelte (b). Der gefüllte Pfeil zeigt exemplarisch einen auf diese Weise identifizierten, positiven Zellkern an, während ein nicht eindeutig zugeordnetes Signal mit einem leeren Pfeil markiert ist. Die Größenmarker entsprechen jeweils 25 μm (Marker in B gilt auch für C, Marker in a auch für b).

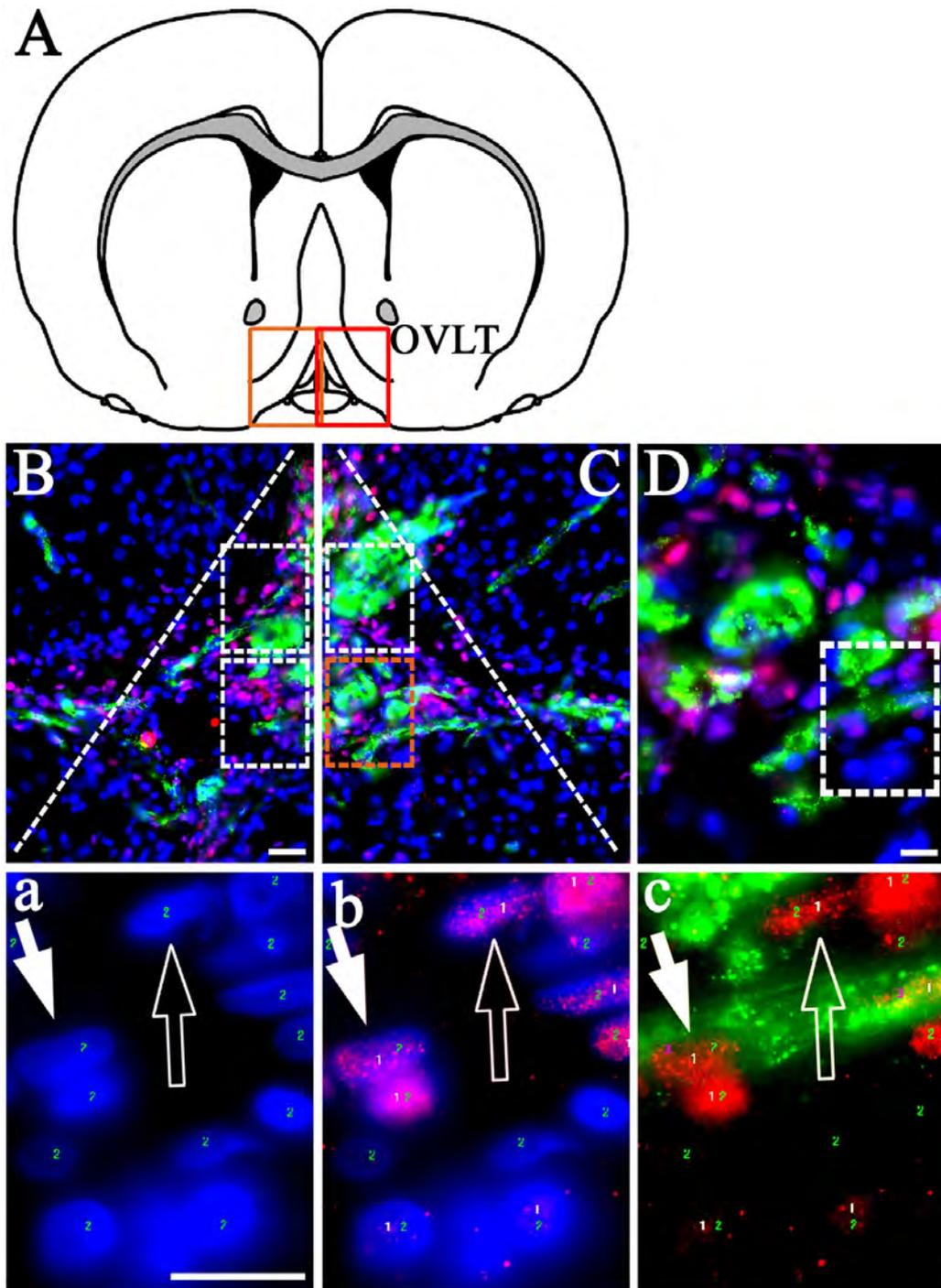


Abb. 26: Quantifizierung verschiedener NF-IL6-exprimierender Zellphänotypen am Beispiel des OVLT

Aus dem auszuwertenden Bereich (Kasten rot/orange, A, gestrichelte Linien, B und C) wurden 4 Fotos in 100-facher Vergrößerung aufgenommen (Beispiel D, entspricht Kasten orange in C). In diesen wurden zunächst alle Zellkerne unter reiner Betrachtung des blauen Kanals markiert (a). Überlagerung mit dem roten Kanal ermöglichte die Doppelmarkierung derjenigen Zellkerne, die ein NF-IL6-Signal aufwiesen (b). Die Zugehörigkeit zu einem Zellphänotyp (hier Endothelzellen) wurde durch die Überlagerung dieser Signale mit dem grünen Kanal bestimmt (c). Gefüllte Pfeile weisen auf eine NF-IL6 positive Endothelzelle, während leere Pfeile exemplarisch eine offensichtlich einem anderen Phänotyp zugehörige, NF-IL6 immunreaktive Zelle anzeigen. Der Größenmarker in B entspricht 25 μm und bezieht sich auch auf C. In D und a (gilt auch für b und c) steht der Marker für 10 μm .

2. Zytokin Bioassay

2.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
Gewebekulturflaschen	steril mit Filter: 50-, 75-, 250- und 550 ml	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturplatte	steril, mit Abdeckplatte, 96K	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Heparin-Natrium 25000 ratiopharm®	Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH, Ulm

Lösungen und Puffer

Bezeichnung:	Zusammensetzung:	Hersteller:
Isopropanol/HCl-Lösung	4 ml 2N HCl 196 ml Isopropanol	Merck, Darmstadt
MTT - Lösung (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid)	0,1 g MTT in 20 ml PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

IL-6 Bioassay:

Assay Medium	45 ml RPMI Medium 4 ml FCS (Fetales Kälberserum) 0,5 ml Glutamin (200 nM) 125 µl Mercaptoethanol (200 mM) 65 µl Gentamicin (10 ng/ml)	Rothwell Park Memorial Institute; Medium 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland
Wachstumsmedium	Assay-Medium + 500 I.U. IL-6-Standard/ml	
IL-6 Standard	100 I.U./ml	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK
Qualitätskontrollen	QK 1: 500 µl IL-6 [10 I.U./ml] QK 2: 500 µl IL-6 [30 I.U./ml]	

TNFα Bioassay:

Actinomycin D (Zytostatikum)	Stocklösung 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Assay-Medium	500 ml RPMI Medium 55 ml FKS (Fetales Kälberserum) 5 ml Penicillin-Streptomycin (5000 I.U./ml) 5 ml Glutamin (200 nM)	Rothwell Park Memorial Institute; Medium 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland
TNF-Standard	1000 pg/ml	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK
Qualitätskontrollen	QK 1: 500 µl TNF [10 pg/ml] QK 2: 500 µl TNF [25 pg/ml]	
Trypsin (25%)	Fertiglösung 0,25 % in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin

2.2. Grundlagen der Methode

Die Methode des zytokinspezifischen, Zellkultur-abhängigen Bioassays bietet die Möglichkeit, ausschließlich die biologisch aktiven Formen verschiedener Zytokine in Flüssigkeiten oder Geweben speziesübergreifend zu quantifizieren. Sie basiert auf spezifischen biologischen Reaktionen, die in bestimmten Zelllinien durch Zytokine ausgelöst werden können. Die Sensitivität des Tests ist sehr hoch, so dass schon geringste Konzentrationen eines Zytokins exakt bestimmt werden können. Die langjährige, erfolgreiche Anwendung solcher Bioassays zum Nachweis der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie (Harré et al., 2003; Hübschle et al., 2006; Roth et al., 2006; Wuchert et al., 2008; Wuchert et al., 2009) legten ihre Anwendung auch für die vorliegende Arbeit zur Zytokindetektion im Plasma der Versuchstiere sowie in Überständen der Primärkulturen verschiedener Hirnregionen nahe. Für die Detektion von IL-6 und TNF α wurden Zelllinien benutzt, deren Wachstums- bzw. Überlebensrate direkt mit dem Vorliegen des jeweiligen Zytokins korrelieren (Mosmann, 1983). Diese Raten können anhand einer Farbreaktion photometrisch bestimmt werden. Dabei wird die Umsetzung eines gelben MTT-Tetrazoliumsalzes (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu dunkel-blauen bis violetten MTT-Formazan-Kristallen genutzt. Diese Reaktion findet nur in lebenden Zellen statt und wird von der mitochondrialen Succinyl-Dehydrogenase, aber auch durch mikrosomale Enzyme in Abhängigkeit von reduzierten Pyrimidinnukleotiden getragen (Berridge & Tan, 1993). Die Formazan-Menge ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen (Ibelgaufts, 1995; Mosmann, 1983). Nach Auflösung der Zellen und der Formazan-Kristalle mittels eines Gemischs aus Isopropanol und HCl kann die Intensität dieser Farbreaktion durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 550 nm bestimmt werden.

2.3. Probengewinnung

Zur Messung bioaktiver Zytokine nach Stimulation *in vitro* wurden die Überstände an Kulturmedium im Anschluss an die jeweiligen Inkubationsphasen (S. 63) mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und bis zur Durchführung der Assays bei - 20°C gelagert. Die Beurteilung *in vivo* erfolgte anhand von Plasmaproben der entsprechend stimulierten Tiere. Diesen wurden im Zuge der Perfusion und vor der Organentnahme (S. 87) aus dem rechten Ventrikel 5 ml Blut entnommen. Die Entnahme erfolgte mit einer Kanüle, deren Konus zuvor mit Heparin gefüllt worden war (~ 50 I.U. Heparin/ml Blut). Nach mehrmaligem, vorsichtigen Schwenken wurde das Blut in vorgekühlte Kunststoffröhrchen gegeben und bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Diese erfolgte für 10 Minuten. bei 3000 rpm. Das anschließend als klare Phase abgenommene Plasma wurde bis zur Durchführung der Assays bei - 20°C gelagert.

2.4. IL-6

Die für den IL-6 Bioassay genutzte Hybridoma Zelllinie B9 wurde 1986 entwickelt (Aarden et al., 1987; Van Oers et al., 1988) und kann durch bioaktives IL-6, z.B. in Serumproben, dosisabhängig zur Proliferation stimuliert werden. Die Sensitivität des Nachweises ist dabei so hoch, dass selbst die von einem einzelnen menschlichen Monozyten produzierte Menge IL-6 erfasst werden kann. (Espevik & Nissen-Meyer, 1986). Für die Bestimmung der IL-6 Konzentration in Plasmaproben oder Zellkultur-Überständen bedeutet dies, dass von der Zahl der Zellen, die unter Einfluss der betreffenden Probe wachsen, direkt auf die in der Probe vorliegende Menge an bioaktivem IL-6 geschlossen werden kann. Das Detektionslimit lag für die in dieser Arbeit analysierten Proben bei 3 I.U./ml.

Die B9-Zellen wurden in einem speziellen Medium unter Zusatz von 500 I.U. IL-6 Standard („Wachstumsmedium“) bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen in neue Kulturflaschen passagiert. Hierfür wurden in einer frischen Kulturflasche unter sterilen Bedingungen 1 ml der Zellsuspension mit 9 ml des Wachstumsmediums versetzt.

Zur Durchführung des Assays wurde eine sterile 96-well-Mikrotiterplatte genutzt, in der zunächst nach einem festgelegten Schema Verdünnungsreihen (1 : 2) eines IL-6 Standards, zwei verschiedener Qualitätskontrollen (QK1, QK2) mit bekannter Konzentration und der zu bestimmenden Proben hergestellt wurden (Abb. 27). Die Vertiefung (well) A1 der Platte blieb dabei frei (blank). Nach Vorlegen von jeweils 100 µl Assay-Medium in die wells der Spalten C-L konnte die Standardreihe, ausgehend von 200 µl des unverdünnten Standards (100 I.U./ml) in B1, durch einfaches Überführen von je 100 µl pro well in das jeweils nachfolgende und anschließendes Mischen hergestellt werden (100 µl aus B1 in C1 → mischen; 100 µl aus C1 in D1 → mischen; usw.). In L1 wurde das Assay-Medium allein belassen. Da die beiden Qualitätskontrollen (Reihen 2 - 3) und die Proben (Reihen 4 - 8) doppelt bestimmt werden sollten, wurden hier jeweils die ersten beiden wells der Reihen mit den Originalkonzentrationen beschickt und je 100 µl in das übernächste well verbracht. (100 µl aus A3 in C3 → mischen/ 100 µl aus B3 in D3 → mischen, usw.). Aus dem Ansatz der jeweils letzten Verdünnungsstufe wurden 100 µl verworfen, so dass letztendlich in jedem well ein Volumen von 100 µl vorlag.

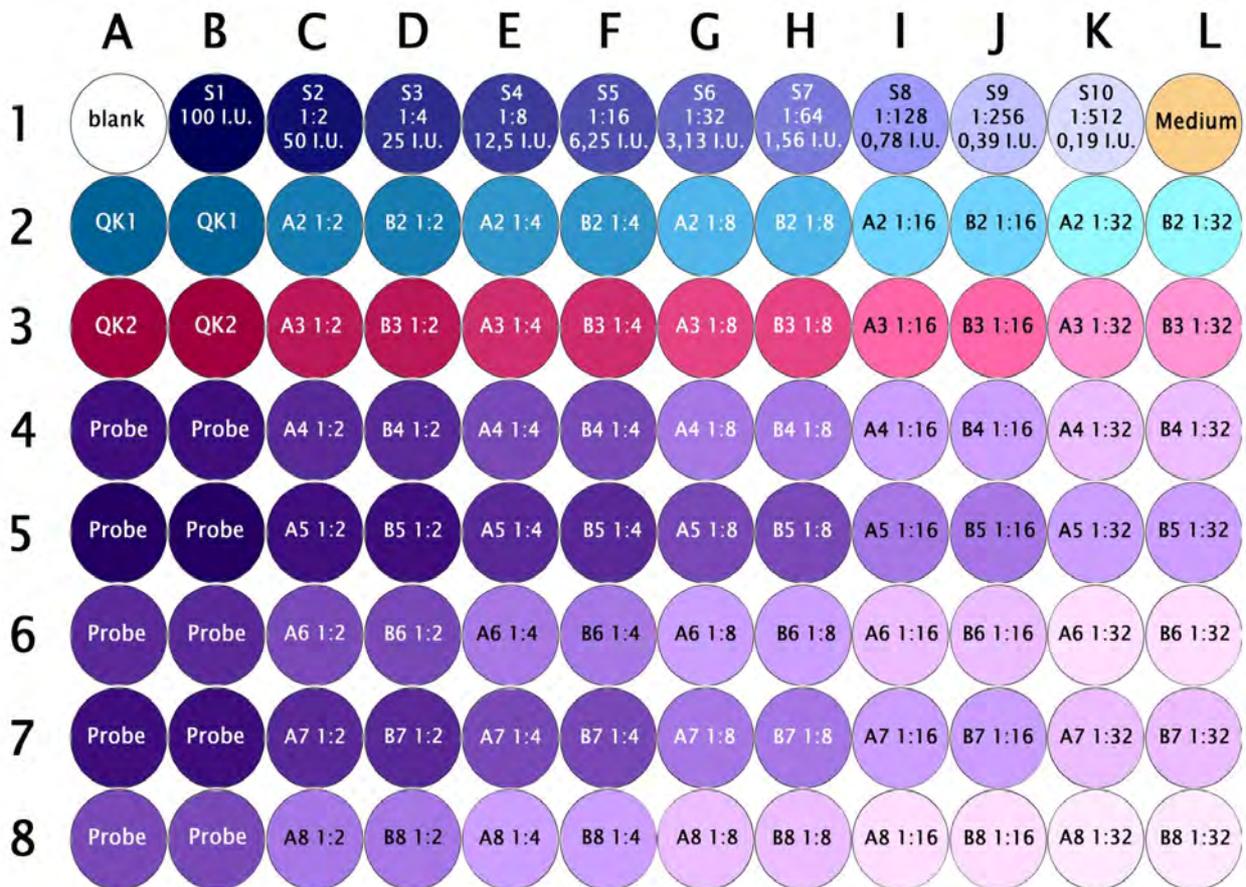


Abb. 27: Pipettierschema einer für den IL-6 Bioassay beschickten Mikrotiterplatte

Reihe 1: blank (A1); 1 : 2 Verdünnungsreihe des IL-6 Standards (B1-K1); Kontrolle mit Medium (L1)

Reihe 2/3: Verdünnungsreihen (1:2) der Qualitätskontrollen QK1 und QK2 (Doppelbestimmungen)

Reihe 4-8: Verdünnungsreihen (1:2) der Proben (Doppelbestimmungen)

Für den TNF α Bioassay wurde das gleiche Schema angewendet, allerdings wurden hier als Standard absteigende Konzentrationen von TNF α in die Reihe 1 (B-K) gegeben. Die Anfangskonzentration in B1 betrug dabei 1000 pg/ml.

Nach der Herstellung der Verdünnungen erfolgte die Zugabe von 100 μ l der aufbereiteten B9-Zellsuspension in jedes well. Die Aufbereitung bestand in dreimaliger Zentrifugation bei 2.300 rpm für jeweils 10 Minuten und anschließender Resuspension in Assay-Medium, wobei nach dem letzten Waschschrift nur noch genau 3 ml Medium zur Resuspension verwendet wurden. Da die eingesetzten 100 μ l der Suspension genau 5.000 Zellen enthalten sollten, wurde zunächst mit 50 μ l der Suspension die Zellzahl in einer Zählkammer nach Thoma durch Auswertung von jeweils 80 Kleinstquadraten bestimmt. Anschließend konnte der erforderliche Verdünnungsfaktor ausgerechnet und die Zellzahl entsprechend eingestellt werden.

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} / \text{K} \times \text{AZ};$$

$$\text{K (Kammerfaktor)} = [50 \times 1 / \text{Rauminhalt}]; \text{AZ} = \text{Anzahl der ausgezählten Felder}$$

Einer 72 stündigen Inkubation der Platte im Brutschrank folgte die Zugabe von 25 μ l MTT pro well, worauf nochmals 4 h inkubiert wurde, bevor je 125 μ l der Flüssigkeit eines wells mit 100 μ l des

Isopropanol-HCl Gemisches versetzt und nochmals für 12 h bei RT lichtgeschützt inkubiert wurden. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 550 nm im ELISA-Reader.

2.5. TNF

Im TNF α Assay werden die zytotoxischen Auswirkungen von TNF α auf eine murine Fibrosarkomzelllinie des Walter & Eliza Hall Instituts (WEHI 164, „subclone 13“) eingesetzt, um anhand des dosisabhängigen Absterbens der Zellen auf den TNF α -Gehalt von Proben schließen zu können (Ross et al., 2003). Die Nachweisgrenze der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungen lag bei 6 pg/ml (Mullis & Faloon, 1987).

Zur Subkultivierung der WEHI-Zelllinie wurde aufgrund des adhärenenten Wachstums dieser Zellen das proteolytische Enzym Trypsin verwendet. Für eine Passage wurde das vorhandene Nährmedium aus der Kulturflasche dekantiert und die Zellen mit 12 ml PBS (steril) gewaschen. Anschließend wurden 3 ml 25% iges Trypsin hinzugegeben und die Zellen unter leichtem Schwenken für 3 Minuten vom Boden des Gefäßes gelöst, was sich als makroskopisch sichtbare Eintrübung der ansonsten klaren Enzymlösung darstellte. Nach Überführung von je 1,5 ml der zellhaltigen Trypsinlösung in zwei neue, jeweils mit 20 ml Medium gefüllte Kulturflaschen, konnten die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit bei leicht geöffneter Kulturflasche inkubiert werden, da die im Wachstumsmedium enthaltenen FK-Serumproteine allein zur Inaktivierung des Trypsins ausreichten. Innerhalb der ersten drei Tage nach Passage hefteten sich etwa 80 % der spindelförmigen Fibroblasten an den Boden der Kulturflasche an.

Die Durchführung des Assays erfolgte analog zum IL-6 Assay (S. 98), allerdings wurden die Zellen nach der Aufbereitung auf 50.000 Zellen/100 μ l eingestellt und dem Ansatz anschließend 4 μ g Actinomycin D pro ml Zellsuspension zugesetzt, welches zum Einen zur Hemmung des Zellwachstums und zum Anderen zur Sensibilisierung der WEHI-Zellen gegenüber TNF α diente. Im Unterschied zum IL-6 Assay wurden die Zellen nur 24 h mit den zu bestimmenden Proben inkubiert. Die Eichkurve basierte auf einem TNF α -Standard, der in absteigenden Konzentrationen (Verdünnung 1 : 2), beginnend mit 1000 pg/ml, in die erste Reihe der Mikrotiterplatte gegeben wurde.

2.6. Auswertung und Statistik

Zur letztendlichen Berechnung der Interleukin-Konzentration wurde aus den Daten zur Bestimmung der optischen Dichte zunächst mit Hilfe der Standards jeweils eine Eichkurve erstellt. Dazu wurde die OD in linearer Skala auf der y-Achse gegen die bekannten Interleukin-Konzentrationen in logarithmischer Skala auf der x-Achse aufgetragen (I.U. bzw. pg/ml, (Abb. 28)). Die Eichkurve ist charakteristischerweise innerhalb eines begrenzten Wertebereichs linear. In diesem Teil der Kurve war in beiden Assays die proportionale Beziehung zwischen der Bildung von Formazankristallen, gemessen als optische Dichte, und der Wachstums- bzw. Überlebensrate der Zellen abzulesen. Für IL-6 war diese Rate (Wachstumsrate) proportional zur in der jeweiligen Probe enthaltenen, bioaktiven IL 6-Menge, im TNF α Assay dagegen war die Beziehung aufgrund des zytotoxischen Potentials von TNF α antiproportional (Überlebensrate). Zur Auswertung wurden entsprechend nur diejenigen Proben zugelassen, deren Bioaktivitätswerte sich im linearen Bereich der Eichkurve befanden. Proben mit Werten außerhalb dieses Bereichs wurden bei angepasster Verdünnung erneut bestimmt. Anhand der Regressionsgleichung der Eichkurven und des Verdünnungsfaktors konnten die IL-6- und TNF α -Konzentrationen der Proben schließlich berechnet werden.

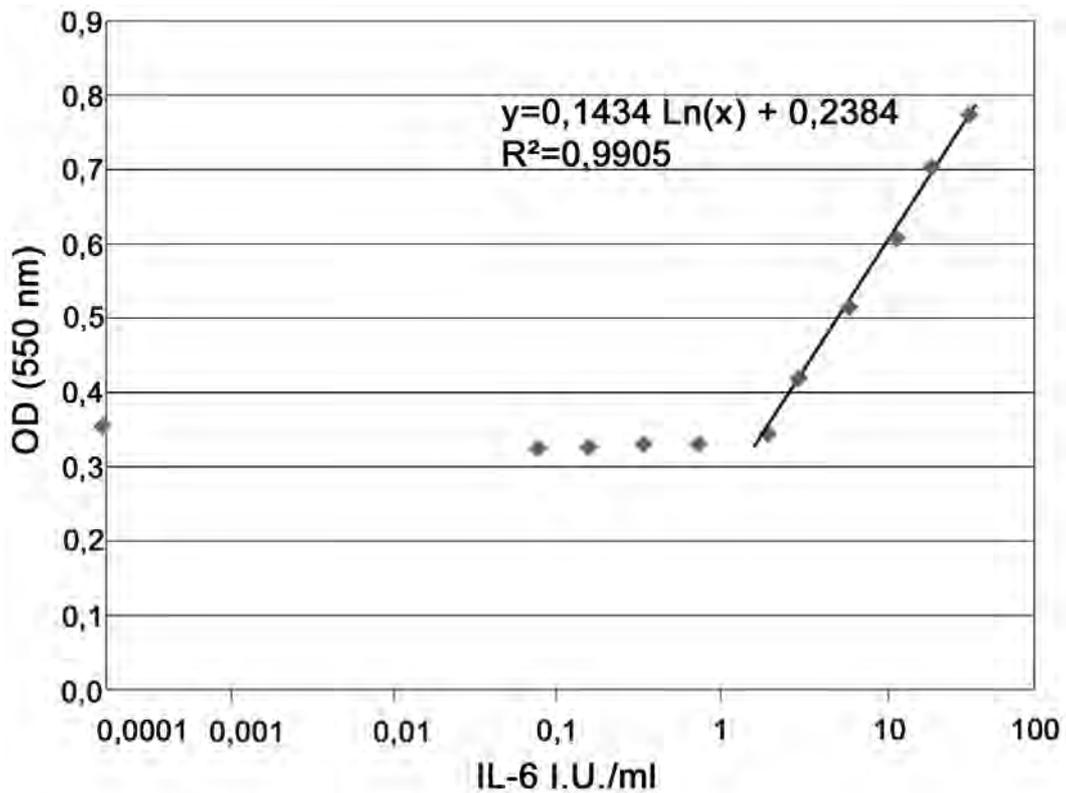


Abb. 28: Exemplarische Eichkurve eines IL-6 Assays

Die Regression im linearen Teil der Kurve liegt annähernd bei 1. Die exponentiell lineare Komponente der Kurve repräsentiert die direkte Proportionalität zwischen in den Proben vorhandenem IL-6 und dem Grad der Formazanbildung, welcher seinerseits als Maß für das IL-6 induzierte Zellwachstum gilt.

Zur statistischen Analyse wurden die in beiden Assays ermittelten Konzentrationen in den Medienüberständen bzw. im Blutplasma zunächst logarithmiert, da oft keine Normalverteilung der Werte vorlag. Die anschließende einfaktorielle ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc-Test (Prism®) zeigte signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ an. In den verschiedenen Teilstudien erfolgte jeweils eine vergleichende Analyse aller verschiedenen Gruppen (Zeitpunkte bzw. verschiedene Behandlungen) untereinander.

3. Quantitative *real-time* PCR

3.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

Bezeichnung:	Hersteller:
MicroAMP™ 96- Well Support Base	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MicroAmp(R) Fast 8-Tube Strip 0.1 ml	
MicroAmp(R) Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 ml	
MicroAMP™ 96- Well Tray for VeriFlex™ Blocks	
MicroAMP™ optical 96- Well Reaction Plate	Hellma Analytics, Mühlheim
Mikro Küvette (45 mm x 12,5 mm x 12,5 mm; Schichtdicke 10 mm) aus Quarzglas Suprasil®	
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Optical Flat Cap 8 / strip	

Chemikalien

Bezeichnung:	Hersteller:
5 x First Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei RT) 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Chloroform	
Desoxynukleotide (dNTP) Mix; 10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	
DTT (Dithiothreitol) 0,1 M	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	
M-MLV Reverse Transcriptase; 200 I.U./µl	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Random Hexamers (Random primers); 50 µM in 10 mM Tris-HCl; pH 8,3	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase ZAP®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TRIzol	Invitrogen, San Diego, CA, USA

Primer

TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Assay ID:	Gen (<i>Rattus norvegicus</i>):
endogene Kontrolle/Referenzgen:	
4352340E Rat ACTB Endogenous Control (VIC/MGB Probe, Primer Limited)	β- Aktin
Zielgene:	
Rn00568225_m1	COX2
Rn00572047_m1	mPGES
Rn00580432_m1	IL-1β
Rn00585674_s1	SOCS3
Rn00824635_s1	NF-IL6

Assay ID:	Gen (<i>Rattus norvegicus</i>):
Rn01410330_m1	IL-6
Rn01473658_g1	IκBα
Rn01505060_m1	Trib1
Rn99999012_m1	IL-10
Rn02395770_g1	IFNα 1
Rn00573488_m1	IL-1ra
Rn99999017_m1	TNF alpha

Die Assays für alle Zielgene enthielten je eine mit FAM® (6-Carboxy-Fluoreszin) am 5'-Ende markierte Hybridisierungssonde, die außerdem am gleichen Ende mit einem Minor Groove Binder (MGB) versehen war. Am 3'-Ende befand sich der nicht-fluoreszierende Quencher (NFQ). Die Sonde im β-Aktin Assay war stattdessen mit VIC™ markiert.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_085696.pdf

Lösungen und Puffer

Bezeichnung:	Zusammensetzung/Herstellung:
DEPC H ₂ O	0,1% DEPC in <i>Aqua bidest.</i> , autoklaviert nach 24 stündigem Rühren bei RT
Real-Time Mix (Ansatz pro well)	3,5µl steriles H ₂ O 5µl Mastermix 0,5µl Primer
RT-Mix I (Ansatz pro 1 µg RNA)	5µl DEPC H ₂ O 1µl Random Hexamers 1µl dNTPs
RT-Mix II (Ansatz pro 1 µg RNA)	4µl 5 x First Strand Buffer 2µl steriles H ₂ O 2µl 0,1M DTT 1µl M-MLV RT

3.2. Grundlagen der Methode

PCR allgemein

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) stellt ein Verfahren der enzymatischen, exponentiellen Amplifikation bestimmter Sequenzen eines einzel (ss)- oder doppelsträngigen (ds) DNA-Moleküls dar. Eine DNA-Polymerase katalysiert die Reaktion, für deren Initiation stellenweise zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotidprimer benötigt werden (Kleppe et al., 1971).

Die Grundlage der Methode entstand mehr oder weniger aus der Arbeit von Kleppe et al. (1971), die in einem als „repair replication“ bezeichneten Verfahren erstmals dsDNA-Templates mit Hilfe von Polymerasen, Oligonukleotidprimern und dNTPs replizieren konnten. Nach der Einführung der Technik speziell als Methode der *in vitro* Amplifikation von DNA, wobei die aus *Escherichia coli* isolierte Kenlow Fragment Polymerase verwendet wurde (Mullis & Faloona, 1987), ging man zur Taq-Polymerase über (Mülhardt, 2009), welche aus *Thermus Aquaticus* gewonnen wird. Sie weist aufgrund des Lebensraums des Bakteriums (70° warme Quellen) eine bessere Thermostabilität auf (bis 95°C), so dass das stetige Hinzufügen des Enzyms bei jedem Zyklus entfiel.

Der Ablauf der Reaktion lässt sich grob in 3 Schritte unterteilen (Mullis & Faloona, 1987): (1) Denaturierung der ds „DNA-Vorlage“ (Template), (2) Hybridisierung (Annealing) der spezifischen Primer, (3) Elongation des dsDNA-Amplifikats. Die Trennung der beiden Stränge erfolgt bei 94 - 95°C, während die anschließende Absenkung der Temperatur auf 55°C die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge ermöglicht. Um optimale Verhältnisse für die verwendete Taq-Polymerase zu schaffen, wird die Temperatur für den Elongationsschritt auf 72°C eingestellt, so dass das Enzym ausgehend vom Primer einen komplementären Strang aus den im Reaktionsansatz vorliegenden Desoxyribonukleosidtriphosphat-Molekülen (dNTP) synthetisiert und am Ende eines derartigen Reaktionszyklus eine exakte Kopie des dsDNA-Templates vorliegt. Da die Elongation an beiden Einzelsträngen des Templates entsprechend abläuft, wird in jedem Reaktionszyklus die Anzahl an DNA-Template verdoppelt (Abb. 29).

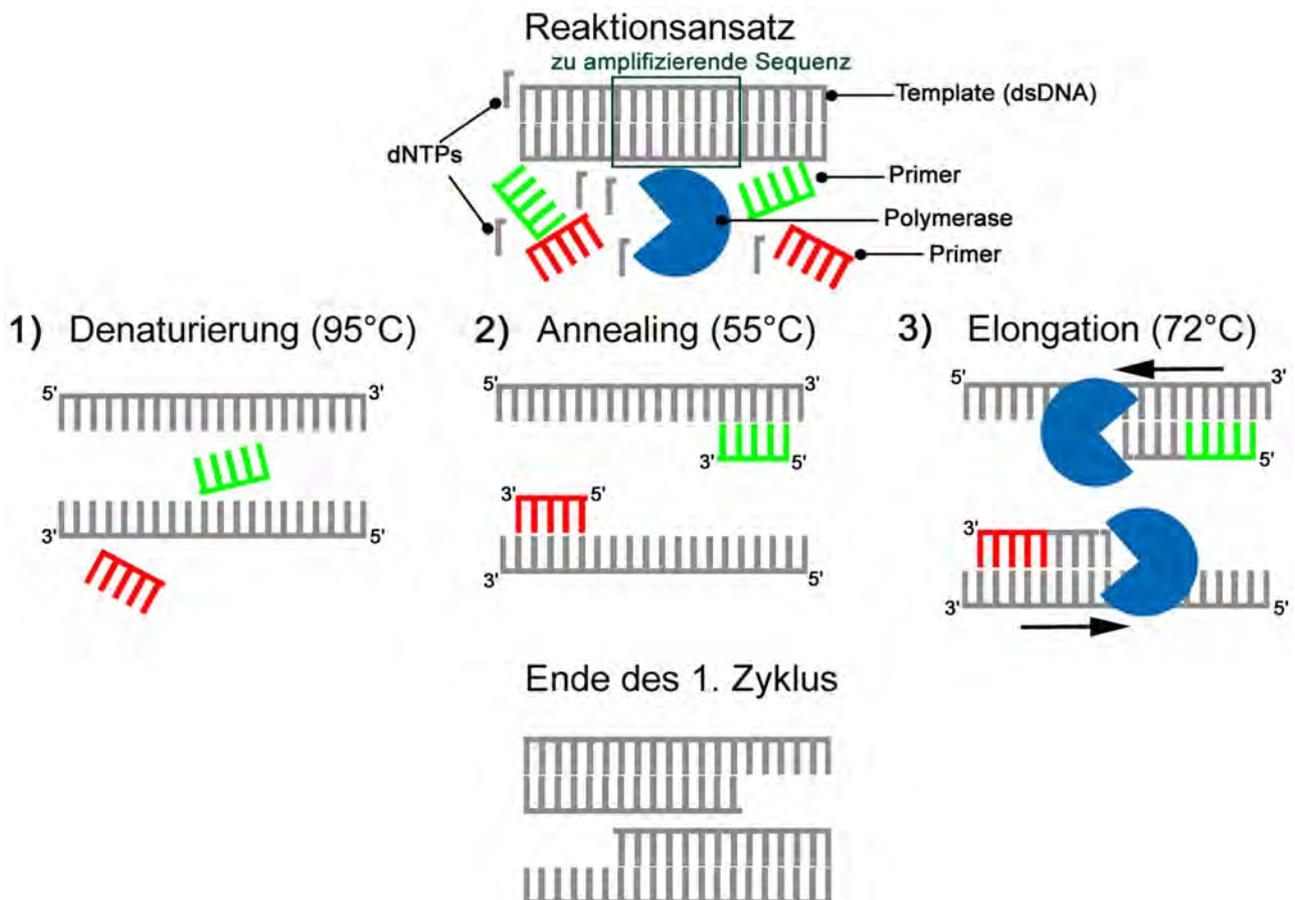


Abb. 29: Schematische Darstellung des PCR-Prinzips

Die Phasen 1 - 3 umfassen einen typischen PCR-Zyklus. Nach der Denaturierung des Doppelstranges bei 94 - 95°C ermöglicht die Abkühlung auf 55°C die Anlagerung der Primer (Annealing). Bei 72°C arbeitet die Taq-Polymerase optimal und komplementiert die DNA-Stränge (3). Am Ende der ersten Zyklen liegen Produkte intermediärer Länge vor. Erst nach 4 - 5 Zyklen sind die PCR-Produkte der gewünschten Länge in der Überzahl. Modifiziert nach Mülhardt (2009).

Eine effektive Amplifikation der gewünschten Sequenz erfordert die Durchführung von ca. 30 solcher Reaktionszyklen, die theoretisch jeweils zu einer Verdopplung der vorherigen Menge Template führen (exponentielle Zunahme). Tatsächlich zeigt die Reaktionskinetik allerdings mit Fortschreiten der Amplifikation aufgrund der Abnahme der Menge an intakten dNTP und Primern, sowie der Akkumulation von Pyrophosphat, eine zunehmende Abflachung der Vermehrungsrate (linearer Verlauf), die nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen letztendlich in eine Plateauphase übergeht. Auch die Bindung der Amplifikate miteinander, anstelle der Primer, unterstützt diesen Effekt (siehe Abb. 30).

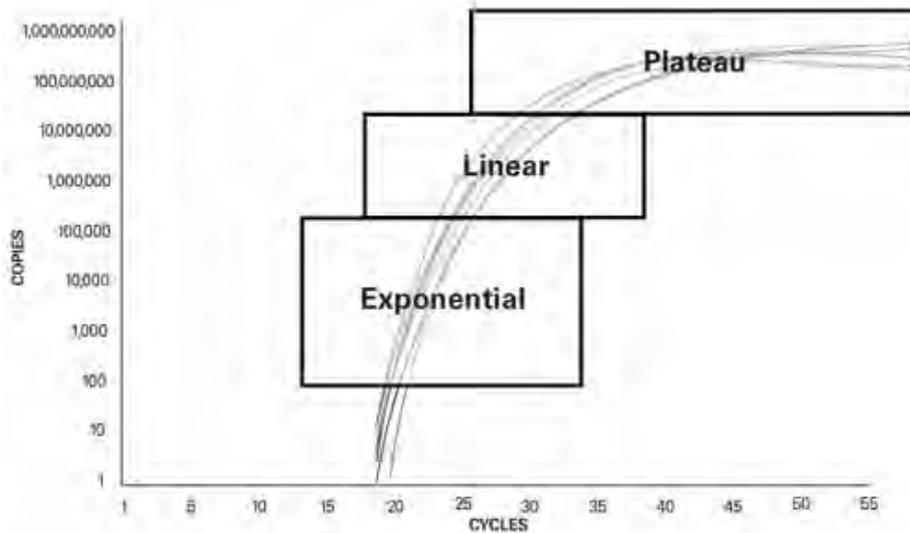


Abb. 30: Phasen der PCR

Die Kurven zeigen exemplarisch die verschiedenen Phasen der Amplifizierung. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich in jedem Zyklus (x-Achse) die Zahl der Kopien eines Templates (y-Achse). Modifiziert nach: Applied Biosystems „Real Time PCR vs Traditional PCR vs Digital PCR“.

Zur Identifizierung der amplifizierten dsDNA-Abschnitte wird klassischerweise die elektrophoretische Auftrennung aller Fragmente im Agarose-Gel und anschließende Färbung mit einem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff, wie z.B. Ethidiumbromid, angewendet. Ein parallel aufgetragener Größenmarker ermöglicht die Bestimmung der relativen Größe der Fragmente (Gyllensten & Erlich, 1988; Kemp et al., 1989; Saiki et al., 1988) im Anschluss an deren Sichtbarmachung als charakteristische Banden im UV-Licht bei 254 nm (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). Diese Methode entspricht einer Endpunktbetrachtung der Reaktion, da anhand der Bandenstärke bzw. der Intensität der Banden-Fluoreszenz die Amplifikatmenge am Ende einer definierten Zyklenzahl dargestellt wird. Die Reaktionskinetik muss dabei in Vorversuchen näherungsweise ermittelt werden. Damit ist eine rückwirkende Quantifizierung der Ausgangsmenge an DNA oder cDNA relativ ungenau und birgt ein großes Fehlerpotential. Die Anwendung der *real-time* PCR bietet für jedes Experiment eine genaue Analyse der Reaktionskinetik und ermöglicht dadurch eine wesentlich präzisere DNA-Quantifizierung.

PCR in Echtzeit

Die *real-time quantitative* PCR, auch als *real-time detection* PCR (RTD-PCR) bezeichnet, beschreibt die gleichzeitige Amplifizierung und Detektion von DNA-Sequenzen (Cardullo et al., 1988). Die moderne quantitative *real-time* PCR Technologie nutzt den sogenannten „Fluoreszenz-Resonanz- Energie-Transfer“ (FRET) als Detektionsmethode, ein Effekt, der erstmals von Cardullo

et al. (1988) angewendet wurde, um die Hybridisierung von Nukleinsäuren darzustellen. Das Prinzip des FRET (Abb. 31) beruht auf zwei verschiedenen Fluorochromen (F1 und F2), die jeweils durch Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden (Anregungswellenlänge, A1 und A2) und die damit aufgenommene Energie als Licht einer anderen, wiederum für sie spezifischen Wellenlänge, abstrahlen (Emissionswellenlänge, E1 und E2). Die Besonderheit von F2 liegt darin, dass seine Anregungswellenlänge A2 genau der Emissionswellenlänge E1 des anderen Fluorochroms entspricht. Daraus ergibt sich ein Energietransfer, wenn die beiden Fluorochrome sich in ausreichender räumlicher Nähe zueinander befinden. Statt E1 zu emittieren, überträgt das Fluorochrom F1 dann nach Anregung durch Licht seiner Anregungswellenlänge A1 die Energie direkt auf das andere Fluorochrom, das daraufhin seine spezifische Wellenlänge E2 emittiert. Auf diese Weise können Oligodesoxynukleotide (ODN), an die diese Fluorochrome gebunden sind (Hybridisierungssonden), durch Messung von E1 und / oder E2 und deren Zu- oder Abnahme relativ zueinander lokalisiert werden.

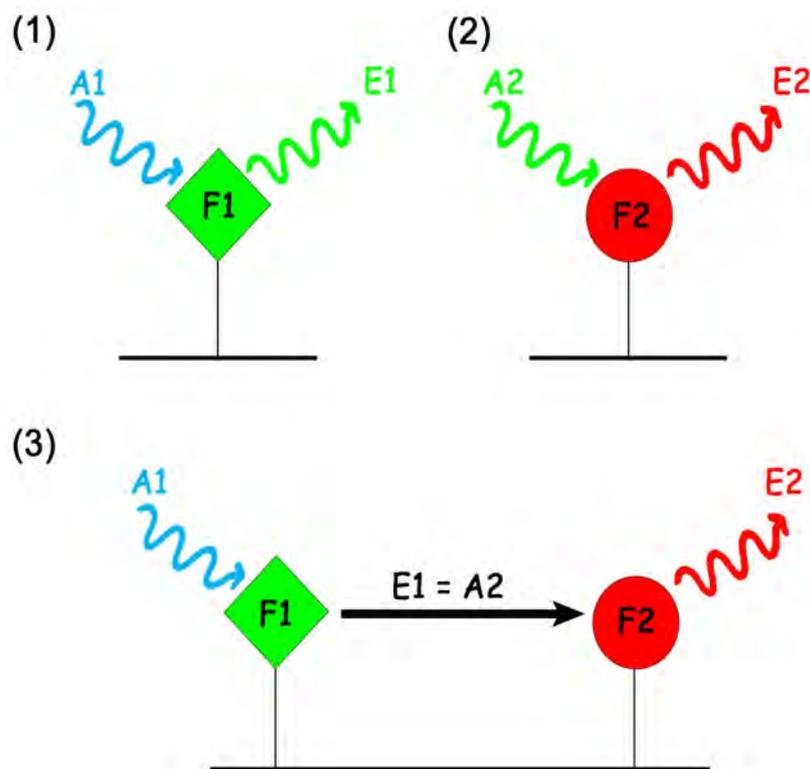


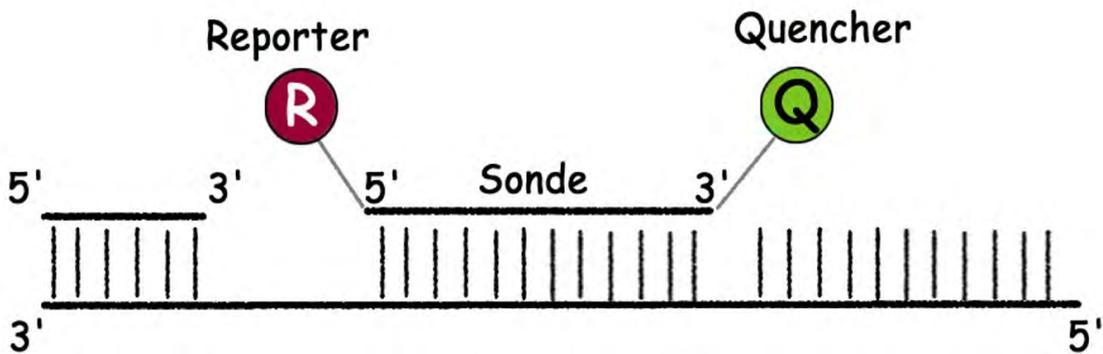
Abb. 31: Das Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

(1) Fluorochrom 1 (F1) mit der Anregungswellenlänge A1 emittiert nach Anregung Licht der Wellenlänge E1. Diese entspricht der Anregungswellenlänge (A2) des Fluorochroms 2 (F2), das nach Anregung E2 emittiert (2). Der Energietransfer findet bei ausreichender räumlicher Nähe der beiden Fluorochrome zueinander statt (3). Die Emission von E1 wird hier unterdrückt, während E2 messbar ist. Modifiziert nach (Livak et al., 1995).

Durch Hybridisierung der Sonden mit DNA-Fragmenten haben sich verschiedene Möglichkeiten der Echtzeit-Quantifizierung von DNA-Amplifikaten ergeben: Bei der weit verbreiteten *TaqMan*®-Sonde (Abb. 32) handelt es sich um ein ODN, an das beide Fluorochrome gebunden sind (z.B. an dessen 3'- und 5'-Ende). F1 wird hier als Reporter bezeichnet, dessen Emission der Wellenlänge E1 durch die räumliche Nähe zu F2, in diesem Zusammenhang als Quencher bezeichnet, weitge-

hend unterdrückt wird. Durch die Polymeraseaktivität wird die Sonde abgebaut und Reporter und Quencher auf diese Weise voneinander entfernt. Die dadurch ermöglichte Emission von E1, die proportional zur Vermehrung des Templates ansteigt, wird detektiert (Holzapfel & Wickert, 2007). Die Verwendung eines Quenchers, der im Anschluss an den Energie-Transfer selbst keine Strahlung emittiert (non-fluorescent quencher, NFQ), vermindert die Hintergrundfluoreszenz. Außerdem kann die Bindung zwischen Sonde und DNA-Template durch einen sog. „Minor Groove Binder“ (MGB) am 5'-Ende der Sonde verbessert werden. Dieser erhöht den Schmelzpunkt der Verbindung und damit die Sensitivität des Assays, unter anderem durch eine gesteigerte Effizienz der Auslöschung durch den Quencher (Kutyavin et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden *TaqMan*®-Sonden mit 5'-MGB und 3'-NFQ verwendet (siehe S. 102).

(1)



(2)

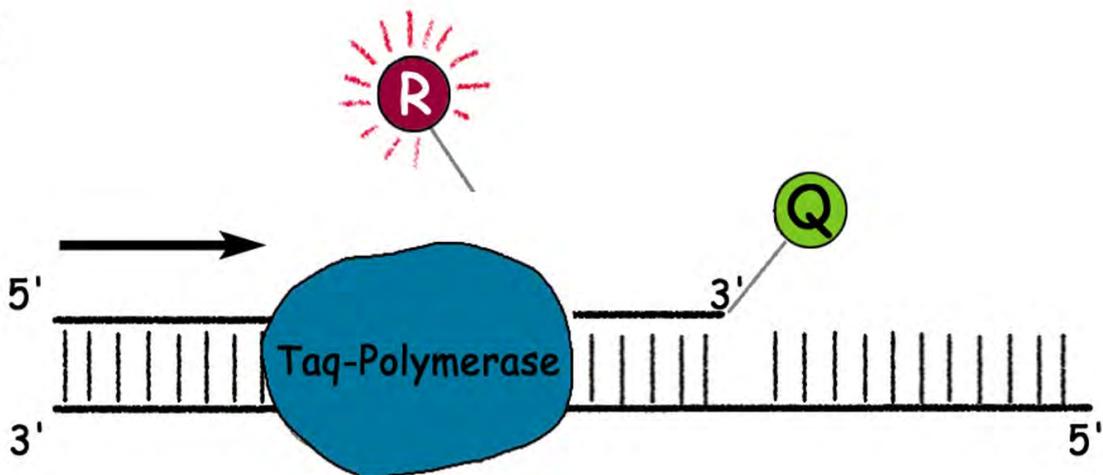


Abb. 32: Funktionsweise der *TaqMan*®-Sonde am Beispiel eines Einzelstrangs

Die Sonde hybridisiert mit einem Bereich des DNA-Fragments, der der Bindungsstelle des Primers nachgeschaltet ist. (1) Fluorochrom 1, hier als Reporter bezeichnet, wird durch die räumliche Nähe zu Fluorochrom 2, dem Quencher, an der Emission seiner spezifischen Wellenlänge nach Anregung durch Licht seiner Anregungswellenlänge gehindert. (2) Während der Synthese des komplementären Strangs durch die Taq-Polymerase wird die Sonde zerstört und die Emission durch den nun abgelösten Reporter kann detektiert werden. Frei nach Holzapfel & Wickert (2007), Mülhardt (2009).

Relative Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgt bei diesem Ansatz nicht auf Basis einer gemessenen Gesamtmenge an Amplifikat, sondern ergibt sich aufgrund der detektierten Reaktionskinetik. Dabei wird zunächst die Schwelle bestimmt, an der das Signal erstmalig die Hintergrundfluoreszenz überschreitet (Threshold, Abb. 33). Zu diesem Zeitpunkt der Reaktion kann noch von einer exponentiellen Vermehrung ausgegangen werden (Pfaffl, 2004). Der Zyklus, an dem diese Schwelle erstmalig überschritten wird, bildet den C_T -Wert (cycle threshold oder threshold cycle, Abb. 33). Auf dieser Grundlage kann zum Einen durch Vergleich mit den C_T -Werten einer Standardkurve die tatsächliche Menge des Templates, die ursprünglich im Reaktionsansatz vorlag, festgestellt werden (absolute Quantifizierung). Die relative Quantifizierung auf Grundlage der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, beschreibt hingegen die relative Expressionsänderung eines Zielgens in Relation zu einer Referenzgruppe (Livak & Schmittgen, 2001), die „relative quantity“ (Relative Menge, RQ). Für ihre Berechnung erfolgt zunächst der Vergleich der Zielgenexpression mit einer Referenzexpression, d.h. der Expression eines ubiquitär und homogen exprimierten sog. „housekeeping“ Gens wie beispielsweise β -Aktin (Pfaffl, 2004), auch als endogene Kontrolle oder Referenzgen bezeichnet. Diese sog. Normalisierung soll Variationen zwischen Proben, die auf Gewebeunterschieden, unterschiedlich effektiver mRNA-Extraktion oder variierenden Mengen an eingesetztem Template beruhen, eliminieren, da derartige Einflüsse das „housekeeping“ Gen in gleichem Maße betreffen wie das untersuchte Zielgen (Livak & Schmittgen, 2001). Die Differenz zwischen Ziel- und Referenzgenexpression liefert zunächst den ΔC_T -Wert (Tab. 8). Zusätzlich erfolgt dann der Vergleich der Zielgenexpressionen der Proben mit einer Referenzprobe, dem sogenannten Kalibrator, der im einfachsten Fall eine Probe der Kontrollgruppe mit basaler Expression des untersuchten Gens darstellt (Holzapfel & Wickert, 2007; Livak & Schmittgen, 2001) und die Grundlage der Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes ist. Die RQ an exprimiertem Zielgen in den einzelnen Proben als n-fache Expression der Referenzprobe ergibt sich durch die Berechnung von $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Pfaffl, 2004).

Diese Art der Berechnung setzt voraus, dass die Effizienz der PCR jeweils optimal war, d.h. in jedem Zyklus eine Verdopplung der Template-Menge stattgefunden hat, was als Effizienz von 100 % (Holzapfel & Wickert, 2007; Pfaffl, 2004) bzw. 1 (Livak & Schmittgen, 2001) bezeichnet wird. Wegen der Verdopplung der DNA wird eine optimale Effizienz häufig auch mit 2 angegeben (Livak & Schmittgen, 2001). Außerdem muss durch gleichbleibende Reaktionsbedingungen gewährleistet sein, dass die Effizienz der Amplifikation des Referenzgens genauso hoch ist wie die der Zielgenamplifikation (Chomczynski & Sacchi, 1987). Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten relativen Quantifizierungen von Genen mittels *real-time* PCR wurde eine optimale Effizienz von 100 ± 10 % vom Hersteller der jeweiligen *TaqMan*® Gene Expression Assays bei der Verwendung des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems garantiert.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf

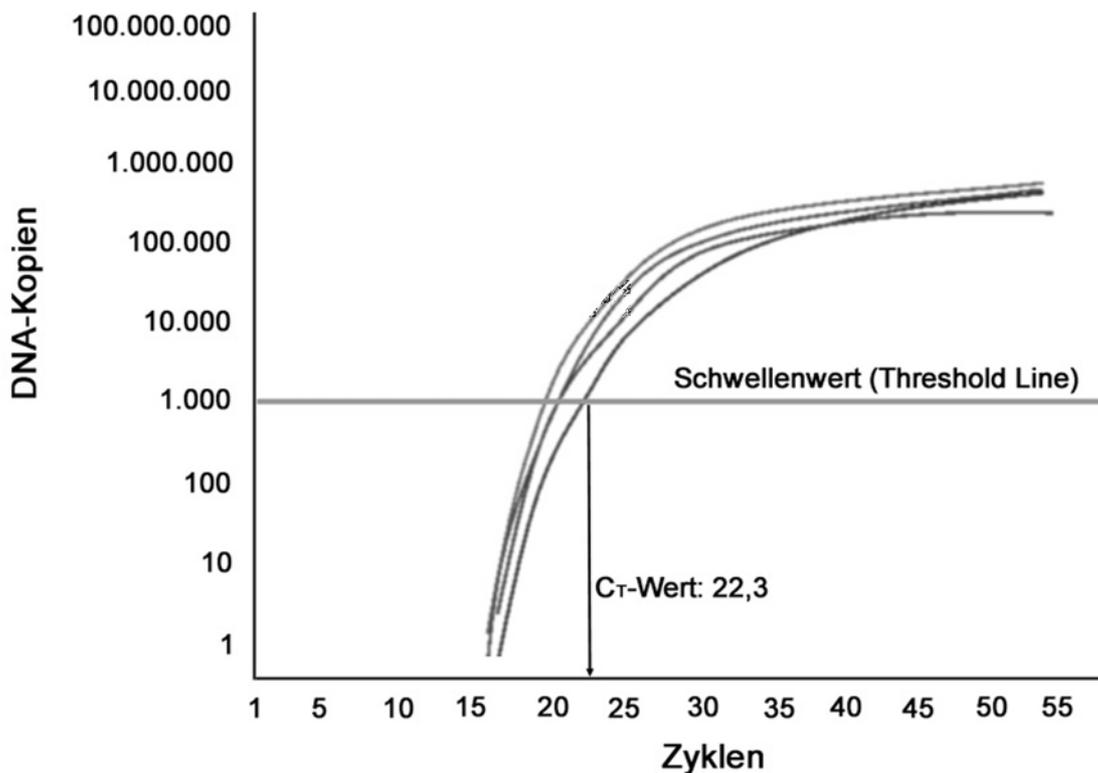


Abb. 33: Darstellung des Schwellenwertes und Herleitung des C_T -Wertes

Das Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz (Threshold Line) liegt in der exponentiellen Phase der PCR. Der C_T -Wert entspricht der Anzahl der Zyklen zu diesem Zeitpunkt (Pfeil). Modifiziert nach: Applied Biosystems „Real Time PCR vs Traditional PCR vs Digital PCR“.

Variable	Rechnung
ΔC_T	$C_T\text{-Zielgen} - C_T\text{-Referenzgen}$
$\Delta\Delta C_T$	$\Delta C_T\text{-Zielgen} - \Delta C_T\text{-Zielgen der Referenzprobe}$
RQ	$2^{-\Delta\Delta C_T}$

Tab. 8: Formeln zur Berechnung der RQ

3.3. RNA-Extraktion und -Aufbereitung

Die sog. „single-step“ Methode der RNA-Extraktion (Mülhardt, 2009) erlaubt für Hirngewebe eine ideale Ausbeute von 1-1,5 μg RNA pro mg Gewebe. Zunächst erfolgt eine mechanische Zerkleinerung z.B. durch Ultraschall, wodurch der Gewebeverband grob gelöst wird. Für den Zellaufschluss wird eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat (GTC, z.B. TRIzol[®]) genutzt. GTC denaturiert Proteine (Mülhardt, 2009), so dass neben der Zerstörung der Zellintegrität endogene RNasen inaktiviert und die Nukleoproteinkomplexe bei intakt bleibender RNA aufgebrochen werden. Phenol senkt zum Einen den pH und dient außerdem der Lösung von DNA-Fragmenten (Mülhardt, 2009). Bestandteile der extrazellulären Matrix, sowie Polysaccharide und DNA mit hohen Molekulargewichten lagern sich nach Zentrifugation als Bodensatz (Pellet) ab, während Fette sich an der Oberfläche des Überstandes ansammeln und so ebenfalls vom Überstand getrennt werden können. Für das polysaccharid- und fettreiche Hirngewebe ist dieser Zentri-

fugationsschritt daher entscheidend. Eine kurzzeitige Inkubation bei Raumtemperatur soll die vollständige Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe begünstigen. Chloroform löst als organisches Lösungsmittel nach gründlicher Durchmischung denaturierte Proteine sowie DNA aus dem Ansatz. Erneute Zentrifugation führt zu einer Phasentrennung. Die klare, wässrige Phase enthält die RNA, während sich Proteine und DNA in der organischen Phase ansammeln. Diese wird zusammen mit der Interphase entfernt. Durch die Verdrängung der Hydrathülle der Moleküle bewirkt Isopropanol ein Ausfällen der RNA aus der Lösung, so dass im Anschluss an diesen Schritt durch Zentrifugation ein gelartiges RNA-Pellet erzeugt wird. Waschschrte mit Ethanol und RNase freiem Wasser dienen der Entfernung von Isopropanol bzw. Ethanolresten. Letztendlich wird mit RNase freiem Wasser eine RNA-Lösung angesetzt. Die RNA-Konzentration der auf diese Weise gewonnenen Lösung kann photometrisch bestimmt werden. Dabei wird die Probe mit Licht von 260 nm Wellenlänge bestrahlt und die Absorption bzw. Extinktion der Lösung bestimmt. Dieser, auch als optische Dichte (optical density = OD) bezeichnete Messwert gibt Auskunft über die enthaltene Menge an RNA, wobei eine OD von 1 (bei einem pH von 7) einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

$$[\text{RNA}] = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ µg/ml}$$

Eine zusätzliche Messung der OD bei 280 nm mit anschließender Bildung der Ratio $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ dient der Bestimmung der Reinheit der Proben. Während reine RNA eine Ratio von 1,9 - 2,1 aufweist, zeigen niedrigere Werte (< 1,6) Verunreinigungen mit Phenol oder Proteinen an, deren Absorptionsmaximum basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste generell bei 280 nm liegt.

Durchführung

Das Gewebe, aus dem die RNA gewonnen wurde, stammte aus den Hypothalami bzw. dem direkt angrenzenden Gewebe und wurde wie in Kap. 1.5.2 beschrieben beim Anfertigen der Gehirnschnitte am Kryostat gewonnen (vgl. Abb. 26). Da dieses Gewebe aus den Hirnarealen zwischen den für immunhistochemische Untersuchungen benötigten Gebieten stammte, konnte ein und dasselbe Tier sowohl für die Immunhistochemie als auch für die PCR verwendet werden. Die durchschnittlich gewonnenen 30-100 mg Gewebe wurden bis zur Extraktion bei - 55°C gelagert. Um die Zerstörung der RNA durch RNasen zu verhindern, wurden Oberflächen und Geräte vor der Verwendung mit RNase ZAP® und 100 %igem Ethanol gereinigt. RNase-freies Wasser für die entsprechenden Arbeitsschritte wurde durch Versetzen von *Aqua bidest.* mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, S. 103) hergestellt, welches durch Bindung an primäre und sekundäre Amine zu kovalenten Bindungen führt und auf diese Weise die Aktivität der RNase stoppt (Weaver & Hedrick, 1997) und beim anschließenden Autoklavieren der Lösung zerfällt. Die Extraktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Arbeitsschritt	Bedingungen/Vorgehen	Dauer
Extraktion		
Ultraschallhomogenisierung	Zugabe von eiskaltem TRIzol zur Probe: 500 µl für >50 mg Gewebe bzw. 1000 µl für 50-100 mg Homogenisierung (Amplitude 40 %)	10-15 s
Zwischenreinigung des Ultraschallkopfes	70 % iges Ethanol, DEPC-H ₂ O	je 5 s
zentrifugieren	12000 rpm, 4°C	10 min
Überstand I abnehmen	neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit Pipette	
Trennung von Nukleoproteinen	RT	5 min
Zugabe von Chloroform	100 µl pro 500 µl TRIzol	
mischen		
Separation	RT	3 min
zentrifugieren	12000 rpm, 4°C	20 min
Überstand II abnehmen	klare Phase Überführen in ein mit Isopropanol gefülltes Reaktionsgefäß (250 µl pro 500 µl TRIzol)	
kräftig mischen	Vortex	10 s
Ausfällen	- 20°C	20-24 h
zentrifugieren	15000 rpm, 4°C	15 min
waschen des Pellets	mit 1 ml 70 % igem Ethanol	
zentrifugieren	15000 rpm, 4°C	10 min
waschen des Pellets	mit 1 ml 100 % igem Ethanol	
zentrifugieren	15000 rpm, 4°C	10 min
trocknen		20-25 min
RNA-Pellet lösen	in 20-100 µl DEPC-Wasser:	
Messung der Konzentration		
Herstellen der Messlösung	1 : 20 in DEPC-H ₂ O, 100-120 µl	
Messen im UV-Photometer	260 & 280 nm, Quarzküvette	

Tab. 9: Protokoll der RNA-Extraktion und -Quantifizierung

Die tatsächlich in der ursprünglichen Probe vorliegende RNA-Konzentration $[RNA]_T$ wurde durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der Messlösung ermittelt (Tab. 10). Da für die nachfolgende reverse Transkription eine RNA-Konzentration von 250 ng/µl angestrebt wurde, konnte das noch zur Probe hinzuzufügende Volumen an DEPC-H₂O entsprechend berechnet werden.

Die auf diese Weise standardisierten Proben wurden direkt im Anschluss für die Reverse Transkription genutzt oder luftdicht versiegelt bei - 55°C gelagert.

Variable	Rechnung
RNA-Konzentration der Messlösung $[RNA]_M$	$[RNA]_M = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$
tatsächlich RNA-Konzentration der Probe $[RNA]_T$	$[RNA]_T = [RNA]_M \times 20$
Volumen an DEPC-H ₂ O zum Erreichen der Endkonzentration	$(PV \times [RNA]_T / 250 \text{ ng}/\mu\text{l}) - PV$ (PV = verbleibendes Probenvolumen)

Tab. 10: Rechenschritte zur Bestimmung der RNA-Konzentration und Standardisierung der Proben

3.4. cDNA Synthese - Reverse Transkription

Zur Durchführung der *real-time* PCR wurde ein cDNA-Template benötigt, welches mittels reverser Transkription aus der Proben-mRNA gewonnen wurde.

Das Prinzip der cDNA Synthese umfasst das Umschreiben eines mRNA-Templates in dsDNA durch eine RNA-abhängige DNA Polymerase, auch „Reverse Transkriptase“ genannt (Mülhardt, 2009), die von Retroviren exprimiert wird. Ebenso wie andere DNA-Polymerasen benötigt dieses Enzym einen Primer zur Initiierung der Reaktion. Da natürlich vorkommende mRNA in den meisten Fällen einen poly(A)-Schwanz (also eine Aneinanderreihung mehrerer hundert Adenin-Nukleotide, am 3' Ende) aufweist, kann ein Oligonukleotid, das nur aus komplementären Thymin-Nukleotiden besteht [Oligo(dT)], als Primer eingesetzt werden. Alternativ können zufällige Primer Hexamere einzeln oder in Kombination mit Oligo(dT)-Primern verwendet werden, was den Vorteil bietet, dass auch beschädigte mRNA transkribiert werden kann. DTT (Dithiothreitol) als Reduktionsmittel hilft neben der kurzzeitigen Erhitzung des Ansatzes auf 65 - 70°C bei der Aufspaltung von Sekundärstrukturen der mRNA, was diese für Primer und Polymerase leichter zugänglich macht. Die Reverse Transkriptase (z.B. aus dem Moloney murine leukemia virus M-MLV) synthetisiert bei 37 - 42°C einen zur mRNA komplementären DNA-Strang aus den im Ansatz vorliegenden dNTP, der als „first strand“ bezeichnet wird. Die folgende Synthese des komplementären DNA-Strangs erfolgt wiederum durch die Reverse Transkriptase, so dass am Ende doppelsträngige cDNA für die folgenden Schritte vorliegt. Abschließendes Erhitzen des Ansatzes auf 90°C inaktiviert das Enzym.

Durchführung:

Arbeitsschritt	Bedingungen/Vorgehen	Dauer
ansetzen	4 μl RNA (\triangleq 1 μg mRNA im Ansatz) mit 7 μl RT-Mix I / Reaktionsgefäß	
erhitzen	im <i>real-time</i> Cyclus, 65°C	10 min
abkühlen	4°C, auf Eis	
Zugabe RT-Mix II	9 μl pro Reaktionsgefäß	
erwärmen	im <i>real-time</i> Cyclus, 37°C	60 min
erhitzen	im <i>real-time</i> Cyclus, 90°C	5 min
abkühlen	4°C, auf Eis	
verdünnen	1 : 20 mit autoklaviertem H ₂ O	

Tab. 11: Protokoll der Reversen Transkription

Als Kontrolle der einzelnen Reaktionsschritte wurde jeweils ein Reaktionsgefäß mit 4 μl DEPC-H₂O anstelle der RNA (blank 1) bzw. 11 μl DEPC-H₂O anstelle des erhitzten ersten Ansatzes (blank 2) eingesetzt. Hiermit hätten eventuelle Verunreinigungen der verwendeten Lösungen mit RNA oder

DNA ohne Zugabe des eigentlichen Templates nachgewiesen werden können. 1 µl der verdünnten Lösung entsprach der cDNA die aus 50 ng Gesamt-RNA gewonnen wurde und war damit bereit für den Einsatz in der *real-time* PCR. Eventuelle Lagerung erfolgte bei - 20°C.

3.5. Durchführung der quantitativen *real-time* PCR

Die im Ansatz vorhandene cDNA-Menge entsprach etwa 5000 Kopien des jeweils zu amplifizierenden Templates (Mülhardt, 2009). Neben den Kontrollen blank 1 und -2 wurde als Kontrolle für diesen Reaktionsschritt 1 µl autoklaviertes H₂O statt der cDNA eingesetzt (blank 3), um wiederum mögliche Kontaminationen, hier des autoklavierten Wassers, auszuschließen.

Arbeitsschritt		Bedingungen/Vorgehen		Dauer
vorlegen		9 µl <i>real-time</i> Mix (S. 103) pro well in 96-well Platten		
Zugabe der cDNA		1 µl pro well		
erwärmen		<i>real-time</i> Cyclor	50°C (Aktivierung der Polymerase)	2 min
35 - 44	erhitzen		95°C (Denaturierung)	15 s
Zyklen	abkühlen		60°C (Annealing, Elongation)	30 s

Tab. 12: Protokoll der quantitativen *real-time* PCR

3.6. Auswertung und Statistik

Die C_T-Werte wurden über die endogene Kontrolle β-Aktin als Referenzgen normalisiert, als Kalibrator diente für jede Studie eine Probe der Kontrollgruppe, die idealerweise den kleinsten C_T-Wert aufwies. Die RQ wurde anhand oben genannter Formeln berechnet (Tab. 8). Die für jede Probe auf einer Doppelbestimmung basierenden RQ-Werte wurden für jede Versuchsgruppe nochmals arithmetisch gemittelt und graphisch jeweils mit Standardfehler dargestellt. Verglichen wurden mittels einfaktorieller ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc-Test jeweils alle Versuchsgruppen untereinander (verschiedene Zeitpunkte und Behandlung). Unterschiede wurden bei p < 0,05 als signifikant gewertet.

4. Western Blot

4.1. Materialien

Ge- und Verbrauch

Bezeichnung:	Typ:	Hersteller:
10-well Teflon Käbme,	Stärke 0,75 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
96-well Platte	Tissue Culture Plate	Sarstedt, Newton, NC, USA
Blotting-Paper		Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cellophan		Roth GmbH, Karlsruhe
Rahmen		Herstellung in der Campuswerkstatt
Gelgießstand	Mini PROTEAN II™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nitrozellulosemembranen	cat. 162-0150	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Chemikalien

Bezeichnung:	Hersteller:
1x Tris-Buffered Saline	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Acrylamid / Bisacrylamid (40 %; 37,5:1)	Applichem, Darmstadt
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Chalfont, UK
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bradford's Reagent; B6916	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA 98%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Laemmlipuffer (cat. 161-0737)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Magermilchpulver (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nonidet	Applichem, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor; P2714	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Plus Protein Western C-Standard Sample (Größenmarker)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail; P5726	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Running-Buffer (10 x)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
StrepTactin-HRP conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Applichem, Darmstadt
Tris	Roth GmbH, Karlsruhe
Tween® 20 SigmaUltra	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Lösungen und Puffer

Bezeichnung:	Zusammensetzung/Herstellung:
Antibody Buffer	5 % Magermilchpulver in TBS-T
Blocking Buffer	10 % Magermilchpulver in TBS-T
BSA Stocklösung (4 mg/ml)	in <i>Aqua bidest.</i> unter langsamer Erwärmung
Coomassie Blue staining solution	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % Ethanol, 10 % Eisessig ad. 100% <i>Aqua bidest.</i>
Destaining solution	50 % Methanol, 10 % Eisessig, ad. 100% <i>Aqua bidest.</i>

Bezeichnung:	Zusammensetzung/Herstellung:
Drying solution	4 % Glycerol, 20 % Ethanol ad. 100% <i>Aqua bidest.</i>
EDTA Stocklösung (0,5 M), autoklaviert	Ansatz in <i>Aqua bidest.</i> , Einstellen des pH mit NaOH auf 8,0
Laemmli Sample Buffer	62,5 mM Tris-HCl pH-6,8 / 25 % Glycerol, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblue
Laemmli Sample Buffer mit Reducing Agent	950 µl Laemmli Sample Buffer + 50 µl β-Mercaptoethanol
Lysispuffer	5 % Tris-HCl Stocklösung, 0,4 % EDTA Stocklösung, 1 % Nonidet ad 100 % <i>Aqua bidest.</i>
Lysispuffer-Mix	Lysispuffer mit 100 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail und 10 µl/ml Phosphatase Inhibitor
Running Buffer	Verdünnung von Running-Buffer (10 x) in <i>Aqua bidest.</i>
Sammelgelpuffer TBS (10x)	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH = 6,8 20 mM Tris, 500 mM NaCl
TBS-T	0,1 % Tween in TBS
Transfer Buffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH = 8,8
Tris-HCl Stocklösung (1M), autoklaviert	Ansatz in <i>Aqua bidest.</i> , Einstellen des pH mit HCl auf 7,5
Ansatz für Sammelgel (5 % SDS)	0,5 ml <i>Aqua bidest.</i> 0,5 ml Acrylamid 40% 1 ml Sammelgelpuffer 2 ml APS (0,21 %) 5 µl Temed
Ansatz für Trenngel (10 % SDS)	4 ml <i>Aqua bidest.</i> 2 ml Acrylamid 40% 2 ml Trenngelpuffer 25 µl APS (10 %) 5 µl Temed

Primärantikörper

Antigen:	Spezies, Typ:	Verwendete Verdünnung:	Katalog-Nr./ Hersteller:
β-Actin	rabbit polyclonal IgG	1:5000	cat. 2066; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NF-IL6	rabbit polyclonal IgG	1:300	sc-150 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Sekundärantikörper

aus Spezies:	gegen Spezies:	verwendete Verdünnung:	Katalog-Nr./ Hersteller:
HRP-donkey IgG	rabbit	1:2000	cat. sc-2313, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

4.2. Grundlagen der Methode

Der Western Blot ermöglicht es, auf einer Membran fixierte Proteine z.B. in Bezug auf ihr Molekulargewicht oder ihre relativen Anteile in einem Proteingemisch zu analysieren. Vor der Übertragung auf diese Membranen steht bei der Untersuchung von Proteingemischen zumeist die elektrophoretische Auftrennung der verschiedenen Proteine. Dies geschieht mit Hilfe von Acrylamid-Gelen, die das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten. Bei der SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) wandern SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld durch eine poröse Polyacrylamidmatrix in Richtung der Anode und können auf diese Weise auf ihrem Molekulargewicht basierend aufgetrennt werden („Molekularsiebeffekt“). Da die Proteine einerseits durch SDS und andererseits durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie Mercaptoethanol oder DTT denaturiert sind, können Tertiärstrukturen oder Ladungsunterschiede der Proteine sich nicht mehr auf das Laufverhalten auswirken und Protein-Protein-Wechselwirkungen werden verhindert. Somit ist eine genaue Bestimmung des Molekulargewichts anhand der Laufweite möglich (Rehm & Letzel, 2010; Shapiro et al., 1967; Weber & Osborn, 1969). Das Laemmli-System (Laemmli, 1970) ist am weitesten verbreitet und beinhaltet die Verwendung von Tris-Glycin-Puffer. Das Prinzip beruht hierbei auf einem Sammelgel mit 3 - 4 % Acrylamid, welches ein Trenngel mit 5 - 20 % Acrylamid überschichtet. Die erforderliche Konzentration an Acrylamid ergibt sich aus dem Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins.

Die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine werden im Western Blot auf eine adsorbierende Membran übertragen. Dabei werden häufig Nitrozellulose-Membranen genutzt, die nach Übertragung im elektrischen Feld die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen, nicht-kovalent an ihrer Oberfläche binden. Dabei wandern die Proteine aus dem Gel wiederum in Richtung der Anode und damit aufgrund der Schichtung des Blot (Abb. 35) zur Membran. Im Fall anderer Membranen wie Polyvinylidendifluorid (PVDF), positiv geladenem Nylon (+ Nylon) oder aus Polybren beschichteten Glasfasern (GF/C) treten dagegen ionische Wechselwirkungen auf (Rehm & Letzel, 2010).

Eine anschließende Immunfärbung, die mit den an der Membran fixierten Proteinen gut durchführbar ist, dient der Detektion bestimmter Proteine, die aufgrund ihrer Antigenität von spezifischen Antikörpern gebunden und so sichtbar gemacht werden können. Die Sättigung aller Proteinbindungsstellen (Blocking) der Membran ist die Grundvoraussetzung für eine spezifische Färbung und kann mit entfettetem Milchpulver, aber auch BSA, FKS, Tween 20 oder Gelatine erreicht werden. Der Detektion des Antigens mit nicht-markierten Primärantikörpern folgt eine Inkubation mit markierten Sekundärantikörpern, die wiederum an die primären binden und letztlich der Visualisierung von Menge und Lokalisation des Antigens dienen. Die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierten Antikörper werden durch Chemiluminiszenz sichtbar gemacht. Dabei katalysiert die Peroxidase die Oxidation von hinzugefügtem Luminol, welches daraufhin Licht emittiert. Diese Chemiluminiszenz kann entweder mit Hilfe lichtempfindlicher Filme oder einer Kamera dokumentiert werden. Sie beginnt mit Zugabe des Luminols und hält etwa 15 Minuten an (Rehm & Letzel, 2010). Ein parallel aufgetragener Größenmarker wird auf die gleiche Weise markiert und ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts detektierter Banden.

Auch Gele selbst können gefärbt werden, was z.B. der Überprüfung eines effizienten Proteintransfers dient. Dabei werden zunächst die Proteine durch Denaturierung und Ausfällung im Gel fixiert, was zumeist durch Ethanol/Essigsäure/Wasser Mischungen erreicht wird, die ein Färbemittel, wie

beispielsweise Coomassie Blue, enthalten. Die Empfindlichkeit liegt bei etwa 200 – 400 ng pro Bande (Rehm & Letzel, 2010).

4.3. Proteinextraktion und Aufbereitung

Das Gewebe, aus dem die Proteine extrahiert wurden, stammte aus den Hypothalami bzw. dem direkt angrenzenden Gewebe oder den beim Ausschneiden dieses Gebietes übrig bleibenden Anteilen des cerebralen Cortex (lateral und dorsal, Kap. 1.5.2, Abb. 26). Des weiteren wurden Teile des Stammhirns untersucht, die jeweils dem kaudal der *Area postrema* liegenden Anteil entsprachen. Es wurden ausschließlich Proben der zwei folgenden Gruppen analysiert: PBS i.p., 8 h und 100 µg/kg LPS i.p., 8 h. Bis zur Proteinextraktion lagerten die Proben bei - 55°C. Pro mg Gewebe wurde für die Proben mit einem Bedarf von 3 ml Lysispuffer-Mix gerechnet und die Proteinextraktion nach folgendem Protokoll (Tab. 13) vorgenommen. Die Proteinmenge wurde anschließend durch einen Protein Assay mit Bradford Reagenz anhand der Herstellerangaben bestimmt.

Die Farbreaktion im Bradford Assay (Bradford, 1976) beruht auf Komplexbildung von Coomassie Brilliant-Blue G-250 als Inhaltsstoff des Bradford Reagenz und Proteinen in der Lösung. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 zu 595 nm verschoben. Die messbare Zunahme der Absorption bei 595 nm ist dabei ein direktes Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung (Rehm & Letzel, 2010).

Zur Berechnung der jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden zunächst die OD-Werte der Standardkurve (y-Achse) in linearer Skala gegen die bekannten Proteinkonzentrationen aufgetragen (x-Achse) und die Regressionsgerade ermittelt (Abb. 34). Anhand dieser Eichkurve konnte nun aus der OD der zu bestimmenden Proben die Proteinkonzentration berechnet werden (Tab. 14). Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der Messlösung ergab die ursprüngliche Konzentration der Probe. Abschließend wurde die benötigte Menge an *Aqua bidest.* berechnet, um aus je 50 µl der Proben eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 µg/µl herzustellen. Die Gebrauchslösungen wurden bis zur Weiterverwendung luftdicht abgeschlossen bei - 55°C gelagert.

Arbeitsschritt	Bedingungen/Vorgehen	Dauer
Extraktion		
Ultraschallhomogenisierung	Zugabe Lysispuffer-Mix (S. 115) Homogenisierung (Amplitude 40 %) auf Eis	10-15 s
Zwischenreinigung des Ultraschallkopfes	70 % iges Ethanol, H ₂ O (steril)	
Inkubation	auf Eis	30 min
zentrifugieren	14000 rpm, 4°C	10 min
Überstand I abnehmen		
Protein Assay mit Bradford Reagenz		
Herstellen einer Standardkurve	Grundlage: BSA-Stocklösung (4 mg/ml)	
	Standard Nr.	Konzentration BSA
	1	1,2 mg/ml
	2	1 mg/ml
	3	800 µg/ml
	4	600 µg/ml
	5	400 µg/ml
	6	300 µg/ml
	7	200 µg/ml
	8	150 µg/ml
	9	100 µg/ml
10	blank (<i>Aqua bidest.</i>)	
Herstellung der Messlösungen	Proben 1 : 100 in <i>Aqua bidest.</i>	
Beschickung der Platte	je 5 µl eines Standards bzw. der Probe, Doppelbestimmung, blanks mit je 5 µl Lysispuffer, auf Eis	
Start Assay	pro well 250 µl Bradford Reagenz zufügen	
mischen		30 s
Inkubation	lichtgeschützt, bei RT	4-45 min
Messung der Absorption	im ELISA-Reader bei 620 nm	

Tab. 13: Protokoll der Proteinextraktion und -aufbereitung

Variable	Rechnung
Proteinkonzentration der Messlösung [Protein] _M (µg/ml)	$[\text{Protein}]_M = (y - b) / m$
tatsächliche Konzentration der Probe [Protein] _T (µg/µl)	$[\text{Protein}]_T = [\text{Protein}]_M \times 100 / 1000$
Verdünnungsfaktor (V) zum Erreichen der Endkonzentration	$V = [\text{Protein}]_T / 10 \text{ µg/µl}$
Probenvolumen zur Herstellung der Gebrauchslösung (µl)	50
zuzugebendes Volumen an <i>Aqua bidest.</i> zum Erreichen der Endkonzentration (µl)	$50 \times V - 50$

Tab. 14: Rechenschritte zur Bestimmung der Protein-Konzentration und Herstellung der Gebrauchslösungen

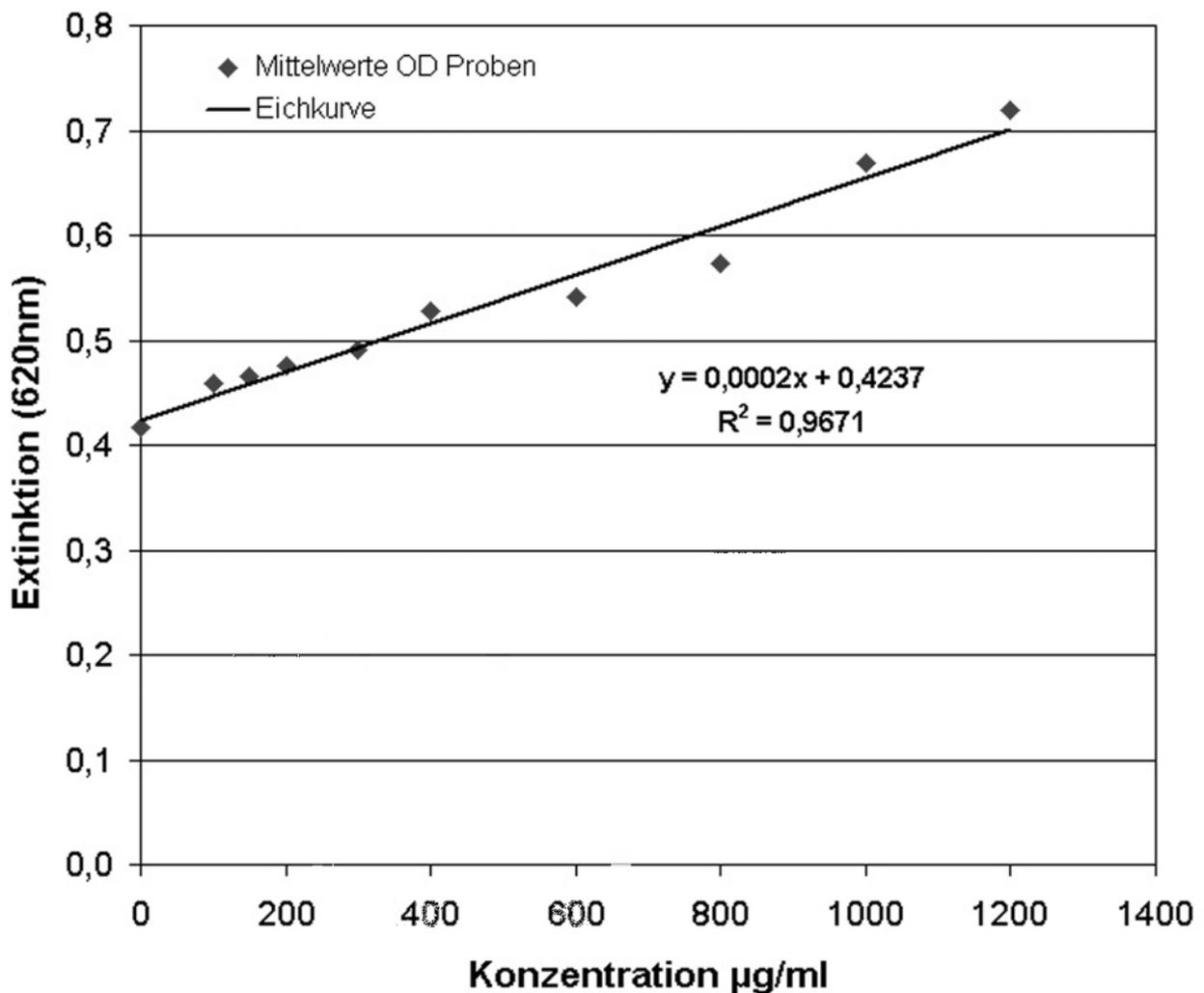


Abb. 34: Exemplarische Eichkurve eines Proteinassays

Die Regression liegt annähernd bei 1. Die Protein-Konzentration (y) der Proben kann anhand der Funktionsvorschrift $(y) = m \times x + b$ berechnet werden. Der lineare Wertebereich liegt zwischen 0,1- und 1,4 mg/ml.

4.4. Durchführung des Western Blot

Die Protein-Gebrauchslösungen wurden nach folgendem Protokoll eingesetzt:

Arbeitsschritt	Bedingungen/Vorgehen	Dauer
Herstellen des Acrylamid-Gels (10 %)		
Trenngel gießen	Trenngelansatz (S. 115), 3,6 ml Ansatz pro Kammer, Überschichtung mit Isopropanol	
Polymerisation	RT	60-90 min
Isopropanol entfernen	Filterpapier	
waschen	Grenzfläche des Trenngels, mit Sammelgelansatz (S. 115)	
Sammelgel gießen	Sammelgelansatz (S. 115)	
Gelkamm einsetzen		
Polymerisation	RT	30 min
Probenvorbereitung		
Probenansatz	1 : 1 mit Sample Buffer (5 % β -Mercaptoethanol, S. 115)	
Denaturierung	95°C, Heizblock	5 min
Elektrophorese		
Vorbereitung der Gelkammer	Füllen mit Running Buffer	
Spülen der Geltaschen	mit Running Buffer	
Gelbeladung	je 10 μ l des Probenansatzes pro Geltasche einfüllen, 4 μ l des Größenmarkers (S. 114)	
elektrophoretische Auftrennung der Proteine	120 V	120 min
Blot		
Vorbereitung der Membran	an die Maße des Gels anpassen, Inkubation in Transfer Buffer	30 min
Vorbereitung des Gels	Inkubation in Transfer Buffer (S. 115)	15 min
Aufbau der Blot-Schichten (Abb. 35)	Entfernung eingeschlossener Luftblasen	
Blot (Semy-Dry-Verfahren)	3 mA/cm ² , 15 V	45 min
Immundetektion		
waschen der Membran	TBS-T	3 x 5 min
Inkubation I	mit Blocking Buffer (S. 114), RT	120 min
Inkubation II	mit Primärantikörper (S. 115) in Antibody Buffer (S.114), 4°C	20-24 h
waschen der Membran	TBS-T	3 x 5 min
Inkubation III	Sekundärantikörper (S. 115) bzw. HRP-Konjugat (Detektion des Größenmarkers, S.114) in Antibody Buffer	60 min
waschen der Membran	TBS-T	3 x 5 min

Tab. 15: Protokoll Western Blot

Somit betrug die Menge an Proteinlysate, die pro Gelflasche eingesetzt wurde, 50 µg. Anschließend an den letzten Schritt des Protokolls war die Membran bereit für die Detektion im Molecular Imager® (Kap. 4.5.).

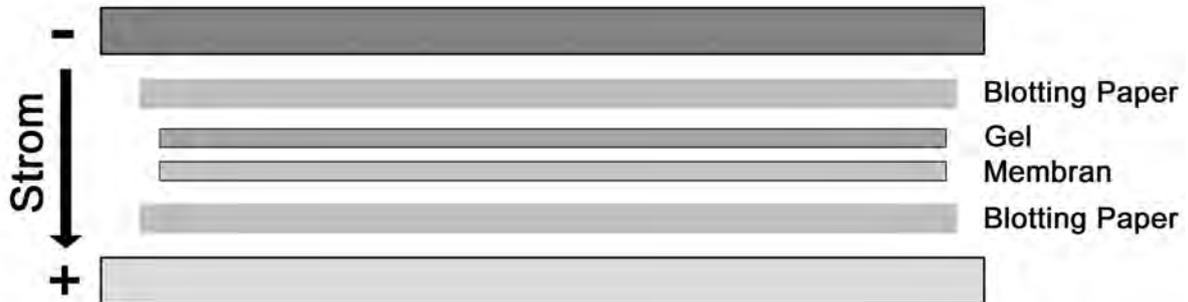


Abb. 35: Schematischer Aufbau des Western Blot

Die negativ geladenen Proteine wandern entlang des elektrischen Gradienten in Richtung der Anode (+) und werden so als Abbild des Gels auf die Membran übertragen, auf der sie nicht mehr mobil sind.

4.5. Detektion, Auswertung und Statistik

Die im ECL-Kit (Elektrochemiluminiszenz; S. 114) enthaltenen Lösungen A und B wurden nach Herstellerangaben gemischt (40 : 1) und die Membran 5 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem Ansatz inkubiert (0,1 ml/cm²). Nach Entfernen der überschüssigen Lösung wurde die Membran blasenfrei mit einer Klarsichtfolie umschlossen und war damit bereit für die Dokumentation. Die Chemoluminiszenz wurde im Molecular Imager® bewertet und Aufnahmen nach verschiedenen Belichtungszeiten hergestellt. (10 - 60 Sekunden). Die entsprechenden Banden wurden mit der integrierten Software (Quantity One®) hinsichtlich des Molekulargewichts und des Schwärzungsgrades analysiert, welcher direkten Aufschluss über die Proteinmenge gab (Abb. 36).

Auf diese Weise ermittelte Proteinmengen wurden für beide Gruppen als arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (Excel®). Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 5\%$ angesehen, die entsprechende Analyse umfasste jeweils den Gruppenvergleich durch den parametrischen t-Test (Prism®).

4.6. Gelgegenfärbung

Um den korrekten Übertritt der Proteine vom Gel auf die Membran unter den gegebenen Blot-Bedingungen zu überprüfen, wurden die im Gel verbleibenden Proteine angefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst für 3 Stunden mit Coomassie Blue staining solution (S.114) inkubiert und anschließend mit Destaining solution unter mehrmaligem Wechseln der Lösung so lange wieder entfärbt, bis der Gelhintergrund transparent war. Nach der zweistündigen Inkubation in Drying solution, was das Brechen des Gels während der Trocknung verhinderte, konnte das Gel in einer Cellophanhülle, eingespannt in einen Rahmen, getrocknet werden.

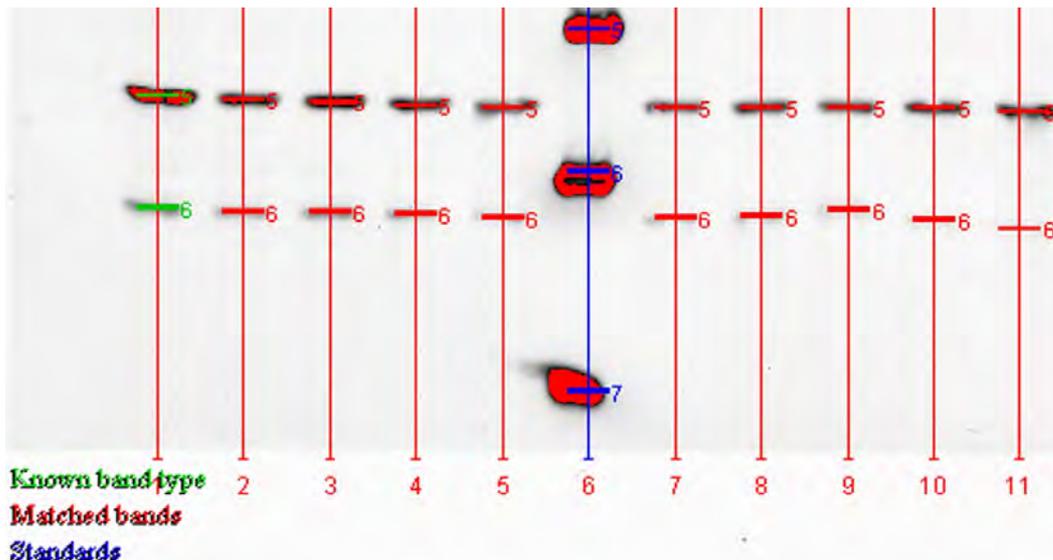


Abb. 36: Messung von Proteinmenge und Molekulargewicht der detektierten Banden auf der Membran (Quantity One® Software)

Die von der Software als Bande erkannten Schwärzungsbereiche der Membran sind entlang der Bahnen (1 - 11) nummeriert (grün, rot: 5, 6). Die blauen Ziffern stehen für die Banden des Größenmarkers, Bande 5 entspricht hier einem Molekulargewicht von 50.000 kDa, Bande 6 zeigt 37.000 kDa an und Bande 7 steht für 25.000 kDa. So können die Molekulargewichte der detektierten Banden 5 (ca. 42 kDa) und 6 (ca. 35 kDa) visuell und rechnerisch ermittelt werden.

III. ERGEBNISSE

III.A. Charakterisierung der NF-IL6 Aktivität im Verlauf LPS-induzierter Entzündungsreaktionen

1. Charakterisierung der Entzündungsreaktionen im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der LPS-Dosis

Als Basis für die Untersuchungen zur Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-IL6 im Rahmen zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome diente das weit verbreitete und vielfach verwendete Modell einer LPS-induzierten, systemischen Inflammation (Kap.I., 5.1., S. 51). Nach LPS-Stimulation konnten physiologische Endpunktparameter solch einer systemischen Entzündungsreaktion gut reproduzierbar anhand charakteristischer Reaktionen wie Fieber und „sickness-behavior“ dokumentiert werden. Außerdem diente die Aufzeichnung dieser Symptome der Erkennung möglicher zeitlicher oder dosisbezogener Korrelationen zwischen dem Auftreten der Krankheitssymptome und der NF-IL6-Aktivierung bzw. der Festlegung günstiger Zeitpunkte und Dosen für weitere Studien. In diesem ersten Teilprojekt meiner Doktorarbeit sollte hiermit auch die funktionale Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors im Verlauf systemischer Inflammationen näher beleuchtet werden.

1.1. Physiologische Parameter

1.1.1. Körperkerntemperatur

Die intraperitonealen Injektionen (100 µg/kg KM LPS oder PBS) erfolgten für alle Gruppen jeweils zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten. Die abdominale Körperkerntemperatur wurde in der Gruppe der mit 100 µg/kg KM LPS injizierten Tiere vom Zeitpunkt $t = -120$ Minuten bis zum Versuchsende nach 240-, 360-, 480- oder 600 Minuten aufgezeichnet. Nach einer initialen, 45 minütigen Hypothermie, bei der die Körperkerntemperatur bis zu ca. 0,8°C abfiel (Tab. 16), entwickelte sich 240 Minuten nach LPS-Gabe ein mehrphasiges Fieber (Abb. 37). Der zunächst stetige Temperaturanstieg mündete schließlich nach etwa 360 Minuten in eine Plateauphase, die auch am Endpunkt der Messungen, nach 600 Minuten, noch nicht beendet war, obwohl zu diesem Zeitpunkt der Beginn einer Temperaturerniedrigung bereits erkennbar war.

Für die Tiere, die eine höhere Dosis LPS von 1 mg/kg KM erhalten hatten, erfolgte die Temperatureaufzeichnung vom Zeitpunkt $t = -120$ Minuten bis zum Versuchsende nach 480 Minuten. Hier setzte die anfängliche Hypothermie früher ein, dauerte doppelt so lange und nahm signifikant stärkere Ausmaße an als in der 10 fach niedriger dosierten Gruppe (Tab. 16). So senkte sich die Körperkerntemperatur bis zu 1,7°C ab und unterschritt dabei 36°C. Das darauf folgende Fieber entwickelte sich erst nach 360 Minuten, also 120 Minuten später als in der niedrig dosierten Gruppe, und erreichte bei einer signifikant niedrigeren Maximaltemperatur bis zum Versuchsende nicht das gleiche Temperaturniveau. (Abb. 38).

Die intraperitoneale Applikation des entsprechenden Volumens PBS löste in beiden Kontrollgruppen keine Abweichungen von der Durchschnittstemperatur aus ($\sim 37,5$ °C), die durchschnittliche Körperkerntemperatur aller Kontrolltiere lag im Versuchszeitraum (10 Tagesstunden) bei $37,77 \pm 0,12$ °C. Auch die circadiane Rhythmik des Temperaturverlaufs wurde nicht beeinflusst:

PBS-behandelte Tiere, deren Temperaturdaten nach der Injektion für 24 Stunden aufgezeichnet worden waren, zeigten einen typischen Anstieg der Körperkerntemperatur um durchschnittlich 0,5°C während der Dunkelphase (Daten nicht gezeigt).

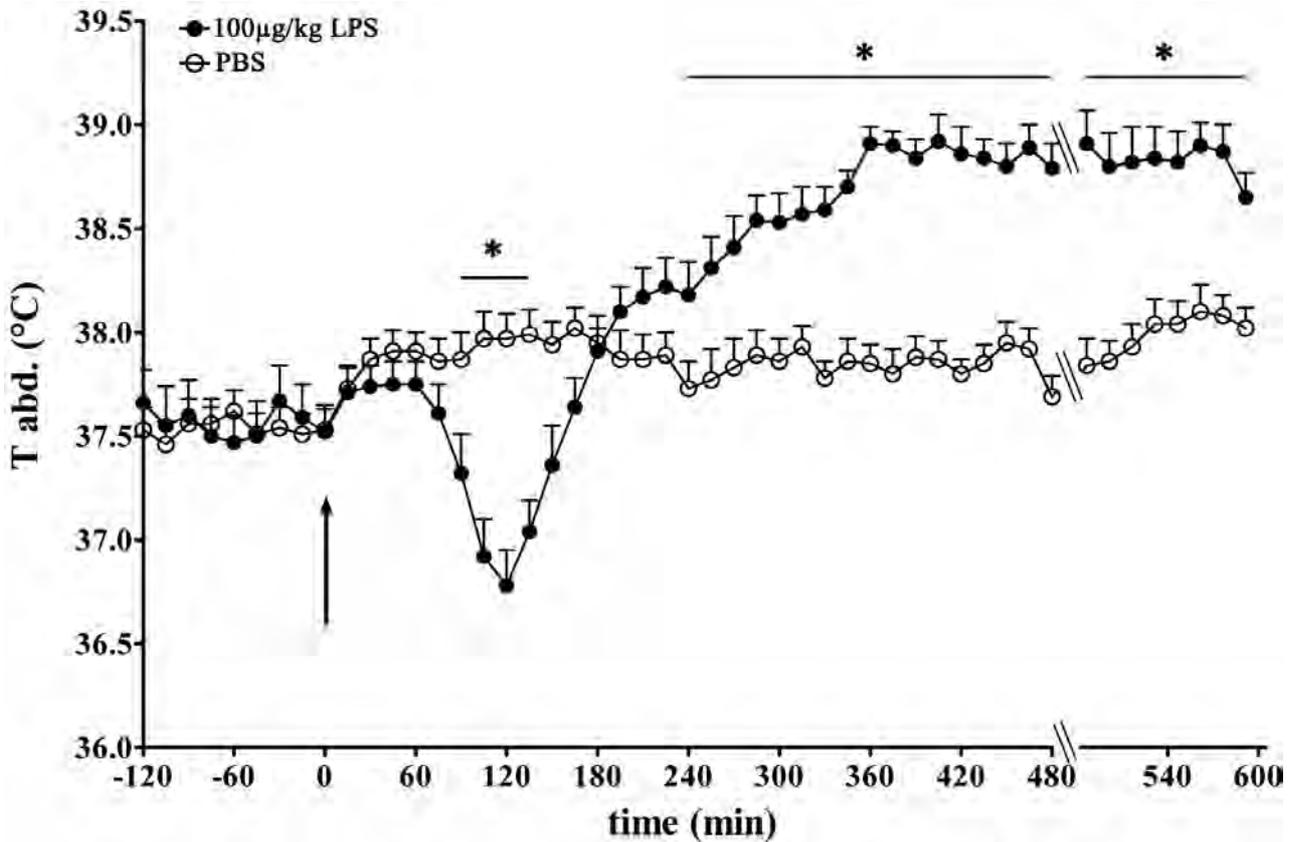


Abb. 37: Verlauf der intraabdominal gemessenen Körperkerntemperatur nach Injektion von 100 µg/kg KM LPS bzw. PBS innerhalb von 10 h

Der Zeitpunkt der Injektion ist mit einem Pfeil markiert. Die veränderlichen Tierzahlen ergeben sich aus den verschiedenen Endpunkten der Versuchsgruppen: Bis zum Zeitpunkt $t = 480$ min wurden die Tiere der Endpunkte 8-, 10-, und 24 h verwendet, für den anschließenden Zeitraum die 10- und die 24 h Gruppen; * $P < 0,05$. Tierzahlen: Siehe Tab. 16.

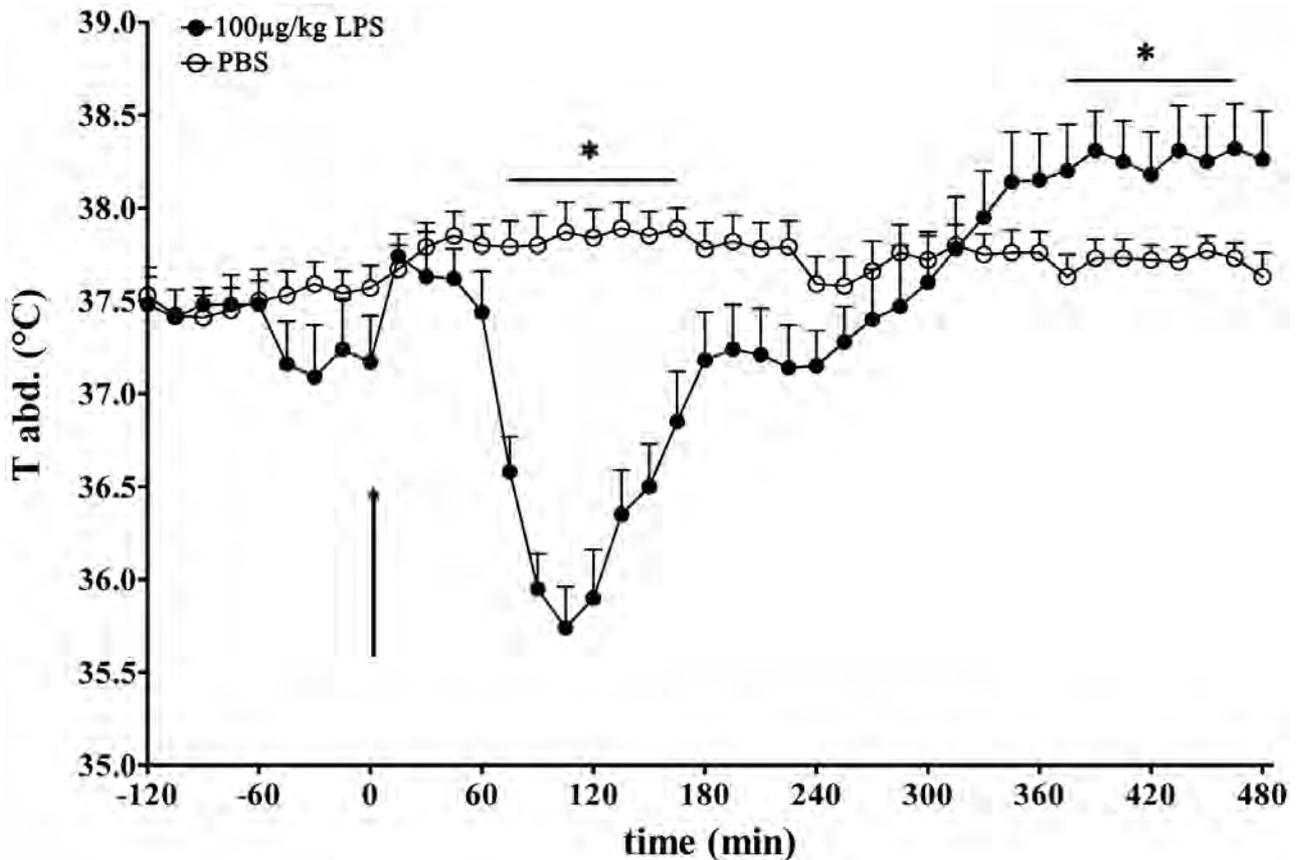


Abb. 38: Verlauf der intraabdominal gemessenen Körperkerntemperatur nach Injektion von 1 mg/kg KM LPS bzw. PBS innerhalb von 8 h

Der Zeitpunkt der Injektion ist mit einem Pfeil markiert. * $P < 0,05$, Tierzahlen: Siehe Tab. 16.

	100 µg/kg LPS i.p.	1 mg/kg LPS i.p.
n	-120 – 480 min: n = 11; 495 – 600 min: n = 6	n = 7
Hypothermie	t = 90 bis t = 135 min	t = 75 bis t = 165 min
Dauer Hypothermie	45 min	90 min
Beginn Fieber	t = 240 min	t = 360 min
Maximaltemperatur (*)	38,97 ± 0,16°C; bei t = 485 min	38,32 ± 0,24 °C, bei t = 465 min
Minimaltemperatur (**)	36,78 ± 0,17°C; bei t = 120 min	35,74 ± 0,22°C, bei t = 105 min
Ende Fieber	t > 600 min	t > 480 min
Dauer Fieber	> 360 min	> 120 min

Tab. 16: Zusammenfassende Darstellung des Temperaturverlaufs über 24 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: 100 µg/kg LPS i.p. und 1 mg/kg LPS i.p.; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; (Dauer von Hypothermie und Fieber wurden nicht statistisch verglichen).

1.1.2. Lokomotorische Aktivität

Die Aufzeichnungen der lokomotorischen Aktivität wurden für die Zeitpunkte 8- oder 24 Stunden im Anschluss an die Behandlungen vorgenommen. Die innerhalb von 24 Stunden nach LPS-Injektion gezählten Einzelaktivitäten („counts“) wurden nochmals in Tag- (Hellphase) und Nachtaktivität (Dunkelphase) untergliedert.

Innerhalb von 24 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von 100 µg/kg KM LPS zeigten die betreffenden Tiere eine signifikant, um über 50 % verminderte Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS, i.p., Tab. 17, Abb. 39). Dies ergab sich vor allem aus der stark verminderten Nachtaktivität der Tiere (Abb. 39, B), während in der Hellphase, die von Ratten physiologisch als Ruhephase genutzt wird, kaum Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen waren. Die höhere Dosis LPS von 1 mg/kg KM bewirkte eine noch drastischere Verminderung der lokomotorischen Aktivität (um 83 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch hier zeigte sich der Aktivitätsverlust vor allem in der Dunkelphase (Abb. 39, B). Somit war eine Verzögerung des Aktivitätsverlusts gegenüber der Fieberreaktion zu beobachten, welche zu Beginn der Dunkelphase schon im Abklingen begriffen war. Die Unterschiede zwischen den Gruppen, die mit unterschiedlichen LPS-Dosen stimuliert worden waren, erwiesen sich als nicht signifikant.

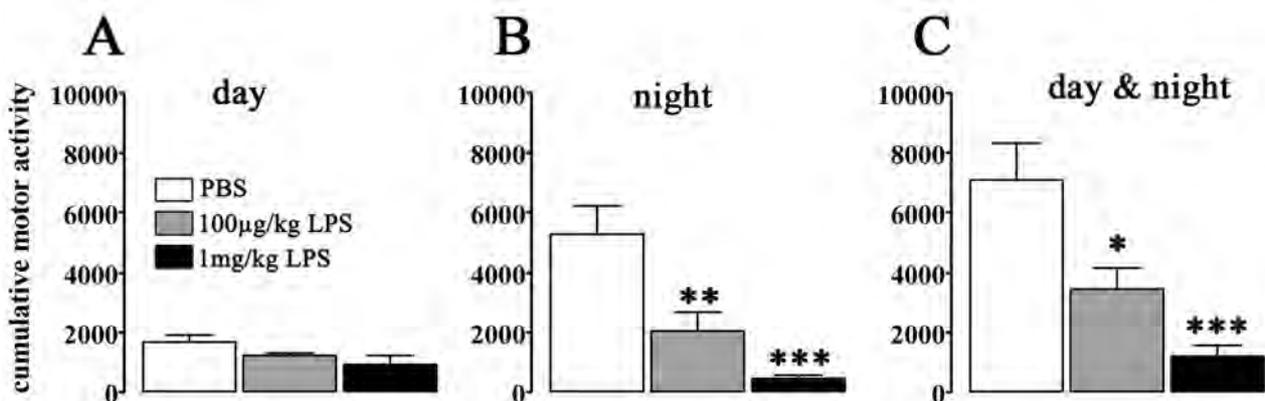


Abb. 39: Kumulative lokomotorische Aktivität nach intraperitonealer Injektion von PBS, 100 µg- oder 1 mg/kg KM LPS

Die Einzelaktivitäten („counts“) wurden für die 12 stündigen Hell- und Dunkelphasen (A, B), sowie für den 24 stündigen Gesamtzeitraum (C) analysiert. * Vergleich mit der Kontrollgruppe (PBS i.p.): * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Tierzahlen: Siehe Tab. 17.

	PBS i.p.	100 µg/kg LPS i.p.	1 mg/kg LPS i.p.
n	5	3	8
24 h Aktivität ("counts")	7081 ± 1240	3447 ± 716,4 *	1210 ± 352,9 **
Tagesaktivität (12 h, "counts")	1682 ± 230,2	1226 ± 84	932,6 ± 297,3
Nachaktivität (12 h, "counts")	5291 ± 927	2051 ± 632,4 **	455,8 ± 114,6 ***

Tab. 17: Gemittelte Zahlenwerte der kumulativen lokomotorischen Aktivität nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: PBS i.p., 100 µg/kg LPS i.p. und 1 mg/kg LPS i.p.; * Vergleich mit der Kontrollgruppe (PBS i.p.): * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

1.1.3. Futter- und Wasseraufnahme

Über den gesamten Versuchszeitraum von 8- bzw. 24 Stunden wurden die insgesamt aufgenommenen Mengen an Futter und Wasser aufgezeichnet. Die intraperitoneale Injektion von 100 µg/kg KM LPS bewirke eine signifikante Verringerung der in beiden Versuchszeiträumen aufgenommenen Futtermengen im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 40). Dabei sank die absolute Menge um 96 % (8 Stunden) bzw. 63 % (24 Stunden) (Tab. 18). Bei 10 fach höherer Dosis ergab sich für den Zeitraum 8 Stunden kein Unterschied (- 93 %), während Tiere dieser Versuchsgruppe über 24 Stunden nochmals signifikant weniger Nahrung aufnahmen als die niedrig dosierten Vergleichstiere, was einem Abfall von 97 % gegenüber der Kontrolle entsprach. In Bezug auf die Wasseraufnahme konnte der hemmende Einfluss der LPS-Stimulation erst für den 24 stündigen Zeitraum gezeigt werden (Abb. 41). Sowohl nach Injektion von 100 µg/kg KM LPS als auch als Reaktion auf die erhöhte Dosis von 1 mg/kg KM kam es zur signifikanten Verringerung der aufgenommenen Wassermenge. Dabei senkte sich der Konsum der Tiere aus der niedriger dosierten Gruppe durchschnittlich um 45 % gegenüber der mit PBS behandelten Kontrollgruppe, hochdosierte Tiere nahmen sogar 84 % weniger Wasser auf und unterschieden sich hiermit signifikant von der Gruppe 100 µg/kg KM LPS.

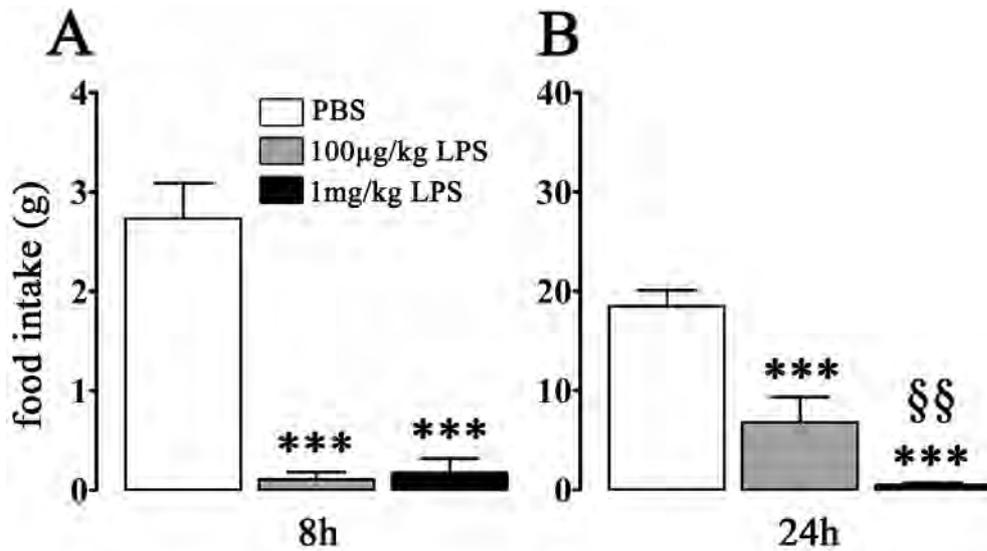


Abb. 40: Kumulative Futterraufnahme 8- oder 24 h nach intraperitonealer Injektion von PBS, 100 µg/- bzw. 1 mg/kg KM LPS

* Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS i.p.): *** P<0,001; § Vergleich zur Gruppe 100 µg/kg KM LPS i.p.: §§ P<0,01. Tierzahlen: Siehe Tab. 18.

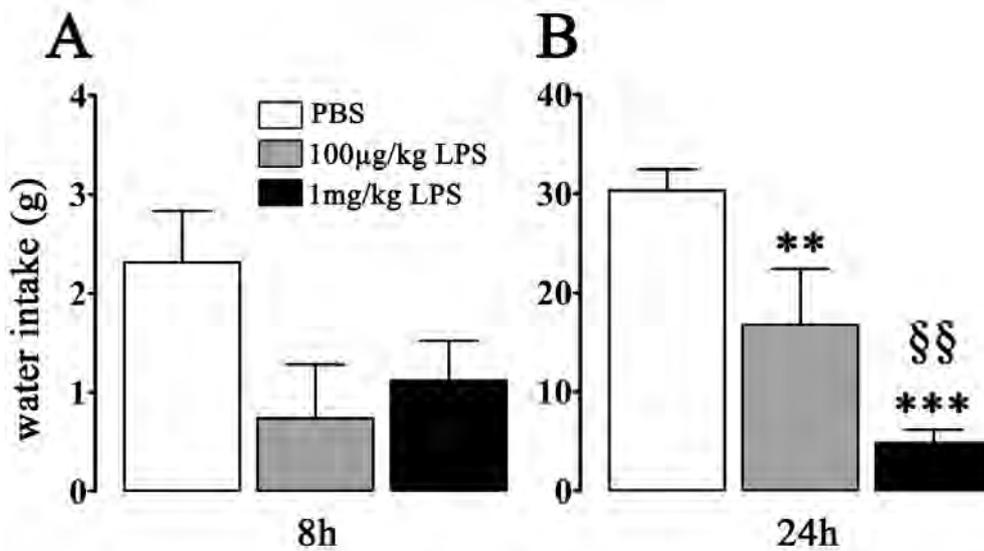


Abb. 41: Kumulative Wasseraufnahme 8- oder 24 h nach intraperitonealer Injektion von PBS, 100 µg/- bzw. 1 mg/kg KM LPS

* Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS i.p.): ** P<0,01, *** P<0,001; § Vergleich zur Gruppe 100 µg/kg KM LPS i.p.: §§ P<0,01. Tierzahlen: Siehe Tab. 18.

	PBS i.p.	100 µg/kg LPS i.p.	1 mg/kg LPS i.p.
8 h (Hellphase)			
n	15	11	12
Futteraufnahme (g)	2,73 ± 0,36	0,11 ± 0,07 ***	0,18 ± 0,14 ***
Wasseraufnahme (g)	2,31 ± 0,52	0,74 ± 0,55	1,12 ± 0,40
24 h			
n	6	3	8
Futteraufnahme (g)	18,48 ± 1,61	6,8 ± 2,56 ***	0,5 ± 0,23 ***; §§
Wasseraufnahme (g)	30,33 ± 2,14	16,77 ± 5,67 **	4,81 ± 1,35 **; §§

Tab. 18: Gemittelte Zahlenwerte der kumulativen Futter- und Wasseraufnahme innerhalb von 8- oder 24 h nach intraperitonealer Injektion.

Versuchsgruppen: PBS 1 ml i.p., 100 µg/kg LPS i.p. und 1 mg/kg LPS i.p.; * Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS i.p.): ** P<0,01, *** P<0,001; § Vergleich zur Gruppe 100 µg/kg KM LPS i.p.: §§ P<0,01

1.1.4. Körpermasse

Die Entwicklung der Körpermasse wurde durch Erhebungen vor und 24 Stunden nach den Versuchen dokumentiert. Während in der mit PBS behandelten Kontrollgruppe eine leichte Zunahme zu beobachten war, kam es in beiden LPS-stimulierten Gruppen zu einer deutlichen Abnahme der Körpermasse (Tab. 19, Abb. 42). Dabei verloren Tiere, die 1 mg/kg KM LPS erhalten hatten, signifikant mehr an Körpermasse als solche, die mit 100 µg/kg KM behandelt worden waren. Der Unterschied lag bei rund 9 g bzw., bezogen auf das jeweilige Ausgangsgewicht der Tiere, ca. 4 %. Entsprechend der geringeren Futter- und Wasseraufnahme nach Stimulation mit der erhöhten Dosis (1 mg/kg KM LPS) im Vergleich zur niedrigeren Dosis (100 µg/kg KM) (Kap. III.A, 1.1.4), nahm auch die Körpermasse in diesen Tieren signifikant stärker ab.

	PBS i.p.	100 µg/kg LPS i.p.	1 mg/kg LPS i.p.
n	6	3	8
Zu-/Abnahme (g)	4,22 ± 1,25	-17,37 ± 3,6 ***	-26,79 ± 1,66 ***; §§
Zu-/Abnahme (%)	1,49 ± 0,47	-5,37 ± 1,02 ***	-9,69 ± 0,51 ***; §§§

Tab. 19: Mittlere Zu- oder Abnahme der Körpermasse innerhalb von 24 h nach intraperitonealer Injektion.

Versuchsgruppen: PBS 1 ml i.p., 100 µg/kg LPS i.p. und 1 mg/kg LPS i.p.; * Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS i.p.): *** P< 0,001; § Vergleich zur Gruppe 100 µg/kg KM LPS i.p.: §§ P<0,01, §§§ P<0,01

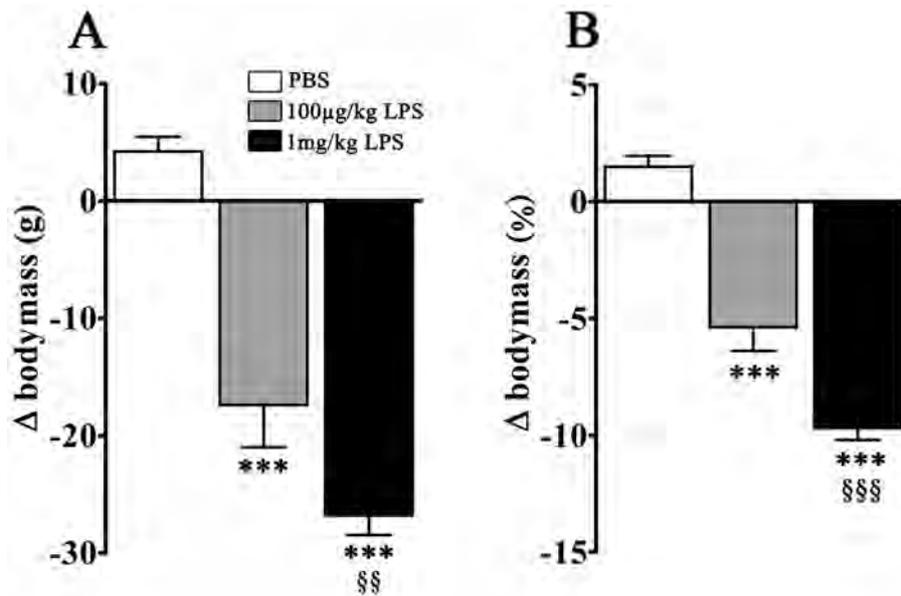


Abb. 42: Entwicklung der Körpermasse in Gramm bzw. Prozent innerhalb von 24 h nach intraperitonealer Injektion von PBS, 100 µg/- bzw. 1 mg/kg KM LPS

Die Tiere wurden direkt vor dem Versuch sowie zum Endpunkt der Messungen nach 24 h gewogen. * Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS i.p.): *** $P < 0,001$; § Vergleich zur Gruppe 100 µg/kg KM LPS i.p.: §§ $P < 0,01$, §§§ $P < 0,01$. Tierzahlen: Siehe Tab. 19.

1.2. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma

Mit Hilfe eines Bioassays wurde die Menge an bioaktivem Interleukin (IL)-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) α in Plasmaproben bestimmt. Die Proben wurden von Tieren der verschiedenen Behandlungsgruppen (PBS / 100 µg/kg KM LPS / 1 mg/kg KM LPS, i.p.) zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf des Versuchszeitraumes kurz vor ihrer Tötung entnommen (vgl. Kap. II.C., 2.3., S. 97)

	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h
PBS	3	3	7	3	4
100 µg/kg KM LPS	2	3	5	3	3
1 mg/kg KM LPS	0	0	4	0	8

Tab. 20: Tierzahlen für die Bestimmung bioaktiver Zytokine im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: PBS 1 ml i.p., 100 µg/kg LPS i.p. und 1 mg/kg LPS i.p.

1.2.1. IL-6

In PBS-behandelten Tieren zeigte sich eine basale Expression von IL-6, die keine circadiane oder sonstige, offensichtlich zeitabhängige Rhythmik aufwies (Abb. 43 A). Zu allen untersuchten Zeitpunkten war die Menge an bioaktivem IL-6 nach LPS-Stimulation (100 µg/kg KM) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, ein eindeutiges Maximum konnte für keinen der Zeitpunkte festgestellt werden. Ein zusätzlicher Vergleich der moderaten Dosis (100 µg/kg KM LPS) mit der hohen Dosis (1 mg/kg KM LPS) zeigte außerdem eine signifikante Erhöhung der Menge an bioaktivem IL-6 im Plasma der Tiere, die die hohe Dosis erhalten hatten; einerseits im Vergleich zur PBS-Kon-

trollgruppe und andererseits auch zur niedriger dosierten Gruppe (Abb. 43 B). 24 Stunden nach LPS-Stimulation lagen nur noch nach Verabreichung der hohen Dosis erhöhte IL-6-Konzentrationen im Plasma vor (Abb. 44).

1.2.2. TNF

Bioaktives TNF α konnte im Rahmen der Untersuchungen zum Zeitverlauf in keiner Plasmaprobe der PBS-behandelten Kontrolltiere detektiert werden (Detektionslimit 6 pg/ml, Abb. 45 A). Im Vergleich der moderaten mit der hohen Dosis LPS lag für den Zeitpunkt 8 Stunden eine signifikante Erhöhung der TNF α -Konzentration vor (Abb. 45 B). Nach 24 Stunden fand sich in keiner Probe eine detektierbare Menge an TNF α (Tab. 21).

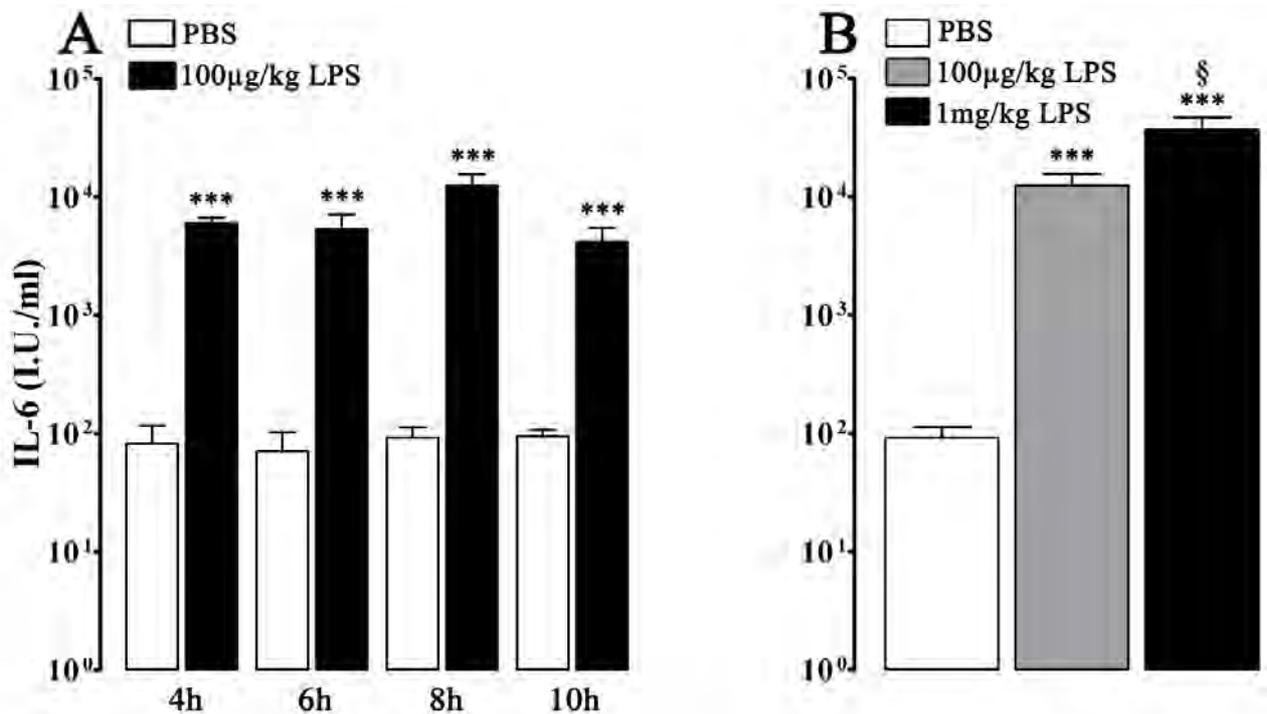


Abb. 43: Gehalte an bioaktivem IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von PBS, 100 µg/- bzw. 1 mg/kg KM LPS

A: Vergleich der Gruppen PBS i.p. und 100 µg/kg KM LPS i.p. im Zeitverlauf zwischen 4- und 10 h. *** P<0,001. B: Vergleich der Gruppen PBS i.p., 100 µg/kg KM LPS und 1 mg/kg KM LPS zum Zeitpunkt 8 h. * Vergleich zur Gruppe PBS i.p.: *** P<0,001; § Vergleich der LPS-Gruppen: § P<0,05. Die Werte wurden vor Berechnung der Statistik logarithmiert, Tierzahlen: Siehe Tab. 20.

	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h
IL-6 (I.U./ml)					
PBS	82 ± 35,09	70,67 ± 31,55	92 ± 20,88	94,67 ± 12,72	55,5 ± 15,28
100 µg/kg KM LPS	6020 ± 960,6 ***	5361 ± 1706 ***	12441 ± 3165 ***	4199 ± 1262 ***	101,7 ± 15,6
1 mg/kg KM LPS	–	–	37015 ± 10099 *** §	–	678 ± 190,9 ** §
TNFα (pg/ml)					
PBS	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6
100 µg/kg KM LPS	1424 ± 583,5	1526 ± 854,4	866 ± 579,8 (2 x < 6)	417 ± 412 (1 x < 6)	< 6
1 mg/kg KM LPS	–	–	7611 ± 2447 §	–	< 6

Tab. 21: Mittlere Konzentrationen bioaktiver Zytokine im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: PBS i.p., 100 µg/kg LPS i.p., 1 mg/kg LPS i.p.; * Vergleich zu PBS i.p.: *** P<0,001

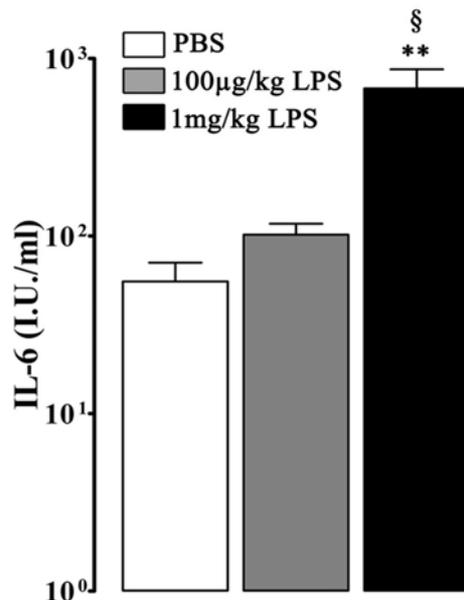


Abb. 44: Gehalte an bioaktivem IL-6 zum Zeitpunkt 24 h nach intraperitonealer Injektion von PBS , 100 µg/- bzw. 1 mg/kg KM LPS

Vergleich der Gruppen PBS i.p., 100 µg/kg KM LPS und 1 mg/kg KM LPS. * Vergleich zur Gruppe PBS i.p.: ** P<0,01; § Vergleich der LPS-Gruppen: § P<0,05. Die Werte wurden vor Berechnung der Statistik logarithmiert, Tierzahlen: Siehe Tab. 20.

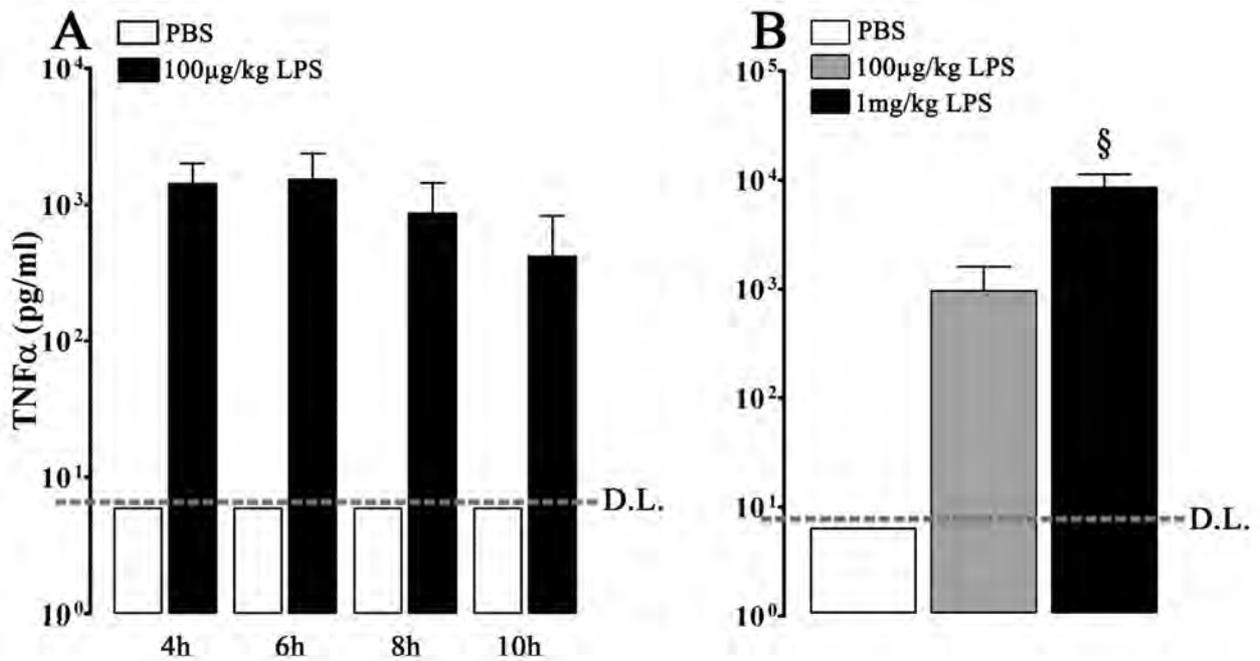


Abb. 45: Gehalte an bioaktivem TNF α zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von PBS , 100 μ g/- bzw. 1 mg/kg KM

A: Vergleich der Gruppen PBS i.p. und 100 μ g/kg KM LPS i.p. im Zeitverlauf zwischen 4- und 10 h. B: Vergleich der Gruppen PBS i.p., 100 μ g und 1 mg/kg KM LPS zum Zeitpunkt 8 h. D.L.: Detektionslimit (6 pg/ml). § Vergleich der LPS-Gruppen: § P<0,05. Die Werte wurden vor Berechnung der Statistik logarithmiert, Tierzahlen: Siehe Tab. 20.

2. Zeitliche und räumliche Charakterisierung der NF-IL6-I.R im Gehirn

2.1. Verteilung der Signale im gesamten Gehirn

In coronalen, 20 µm dicken Gehirnschnitten wurde das Verteilungsmuster NF-IL6-immunreaktiver (i.r.) Zellen infolge der intraperitonealen Injektion von 100 µg/kg KM LPS bestimmt. Nukleäre NF-IL6-Signale konnten über das gesamte Gehirn verteilt detektiert werden (Tab. 22, Abb. 46): Im Vorderhirn zeigten sich NF-IL6-positive Zellen im cerebralen Cortex, sowie im Hippocampus. Im Hypothalamus und der präoptischen Region erstreckte sich die NF-IL6-I.R. über den *Nucleus praeopticus ventromedialis* (VMPO), den *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO; Abb. 46 F, f) und die Hypophyse (Abb. 46 P, p). Als Vertreter der circumventrikulären Organe (CVO) zeigten das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), das *Organum subfornicale* (SFO), die *Eminentia mediana* (ME, Abb. 46 J, j), der *Plexus choroideus* (ChP; Abb. 46 D, d) und die *Area postrema* (AP) nukleäre NF-IL6-Signale. Ferner trat NF-IL6-I.R. im Stammhirn im *Nucleus raphe pallidus* (RPa; Abb. 46 N, n) auf und war außerhalb der vorgenannten Einteilung auch in der ependymalen Auskleidung aller Ventrikel (Abb. 46 H, h), sowie in den Meningen detektierbar (Abb. 46 L, l). Des Weiteren zeigten sich NF-IL6-positive Zellkerne über die Gesamtheit des Hirnparenchyms verteilt in Kapillaren und größeren Gefäßen (Abb. 46 B, b). In Vergleichsschnitten von Tieren, die stattdessen mit PBS behandelt worden waren, traten keine NF-IL6-i.r. Zellkerne auf, lediglich in der Hypophyse, dem Ependym sowie im Hippocampus konnten konstitutive nukleäre NF-IL6-Signale gezeigt werden (Tab. 22, Abb. 46 O, o).

Im Vorfeld der Untersuchungen war die Spezifität der verwendeten Antikörper wie folgt verifiziert worden: Zum Einen zeigte ein direkter Vergleich des Antikörpers aus der Wirtsspezies Ziege ein identisches immunhistochemisches Färbeverhalten in Gehirnschnitten LPS-behandelter Tiere wie ein aus dem Kaninchen stammendes Pendant (S. 152, Abb. 56 D, E). Zum Anderen erfolgte eine Präinkubation der Antikörperlösungen mit dem Antigen (NF-IL6), woraufhin keine spezifische Färbung der Gehirnschnitte durch die beiden Antikörper mehr beobachtet werden konnte (Abb. 56 G, H). Bei Anwendung beider Antikörper in Gewebe von Tieren nach PBS-Injektion traten ebenfalls keine Signale auf (Abb. 56 A, B, Abb. 46 A, a, C, c, E, e, I, i, K, k, M, m).

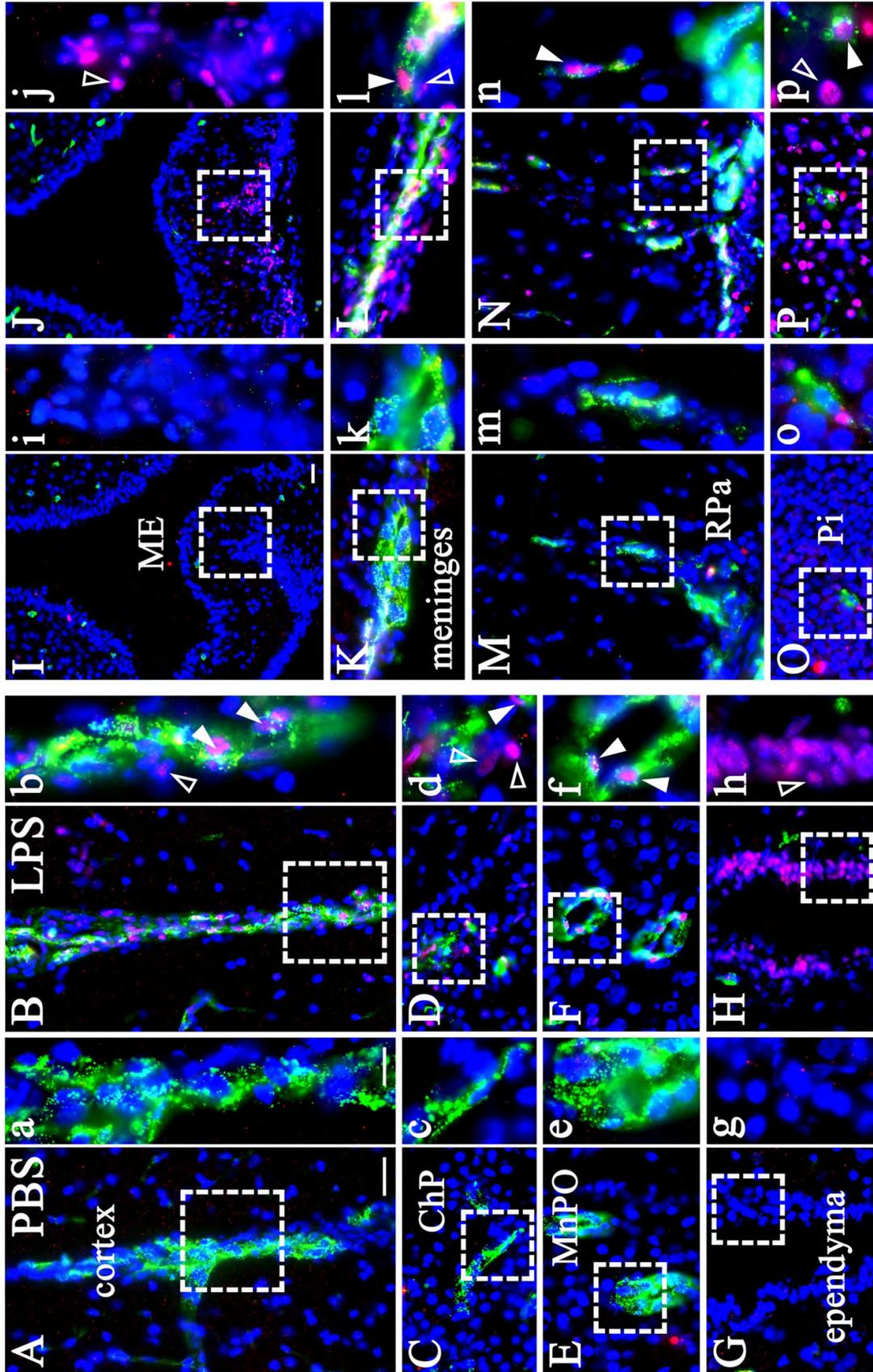


Abb. 46

Abb. 46: Neuroanatomische Verteilung der nukleären NF-IL6 Immunreaktivität (I.R.) im Gehirn von Ratten, 8 h nach intraperitonealer Injektion von PBS oder 100 µg/kg KM LPS.

NF-IL6-Signale sind rot dargestellt, Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, blau) wird durch Pinkfärbung sichtbar. Im grünen Kanal ist der Zellmarker (von Willebrand Faktor für Endothelzellen) dargestellt. Großbuchstaben markieren Übersichtsaufnahmen, Kleinbuchstaben zeigen Detailaufnahmen an, die aus den weißen Kästen in der Übersicht stammen. Gefüllte Pfeilspitzen verweisen auf nukleäre NF-IL6-Signale, die mit einem Endothelzellsignal kolokalisieren, während offene Pfeilspitzen NF-IL6-positive Zellen anderer Phänotypen markieren. ChP: *Plexus choroideus*, MnPO: *Nucleus praeopticus medianus*, ME: *Eminentia mediana*, RPa: *Nucleus raphe pallidus*, Pi: Hypophyse. Größenmarker entspricht 25 µm in Übersichtsaufnahmen, 10 µm in vergrößerten Ausschnitten.

2.2. Zeitlicher Verlauf in den sCVO nach LPS Applikation

2.2.1. semiquantitative Bewertung

Nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS konnten in den sCVO ab einem Zeitpunkt von 4 Stunden bei den immunhistochemischen Untersuchungen deutliche NF-IL6-Signale dargestellt werden (Abb. 47 B, G, L). Der ebenfalls in Vorversuchen getestete Zeitpunkt von 2 Stunden nach Applikation erwies sich als zu früh, um eindeutige Signale identifizieren zu können (Daten sind nicht gezeigt). In allen sCVO, also dem OVLT, dem SFO sowie der AP, steigerte sich die moderate Immunreaktivität zum Zeitpunkt 4 Stunden deutlich mit Erreichen einer Dauer von 6 Stunden nach Injektion (Abb. 47 C, H, M). Die größte Anzahl und stärkste Intensität NF-IL6-immunreaktiver (i.r.) Zellen konnte 8 Stunden nach LPS-Stimulation detektiert werden (Abb. 47 D, I, N), während nach 10 Stunden ein deutlicher Rückgang der Signale auftrat (Abb. 47 E, J, O).

Die qualitativen Beobachtungen für die sCVO und andere Hirnareale (Kap. III.A, 2.1) wurden anhand einer semiquantitativen Bewertungsskala beurteilt und den jeweiligen Behandlungen bzw. Zeitpunkten Intensitäten von „-“ für vollständige Abwesenheit jeglicher Signale bis „+++“ für die höchste darstellbare Intensität und Dichte NF-IL6-i.r. Zellkerne zugeordnet (Tab. 22, S. 138; siehe auch Tab. 7, S. 92). Konstitutiv NF-IL6-i.r. Areale zeigten nur zum Teil eine Induzierbarkeit durch LPS-Stimulation: Eine Beeinflussung der Anzahl und Intensität von NF-IL6-Signalen im Hippocampus konnte unabhängig von der intraperitonealen Injektion semiquantitativ nicht nachgewiesen werden, da diese Gehirnstruktur bereits eine starke konstitutive, nukleäre NF-IL6-I.R. aufwies (Tab. 22). Die in der Hypophyse sowie der ependymalen Auskleidung der Ventrikel ebenfalls vorliegende, wenn auch nur schwach ausgeprägte Grundreaktivität erwies sich als zusätzlich durch LPS induzierbar (Abb. 46). In den meisten der untersuchten Gehirnregionen konnte analog zu den sCVO ein Maximum der NF-IL6-I.R. nach 8 Stunden verzeichnet werden. Kleine Kapillaren im gesamten Parenchym des Großhirns wiesen ein früheres Maximum bei 6 Stunden auf, im MnPO, der Hypophyse, der ME, dem ChP und den Meningen setzte die maximale NF-IL6-I.R. ebenfalls ab einem Zeitpunkt von 6 Stunden ein und erstreckte sich bis zum 8 Stunden Zeitpunkt. Die Signalstärke und -dichte ging für alle nicht-konstitutiv immunreaktiven Areale ab einer Dauer von 10 Stunden nach LPS-Injektion zurück. Im *Nucleus supraopticus* (SON) und *Nucleus tractus solitarius* (NTS) konnten zu keinem Zeitpunkt NF-IL6 Signale detektiert werden.

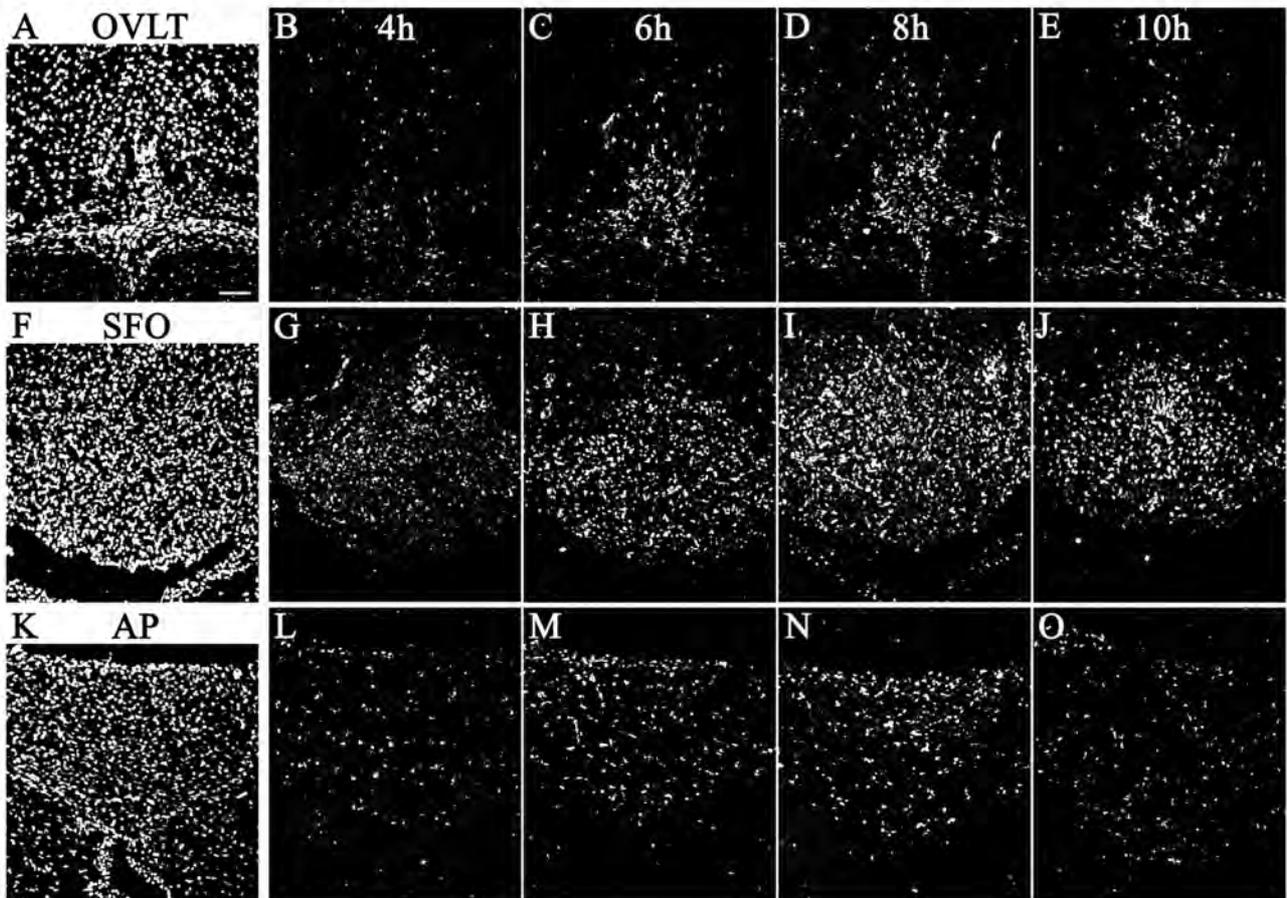


Abb. 47: Zeitlicher Verlauf der NF-IL6-Immunreaktivität (I.R.) in den sensorischen circumventrikulären Organen (sCVO) 4 - 10 h nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS

Am linken Bildrand ist für jedes untersuchte sCVO eine Kernfärbung dargestellt (DAPI, weiße Signale), um die anatomischen Strukturen zu verdeutlichen (A, F, K). Die schon nach 4 h detektierbare NF-IL6-I.R. (weiße Signale, B, G, L) nimmt bis zum Zeitpunkt 8 h kontinuierlich zu und beginnt ab 10 h wieder nachzulassen (E, J, O). Größenmarker in A entspricht 50 µm und gilt für alle Aufnahmen. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*, SFO: *Organum subfornicale*, AP: *Area postrema*

Ausgewählte Gehirnstrukturen	Nukleäre NF-IL6-Immunreaktivität				
	PBS 4 – 10 h	LPS 4 h	LPS 6 h	LPS 8 h	LPS 10 h
Vorderhirn					
Cortex	–	++	++	+++	+
Hippocampus	+++	+++	+++	+++	+++
Hypothalamus und präoptische Region					
<i>Nucleus praeopticus ventromedialis</i>	–	++	++	++	+
<i>Nucleus supraopticus</i>	–	–	–	–	–
<i>Nucleus praeopticus medianus</i>	–	+	+	++	±
Hypophyse	+	++	+++	+++	++
Circumventrikuläre Organe					
<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>	–	++	++	+++	++
<i>Organum subfornicale</i>	–	++	++	+++	++
<i>Eminentia mediana</i>	–	++	++	++	+
<i>Area postrema</i>	–	++	++	++	+
Stammhirn					
<i>Nucleus raphe pallidus</i>	–	+	++	++	+
<i>Nucleus tractus solitarii</i>	–	–	–	–	–
Andere					
<i>Plexus choroideus</i>	–	+++	+++	+++	++
Ependymale Auskleidung aller Ventrikel	±	±	+	++	++
Meningen	–	++	+++	+++	++
Endothelzellen im gesamten Gehirn					
Kapillaren	–	++	+++	++	++
Große Gefäße	–	++	++	+++	+

Tab. 22: Semiquantitative Beurteilung der nukleären NF-IL6-Immunreaktivität (I.R.) in verschiedenen Hirnarealen 4 - 10 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: PBS 1 ml i.p., 100 µg/kg LPS i.p.; Zeichen: – = Keine I.R., +++ = maximale I.R.

2.2.2. Zellzählungen

In den sCVO wurden außerdem quantitative Beurteilungen auf Grundlage von Zellzählungen vorgenommen (Abb. 48, vgl. Kap. II.C., 1.5.5. ab S. 91). Im OVLT unterschied sich die Dichte NF-IL6-i.r. Zellen nach 8 Stunden signifikant von allen anderen beurteilten Zeitpunkten (Abb. 48 A), im SFO erreichte lediglich der Abfall der Signaldichte nach 10 Stunden keine Signifikanz gegenüber dem 8 Stunden Maximum (Abb. 48 B) und in der AP erwies sich allein der Anstieg vom 6- auf den 8 Stunden Zeitpunkt als nicht signifikant (Abb. 48 C). Zusätzlich konnte in der ME die maximale Signaldichte 8 Stunden nach der Injektion bestätigt werden (Abb. 48 D), während im MnPO die Tendenz eines früheren Maximums bei 4 - 6 Stunden, sowie der signifikante Abfall der Signaldichte nach 10 Stunden zu beobachten war (Abb. 48 E).

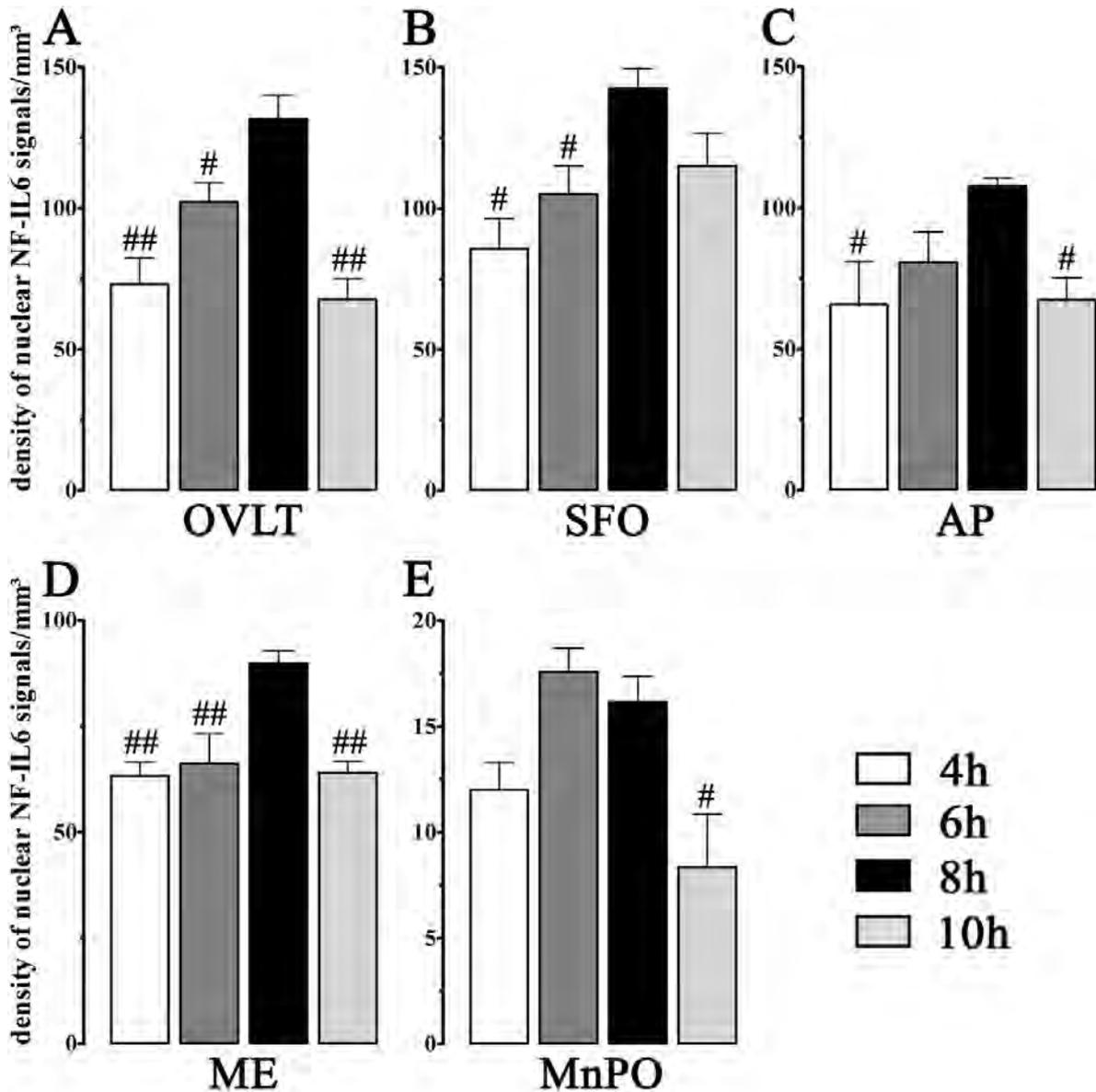


Abb. 48: Dichte immunreaktiver Zellkerne in den sCVO und anderen Hirnarealen 4 - 10 h nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS

Der semiquantitativ erhobene Zeitpunkt der maximalen Signaldichte von 8 h konnte mit Ausnahme der *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) überall bestätigt werden (schwarze Säulen in A-D). OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*, SFO: *Organum subfornicale*, AP: *Area postrema*, ME: *Eminentia mediana*. Statistisch wurden signifikante Unterschiede zwischen diesem Maximum und den anderen Zeitpunkten ermittelt: # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$

2.2.3. Dosisabhängigkeit

Für den Zeitpunkt der maximalen NF-IL6-Signaldichte von 8 Stunden sowie für den spätesten, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkt von 24 Stunden, wurde ein immunhistochemischer Vergleich der zwei LPS-Dosierungen von 100 µg/kg KM einerseits und 1 mg/kg KM andererseits angestellt. 8 Stunden nach Verabreichung der entsprechenden Dosis konnte kein Unterschied in der Farbintensität und Dichte NF-IL6-positiver Zellkerne festgestellt werden (Abb. 49 B, C). Ein deutlicher Gegensatz zwischen beiden Dosierungen zeigte sich jedoch nach 24 Stunden: Während nach der Injektion von 100 µg/kg KM LPS zu diesem Zeitpunkt keine NF-IL6-Signale mehr detektierbar waren, zeigte sich im Gehirn der mit 1 mg/kg KM LPS behandelten Tiere eine mittlere NF-IL6-I.R., die in ihrer Intensität nur geringgradig vom 8 Stunden Maximum abwich (Abb. 49 E, F).

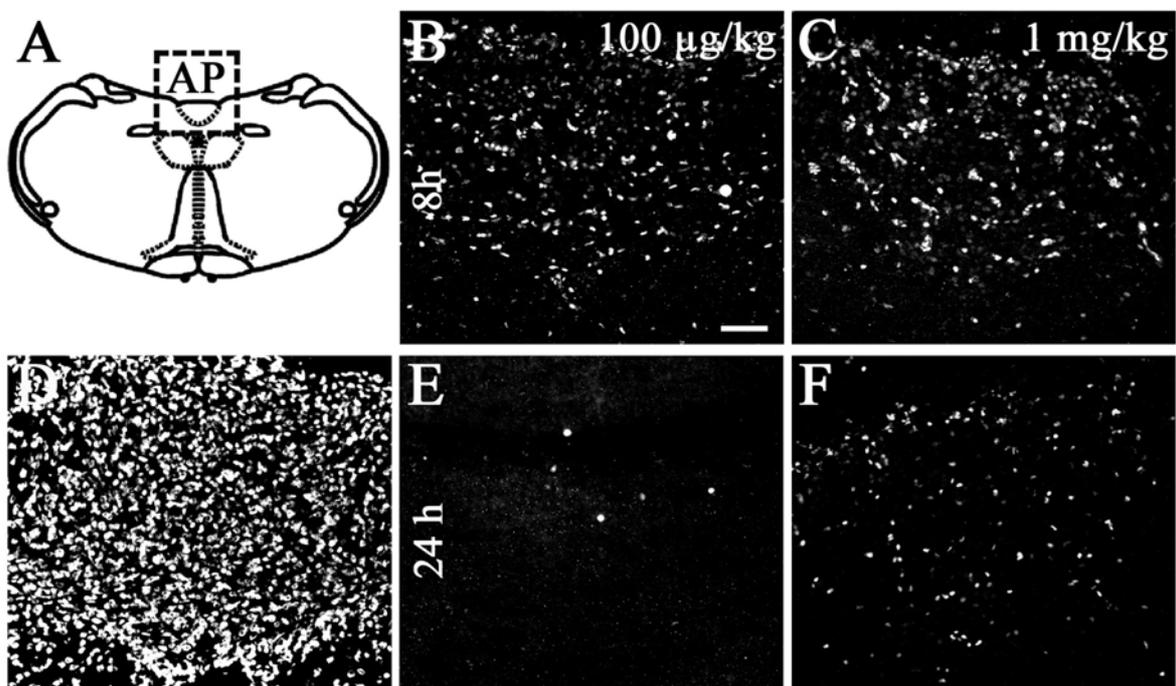


Abb. 49: NF-IL6-Immunreaktivität (I.R.) 8- oder 24 h nach LPS-Injektion in Abhängigkeit von der Dosierung (100 µg- oder 1 mg/kg KM LPS i.p.)

Die schematische Abbildung der *Area postrema* (AP, A) sowie die Darstellung einer Kernfärbung (DAPI, D) dienen der Veranschaulichung der anatomischen Strukturen. Die ähnlich hohe Signaldichte nach Verabreichung beider Dosen nach 8 h (weiße Signale B, C) war in Tieren, die mit 100 µg/kg KM LPS i.p. behandelt wurden, nach 24 h nicht mehr erkennbar (E). Nach Injektion der hohen Dosis von 1 mg/kg KM LPS zeigten sich zu diesem Zeitpunkt noch immer deutliche Signale (F). Größenmarker in B entspricht 50 µm, gilt für alle. Die hier exemplarisch für die AP gezeigten Verhältnisse lagen analog in den anderen sCVO vor.

2.2.4. *In vitro*

Nach Stimulation primärer neuroglialer Zellen der *Area postrema* (AP) mit 100 µg/ml LPS wurden für die Zeitpunkte 6-, 8-, oder 16 Stunden keine deutlichen Unterschiede in der NF-IL6 I.R. festgestellt. Die Anzahl der angefärbten Zellkerne sowie die Intensität der Signale stellten sich jeweils sehr ähnlich dar. Auch in Kulturen, die nicht stimuliert, sondern stattdessen für den gleichen Zeit-

raum mit frischem Kulturmedium inkubiert worden waren, war eine Grundaktivierung anhand NF-IL6-positiver Zellen zu beobachten. Die geringere Intensität der Signale und Dichte der positiven Zellkerne ließ allerdings trotzdem eine Unterscheidung zwischen den Kontrollen (Abb. 50 A) und LPS-stimulierten Kulturen zu (Abb. 50 B).

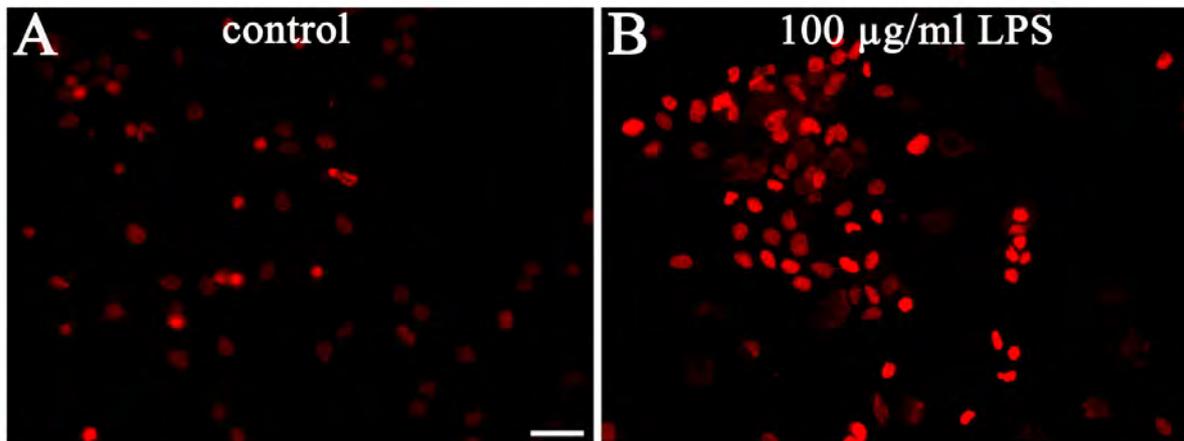


Abb. 50: NF-IL6-Immunreaktivität (I.R.) in primären neuroglialen Zellen der *Area postrema* nach 8 stündiger Inkubation

Die Kulturen wurden mit frischem Kulturmedium (Kontrolle, A) oder 100 µg/ml LPS (B) inkubiert. Eine konstitutive NF-IL6-I.R. (rot, A) wurde durch LPS-Stimulation deutlich erhöht (B). Größenmarker entspricht 10 µm.

2.3. Charakterisierung immunreaktiver Zelltypen

Immunhistochemische Untersuchungen, in denen NF-IL6-positive Zellkerne mit verschiedenen Zellmarkerproteinen kolokalisiert wurden, dienten der Zuordnung reaktiver Zellen zu den entsprechenden Zellpopulationen. Diesbezügliche Untersuchungen wurden für die sCVO (OVL, SFO, AP), sowie für die ME und den MnPO an Gehirnschnitten von mit 100 µg/kg KM LPS stimulierten Tieren nach einer Dauer von 8 Stunden durchgeführt, da dies dem ermittelten Maximum der NF-IL6-I.R. entsprach (Abb. 51). Zusätzlich wurden die Gesamtmenge NF-IL6-reaktiver Zellkerne, sowie die jeweiligen prozentualen Anteile der verschiedenen Zellphänotypen an der Gesamtheit NF-IL6-i.r. Zellen anhand von Zählungen bestimmt (Abb. 52, vgl. Kap. II.C., 1.5.5. ab S. 91).

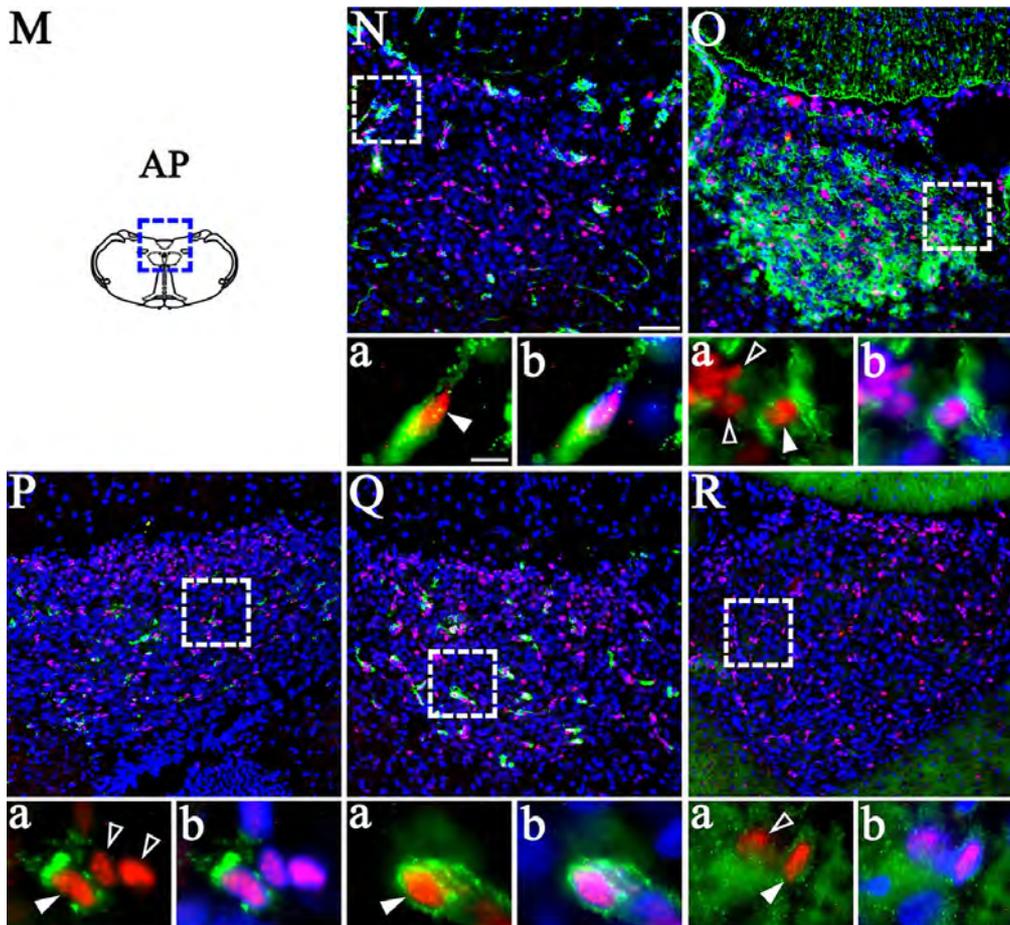


Abb. 51: NF-IL6-exprimierende Zelltypen in den sCVO zum Zeitpunkt 8 h nach intra-peritonealer Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS

Die schematischen Darstellungen in A, G und M dienen der Verdeutlichung der anatomischen Lage der jeweiligen Strukturen, blaue Kästchen weisen auf den in Übersichtsbildern (A-R) gezeigten Ausschnitt hin. In allen Aufnahmen sind Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (Kernfärbung mit DAPI), rot steht für NF-IL6-Signale und Grünfärbung zeigt das jeweils verwendete Zellmarkerprotein an. Vergrößerte Bildausschnitte (a, b) verdeutlichen zum Einen durch Überlagerung des roten und des grünen Kanals die Lokalisation der roten NF-IL6-Signale innerhalb der markierten Zelle (a), zum Anderen wird die nukleäre Lage von NF-IL6 durch die Pinkfärbung bei Überlagerung mit dem blauen Kernsignal deutlich (b). Gefüllte weiße Pfeile markieren nukleäre NF-IL6-Signale in einer Zelle des jeweils markierten Phänotyps, während offene Pfeile NF-IL6-positive Kerne anderer Zelltypen anzeigen. Der jeweils vergrößerte Ausschnitt ist in Übersichtsbildern mit einem weißen Kasten umrandet. Größenmarker in B, H und N entspricht 50 µm und gilt in anderen Übersichtsaufnahmen entsprechend, Größenmarker in allen vergrößerten Ausschnitten entspricht 10 µm. Verwendete Zellmarker: von Willebrand Faktor (vW, Endothelzellen, B, H, N), glial fibrillary acidic protein (GFAP, Astrozyten, C, I, O), cluster of differentiation 68 (CD68, aktivierte Mikrogliazellen, D, J, P), cluster of differentiation 163 (CD163, perivaskuläre Makrophagen, E, K, Q), neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS, nNOS-positive Neuronen, F, L, R). Übersicht F wurde 4 h nach LPS-Applikation aufgenommen.

2.3.1. Vorkommende Zelltypen

Qualitativ konnten in allen untersuchten Strukturen anhand der Detektion des Proteins „von Willebrand Faktor“ (vW) bzw. „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) NF-IL6-positive Endothelzellen und Astrozyten dargestellt werden (Abb. 51 B, C, H, I, N, O). Auch aktivierte Mikrogliazellen und perivaskuläre Makrophagen machten in allen analysierten Hirnarealen einen gewissen Anteil der Zellen aus, die NF-IL6-I.R. aufwiesen (Abb. 51 D, E, J, K, P, Q). Diese Phänotypen wurden über die Proteine „cluster of differentiation“ (CD) 68 und CD163 bestimmt. Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) exprimierende Neuronen konnten lediglich im OVLT und MnPO nicht detektiert werden (Abb. 51 F, L, R).

	OVLT	SFO	AP	ME	MnPO
Mittlere Gesamtzahl der Zellkerne pro Zählfeld	66	67	67	52	31
NF-IL6-positive Zellkerne (% aller)	≈ 30	≈ 27,5	≈ 20	≈ 33	≈ 12,5
Endothelzellen (% NF-IL6-positiver)	≈ 30	≈ 11	≈ 20	≈ 6	≈ 95
Astrozyten (% NF-IL6-positiver)	≈ 7	≈ 15	≈ 10	≈ 7	≈ 4
aktivierte Mikroglia (% NF-IL6-positiver)	≈ 13	≈ 9	≈ 12,5	≈ 9	≈ 22
perivaskuläre Makrophagen (% NF-IL6-positiver)	≈ 13	≈ 2	≈ 12,5	≈ 7	≈ 20
nNOS-positive Neurone (% NF-IL6-positiver)	–	≈ 30	≈ 10	≈ 9	–
Anteil phänotypisch zugeordneter Zellen (% NF-IL6-positiver)	≈ 63	≈ 67	≈ 65	≈ 38	>100

Tab. 23: Mittlere Prozentsätze NF-IL6 immunreaktiver Zellpopulationen 8 h nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS

Siehe auch Abb. 52. Dargestellt sind zum Einen der prozentuale Anteil NF-IL6-positiver Zellen an der Gesamtheit der im Mittel gezählten Zellkerne eines Bildausschnittes (Zählfeld). Die Zahlen zu den verschiedenen Zellphänotypen wiederum stellen deren Anteil an der Population dieser NF-IL6-immunreaktiven (i.r.) Zellen dar. Außer im MnPO konnten nicht alle NF-IL6-i.r. Zellen eindeutig einem Phänotyp zugeordnet werden. Siehe auch Abb. 52. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*, SFO: *Organum subfornicale*, AP: *Area postrema*, ME: *Eminentia mediana*, MnPO: *Nucleus praeopticus medianus*

2.3.2. Quantifizierung reaktiver Zellpopulationen in verschiedenen Hirngebieten

Zur Bestimmung der Anteile der jeweiligen Zellphänotypen wurde zunächst für jede Struktur der Prozentsatz an Zellen ermittelt, die nach der intraperitonealen Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS eine erkennbare NF-IL6-I.R. aufwiesen. Dieser lag zwischen 12,5 und 33 % aller Zellen und war im OVLT und in der ME am höchsten (Tab. 23, Abb. 52 A, D). In Bezug auf die Anteile der einzelnen Zellphänotypen an der Gesamtheit dieser aktivierten Zellen konnte im OVLT, in der AP und vor allem im MnPO eine Dominanz der Endothelzellen festgestellt werden (Abb. 52 A, C, E). NF-IL6-positive Astrozyten kamen am häufigsten im SFO vor. Allerdings bildeten nNOS-positive Neurone den größten Anteil an Zellen mit nukleärer NF-IL6-I.R. in dieser Gehirnstruktur (Abb. 52 B). Aktivierte Mikrogliazellen und perivaskuläre Makrophagen zeigten im OVLT, in der AP und im MnPO eine mittlere Beteiligung an der NF-IL6-Signaldichte und bildeten in den anderen Strukturen eher kleinere Anteile der NF-IL6-positiven Zellpopulationen.

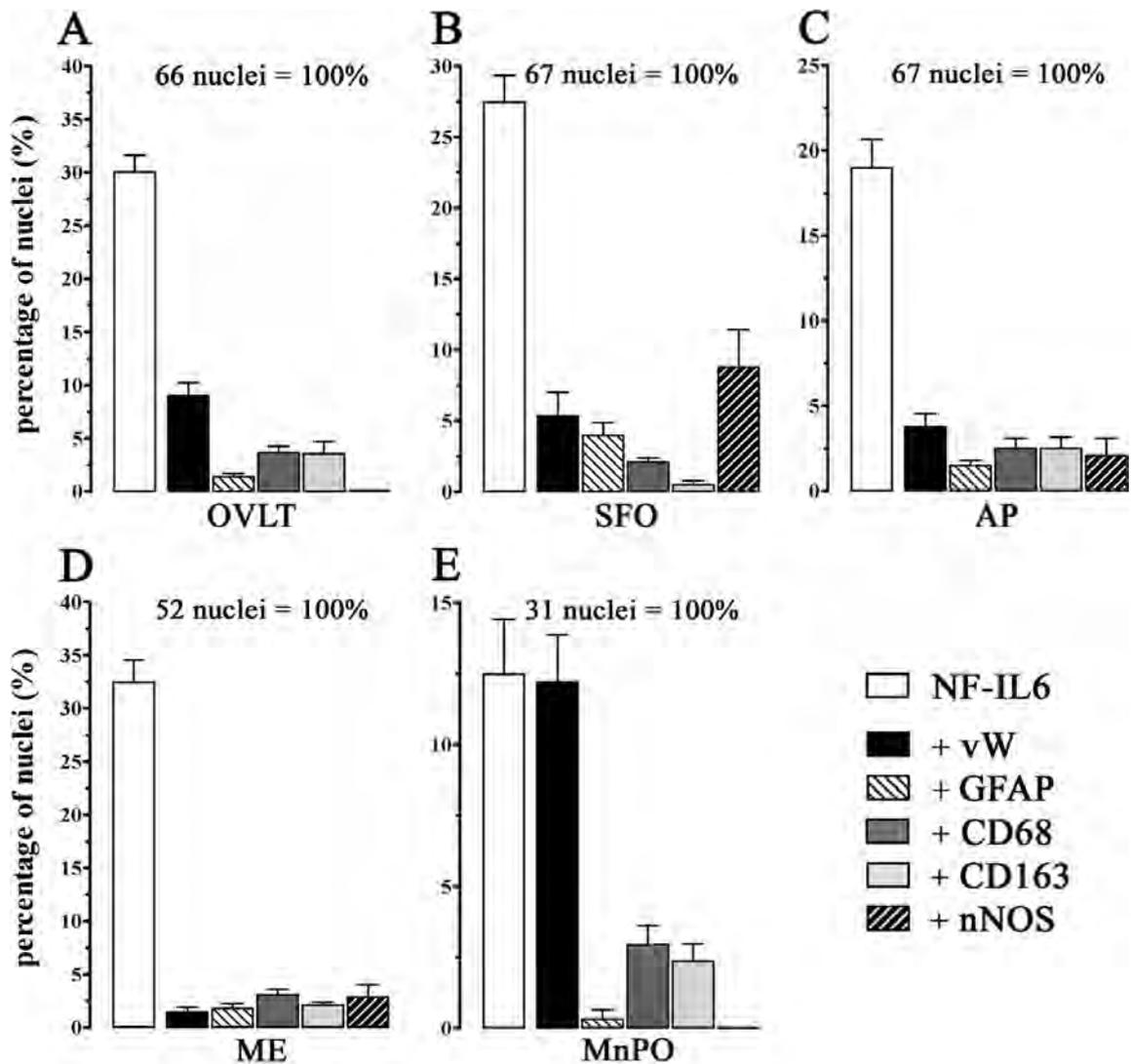


Abb. 52: Prozentuale Anteile NF-IL6 immunreaktiver (i.r.) Zellpopulationen 8 h nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS

Weiße Säulen zeigen den Anteil NF-IL6-i.r. Zellkerne an der Gesamtheit aller gezählten Zellen an, deren absolute Anzahl jeweils oben im Diagramm angegeben ist. Entsprechende Anteile NF-IL6-positiver Endothelzellen, Astrozyten, aktivierter Mikrogliazellen, perivaskulärer Makrophagen und nNOS-positiver Neurone an allen gezählten Zellen sind nachfolgend dargestellt. Verwendete Zellmarker: von Willebrand Faktor (vW, Endothelzellen), glial fibrillary acidic protein (GFAP, Astrozyten), cluster of differentiation 68 (CD68, aktivierte Mikrogliazellen), cluster of differentiation 163 (CD163, perivaskuläre Makrophagen), neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS, nNOS-positive Neuronen).

3. LPS-bedingte Induktion der Genexpression im Gehirn

3.1. Induktion auf mRNA-Ebene im Hypothalamus

Zur Bestimmung des Gehalts an mRNA in den verschiedenen Behandlungsgruppen zu den gegebenen Zeitpunkten wurde Gehirngewebe aus dem Hypothalamus und angrenzenden Gebieten genutzt (vgl. Abb. 24, S. 89). Zum Einen wurde die zeitliche Entwicklung der Geninduktion nach intraperitonealer LPS-Stimulation (100 µg/kg KM) dargestellt und das jeweilige Maximum innerhalb eines Zeitraums von 4 - 10 Stunden ermittelt (Abb. 53). Des Weiteren wurde die Dosisabhängigkeit der Induktion für die Zeitpunkte 8-, und 24 Stunden beurteilt, indem Proben von Tieren, die 100 µg/kg KM LPS erhalten hatten, mit solchen verglichen wurden, die aus der mit 1 mg/kg KM LPS behandelten Gruppe stammten (Abb. 54). Als Vergleichsgruppe mit idealerweise basaler Expression wurden jeweils die mit PBS behandelten Kontrolltiere herangezogen.

3.1.1. NF-IL6 und sein negativer Regulator Trib1

Im Zeitverlauf zeigte sich eine signifikante Induktion der NF-IL6-Expression gegenüber PBS-behandelten Kontrolltieren lediglich nach 4 Stunden im Anschluss an die Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS. Auch verglichen mit den mRNA-Mengen nach 6-, 8-, und 10 Stunden stellte sich die NF-IL6-Expression nach 4 Stunden als signifikant erhöht dar. Zu allen anderen Zeitpunkten war eine Erhöhung in Tieren, die mit LPS behandelt worden waren, zwar tendenziell erkennbar, jedoch gab es keine signifikanten Abweichungen zur jeweiligen PBS-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 53 A). Im Dosisvergleich zeigte sich 8 Stunden nach Verabreichung von 1 mg/kg KM LPS eine signifikante NF-IL6-Induktion sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch zur niedriger dosierten Gruppe, während nach 24 Stunden keine Abweichungen von der basalen Expression auftraten (Abb. 54 A). Tribbles (Trib) 1 wies nach Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS erst zum relativ späten Zeitpunkt von 10 Stunden eine signifikante Induktion und maximale Expression im Zeitverlauf auf (Abb. 53 I). Die Verabreichung von 1 mg/kg KM LPS führte bereits nach 8 Stunden zu einer signifikanten Geninduktion gegenüber der PBS-behandelten Kontrolle und der mit 100 µg/kg KM LPS behandelten Gruppe (Abb. 54 I).

3.1.2. Andere Transkriptionsfaktoren und ihre negativen Regulatoren

Die Induktion des suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 und des inhibitor of kappa B (IκB) α als negative Regulatoren der Aktivierung von signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 und Nuclear Faktor (NF) κ B wurde für deren indirekte Bestimmung herangezogen. Beide wiesen eine frühe, signifikante Induktion nach einer Dauer von 4 Stunden im Anschluss an die intraperitoneale Behandlung mit 100 µg/kg KM LPS auf. Dieser Zeitpunkt bildete außerdem bei beiden Genen die Maximalinduktion im gesamten Zeitverlauf (Abb. 53 B, C). Bei Verwendung der 10 fach höheren LPS-Dosierung von 1 mg/kg KM LPS steigerte sich die Expression beider Gene signifikant, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch verglichen mit der niedrigeren Dosis (Abb. 54 C, D links). Außerdem stellte sich hier bei der alleinigen Beurteilung des 8 Stunden Zeitpunkts die Induktion von SOCS3 nach der Behandlung mit 100 µg/kg KM LPS anders als im Zeitverlauf ebenfalls als signifikant heraus. Nach einer Dauer von 24 Stunden war die SOCS3-Expression wieder auf Basalniveau abgesunken, während IκBα in niedrig dosierten, nicht aber in den mit 1 mg/kg KM LPS behandelten Tieren signifikant induziert blieb (Abb. 54 C, D rechts).

3.1.3. Inflammatorische Mediatoren

3.1.3.1. Zytokine

Die Expression von Interleukin (IL)-6 mRNA zeigte sich 4 Stunden nach Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS signifikant und maximal erhöht, allerdings lag auch nach 6 Stunden noch eine signifikante Induktion vor (Abb. 53 D). 8 Stunden nach der Applikation zeigten nur mit 1 mg/kg KM LPS behandelte Tiere eine signifikante Expressionssteigerung, während die Behandlung mit der 10 fach niedrigeren Dosis zu diesem Zeitpunkt keine Veränderung im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe mehr verursachte. In allen Gruppen lagen nach 24 Stunden wieder basale mRNA-Mengen vor (Abb. 54 D). IL-1β-mRNA war über den gesamten untersuchten Zeitraum von 4 - 10 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 100 µg/kg KM LPS signifikant gegenüber PBS-behandelten Kontrollen induziert (Abb. 53 E). Der Dosisvergleich ergab zusätzlich eine signifikant gesteigerte Expression nach Gabe der höheren Dosis von 1 mg/kg KM LPS nach 8 Stunden, während sich alle Gruppen nach 24 Stunden wieder der basalen Expression annäherten (Abb. 54, E). Der IL-10 mRNA-Gehalt blieb über einen Zeitraum von 4 - 8 Stunden nach Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS signifikant erhöht, die Induktion war nach 6 Stunden maximal ausgeprägt (Abb. 53 F). Auch hier kam es nach 8 Stunden zur nochmals signifikant verstärkten Expression, wenn die LPS-Dosis verzehnfacht wurde (Abb. 54 F).

3.1.3.2. Enzyme der Prostaglandinsynthese

Sowohl die Expression von Cyclooxygenase (COX) 2 als auch mikrosomaler Prostaglandin E Synthase (mPGES) wiesen auf mRNA-Ebene 4 Stunden nach LPS-Gabe (100 µg/kg KM) ein Induktionsmaximum auf. Die Induktion von mPGES war dabei noch bis zum Zeitpunkt 8 Stunden signifikant gegenüber PBS-behandelten Kontrolltieren erhöht (Abb. 53 G, H). Eine nochmals deutliche, signifikante Erhöhung der mRNA-Expression durch Verzehnfachung der LPS-Dosis konnte ebenfalls für beide Gene nach 8 Stunden gezeigt werden, während zum Zeitpunkt 24 Stunden keine Abweichungen von der basalen Expression mehr erkennbar waren (Abb. 54 G, H).

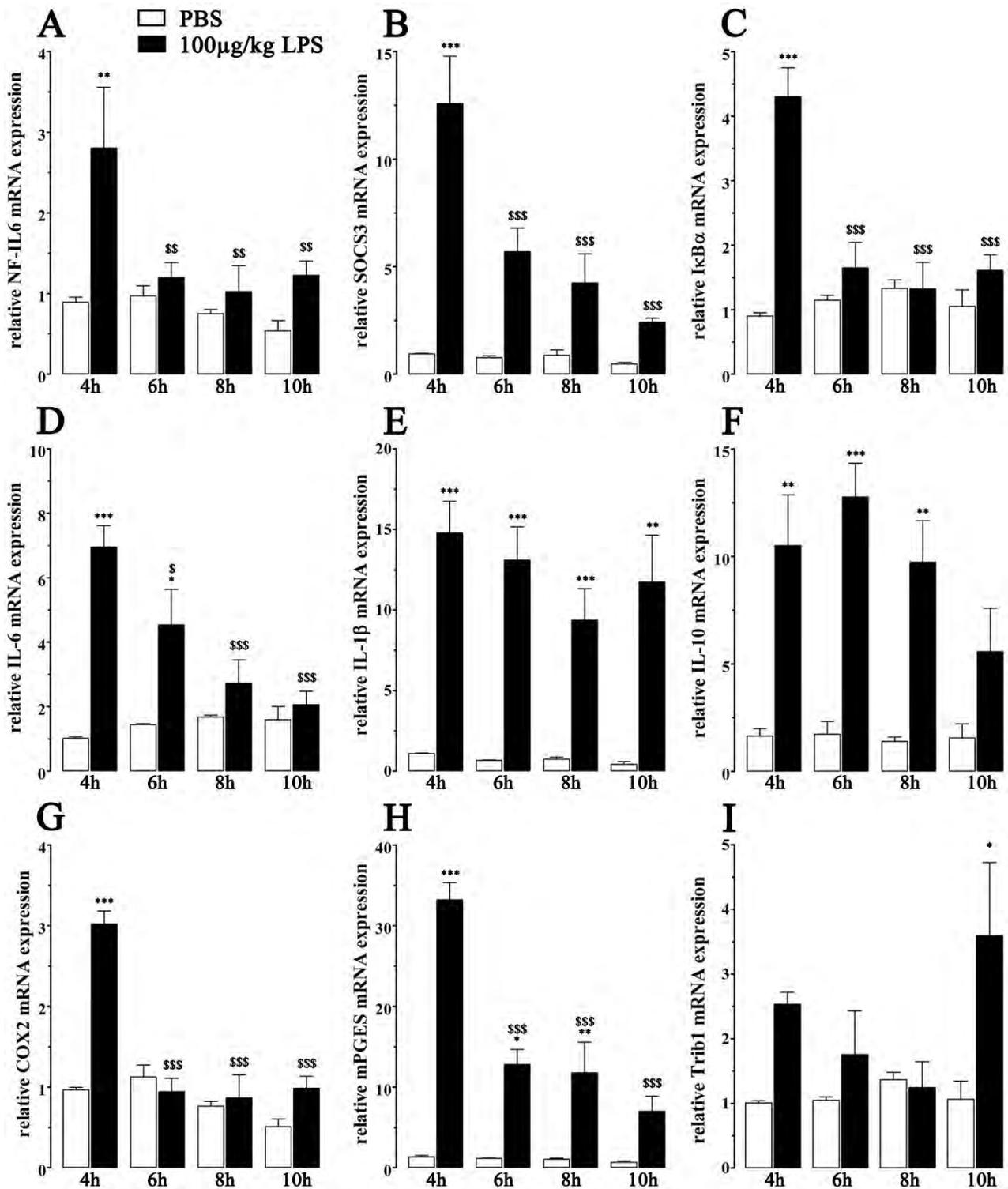


Abb. 53: Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Marker im Hypothalamus 4 - 10 h nach intraperitonealer Injektion von LPS oder PBS

Verglichen wurden zum Einen Proben von LPS-stimulierten Tieren (100 µg/kg KM) mit den PBS-behandelten Kontrollen: * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001. Da die Induktion nach 4 h für die meisten Gene am deutlichsten war, wurden zusätzlich signifikante Unterschiede anderer Zeitpunkte zum 4 h Zeitpunkt dargestellt: \$ P<0,05, \$\$ P<0,01, \$\$\$ P<0,001

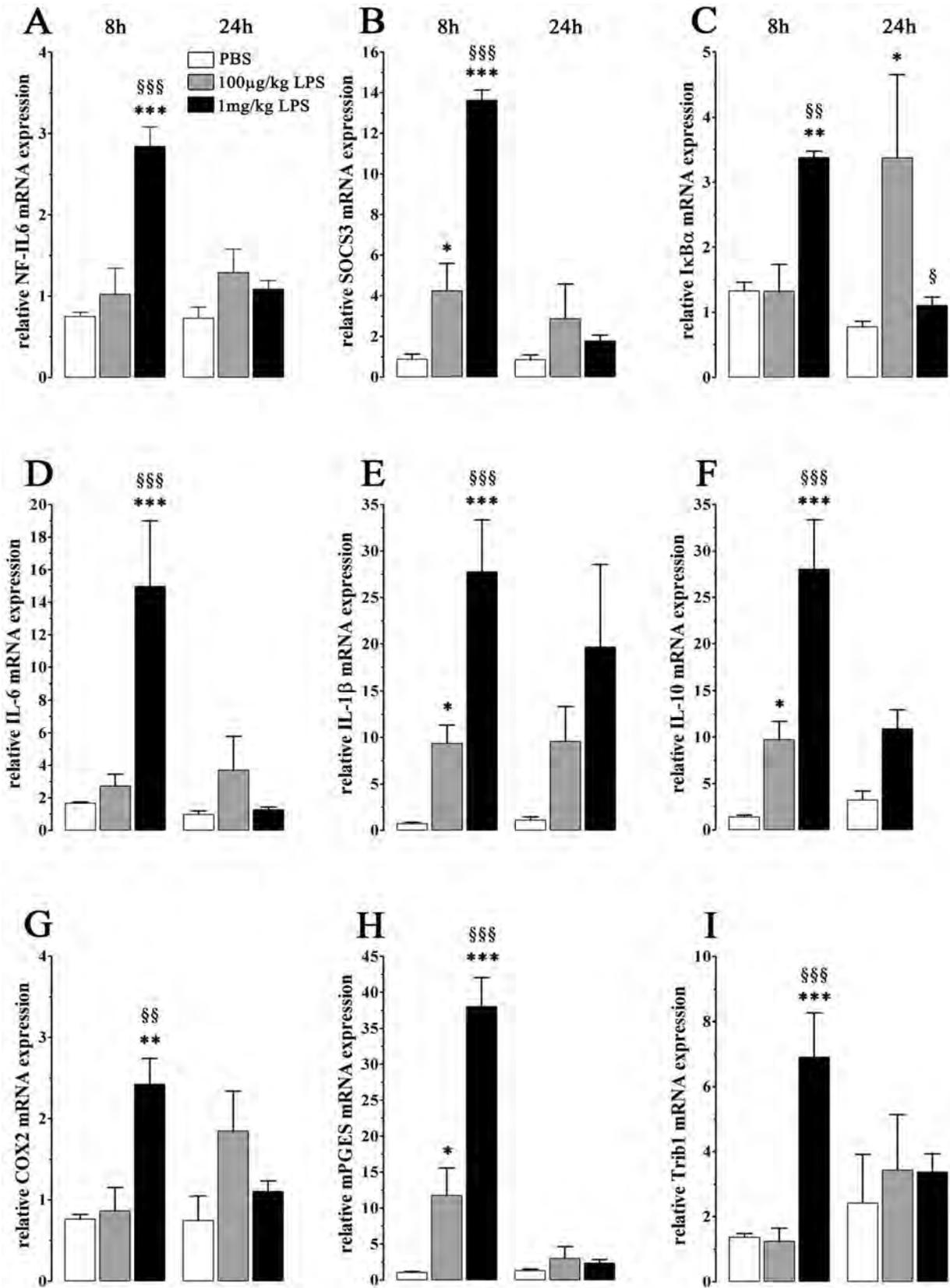


Abb. 54: Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Marker im Hypothalamus 8- und 24 h nach intraperitonealer Injektion von LPS (100 µg/kg bzw. 1 mg/kg KM) oder PBS

Verschiedene Behandlungsgruppen wurden für die Zeitpunkte 8- und 24 h jeweils separat miteinander verglichen. * Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS i.p.): * P<0,05, ** P<0,01, *** P< 0,001; § Vergleich zur Gruppe 100 µg/kg KM LPS i.p.: §§ P<0,01, §§§ P<0,01

3.2. Induktion auf Proteinebene in Hypothalamus, cerebralem Cortex und Stammhirn

Um die im Gehirn nach LPS-Stimulation vorherrschende Isoform von NF-IL6 zu identifizieren, sowie zur nochmaligen Quantifizierung der NF-IL6-Proteinmenge in Ergänzung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen (Kap.III.A, 2), wurden Proben aus dem Hypothalamus, dem cerebralen Cortex und dem Stammhirn von Tieren ausgewertet, die 8 Stunden vor der Tötung 100 µg/kg KM LPS bzw. PBS erhalten hatten (vgl. Abb. 24, S. 89).

3.2.1. Expression verschiedener NF-IL6 Isoformen im Gehirn

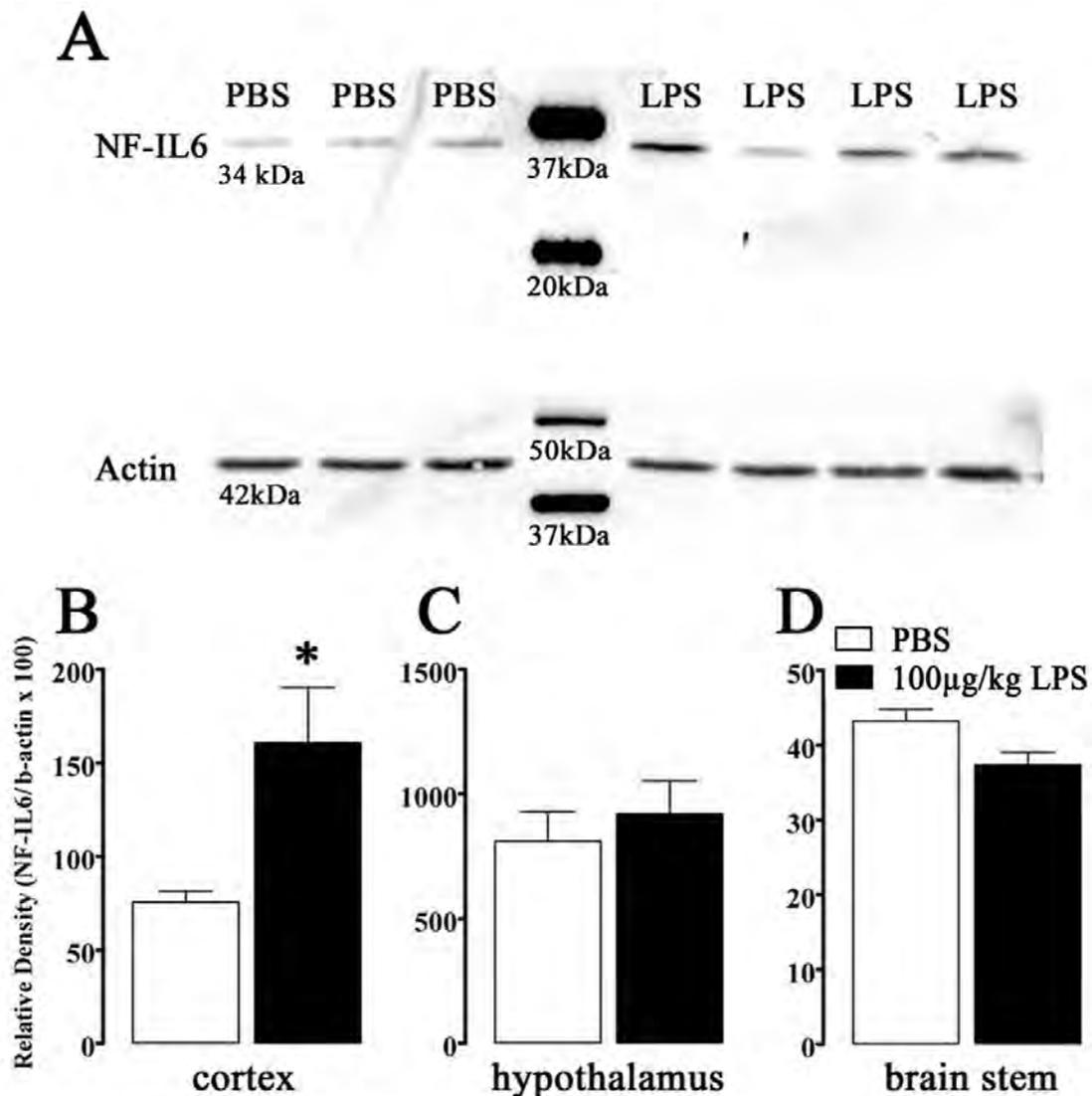


Abb. 55: Expression von NF-IL6 im cerebralen Cortex, Hypothalamus und Hirnstamm 8 h nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS oder PBS

A: Exemplarische Darstellung eines Western Blot aus dem cerebralen Cortex, die NF-IL6-Bande lag in allen Untersuchungen durchschnittlich bei 34 kDa und zeigte bei verschiedenen Proben eine unterschiedlich starke Ausprägung. Die β -Actin Expression (42 kDa) war relativ konstant. B - D: Vergleich von NF-IL6-Proteinmengen nach Quantifizierung der Banden und Normalisierung mit β -Actin-Mengen. Nur im cerebralen Cortex konnte eine signifikante Induktion der Expression nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden (B); * $P < 0,05$.

Neben der Bande für β -Aktin, die durchschnittlich ein Molekulargewicht von 42 kDa aufwies, konnte in allen Geweben eine weitere Bande detektiert werden. Das detektierte, mit anti-NF-IL6-Antikörpern sichtbar gemachte Protein, hatte ein durchschnittliches Molekulargewicht von 34 kDa (Abb. 55 A) und konnte damit der NF-IL6-Isoform LAP (\approx 32-36 kDa) zugeordnet werden. Im cerebralen Cortex war die NF-IL6-Induktion 8 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 100 μ g/kg KM LPS deutlich zu erkennen und es waren signifikant erhöhte NF-IL6-Proteinmengen in den entsprechenden Proben nachweisbar (Abb. 55 B). Im Hypothalamus sowie im Hirnstamm konnte im Anschluss an die immunhistochemischen Untersuchungen im verbleibenden Gewebe allerdings kein signifikanter Anstieg von NF-IL6 Protein nachgewiesen werden (Abb. 55 C, D).

3.2.2. Expression des inflammatorischen Markers COX2

Die Expression von COX2 8 Stunden nach intraperitonealer Injektion von PBS bzw. 100 μ g/kg KM LPS wurde zusätzlich auf Proteinebene mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen analysiert. In Gehirnen von PBS-behandelten Tieren traten bei fehlender NF-IL6-I.R. auch keine COX2-Signale auf (Abb. 56 C). Intraperitoneale Injektion von 100 μ g/kg KM LPS führte dagegen zu deutlicher COX2-Immunreaktivität (I.R.), die sich über die Gesamtheit des Gehirns verteilte und dabei vor allem in morphologisch blutgefäßartigen Strukturen, sowie im MnPO auffiel (Abb. 56 F). Hier konnte auch eine eindeutige Kollokalisierung der perinukleären COX2-Signale mit nukleären NF-IL6-Signalen gezeigt werden.

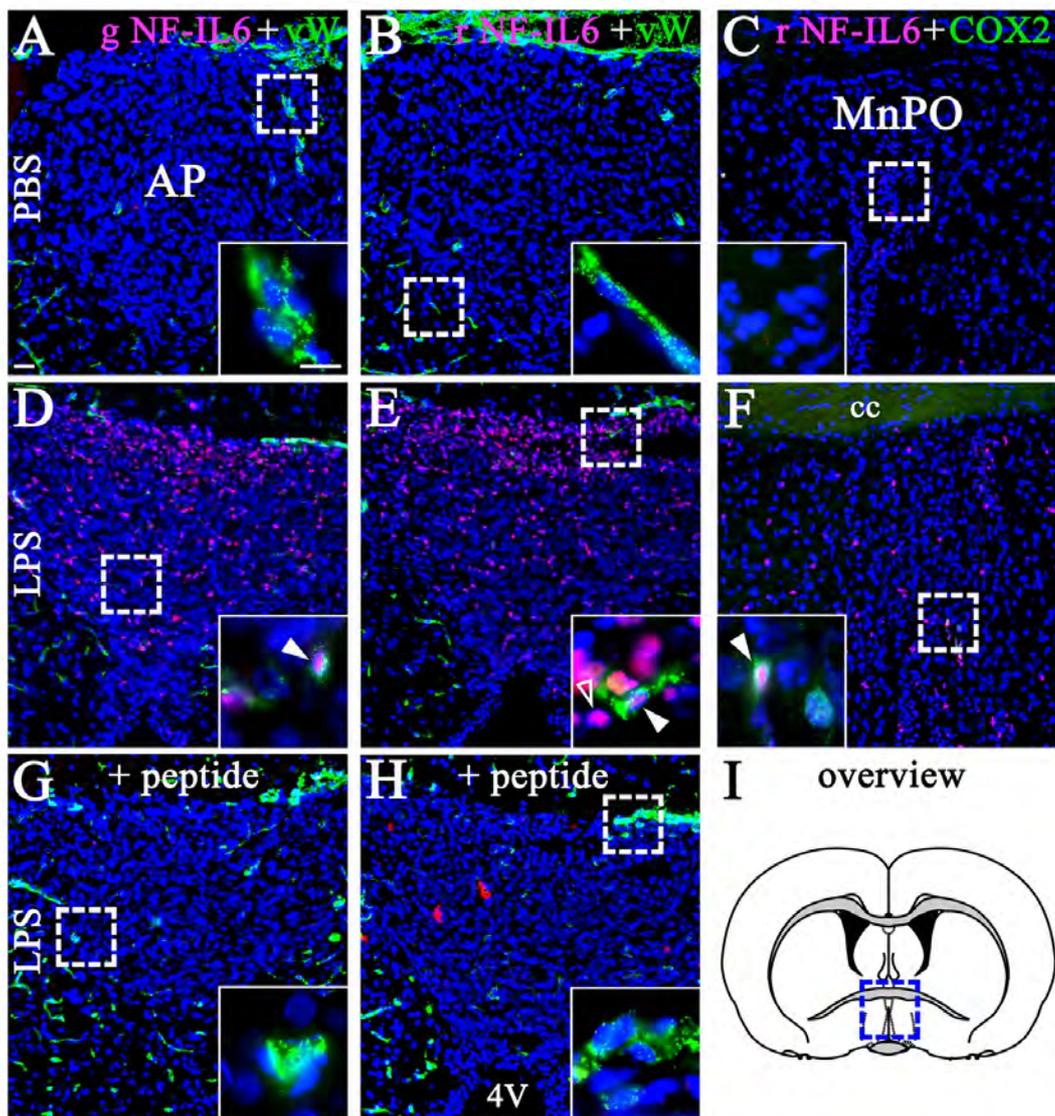


Abb. 56: COX2-Immunreaktivität im *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) 4 h nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS oder PBS & Vergleich zweier, aus verschiedenen Spezies stammender NF-IL6-Antikörper

C, F, I: Der Überblick in I verdeutlicht die anatomische Struktur und Lage des MnPO, der in C und F dargestellte Ausschnitt ist mit einem blauen Kasten markiert. Eine deutliche Induktion der COX (Cyclooxygenase) 2 -I.R. nach LPS-Stimulation (F) war im Vergleich zur PBS-Kontrolle (C) erkennbar, die Vergrößerung zeigt die Kolokalisation des nukleären NF-IL6-Signals mit perinukleärer COX2.

A, B, D, E: Vergleich zweier NF-IL6-Antikörper aus den Spezies Ziege (goat, g; A, D) und Kaninchen rabbit, r; B, E). Beide zeigten Abwesenheit von Signalen in PBS-behandelten Kontrollen und ähnlich stark ausgeprägte NF-IL6-I.R. 8 h nach LPS-Applikation (D, E).

G, H: NF-IL6-I.R. nach Präinkubation des jeweiligen Antikörpers mit seinem Antigen (NF-IL6, „peptide“). Es traten keine detektierbaren NF-IL6-Signale mehr auf. Bereiche vergrößerter Ausschnitte am unteren Bildrand werden in der Übersichtsaufnahme durch weiße Kästen markiert. Gefüllte Pfeilspitzen verweisen auf Kolokalisationen des roten mit dem grünen Farbkanal, offene Pfeilspitzen markieren nicht-kolokalisierende Kernsignale.

Farbkanäle: Blau: Kernfärbung (DAPI), rot: NF-IL6-Signale, grün: von Willebrand Faktor (vW, Endothelzellen, A, B, D, E, G, H) bzw. COX2 (C, F). 4V: vierter Ventrikel, Größenmarker in A entspricht 25 µm und gilt für alle Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in Vergrößerungen entspricht 10 µm.

III.B. Einflüsse des JAK-Inhibitors AG490 auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen

1. Beeinflussung der Entzündungsreaktionen durch zentrale Injektion von AG490

Nach Feststellung des Zeitpunktes der maximalen NF-IL6-Aktivität im Verlauf systemischer Krankheitssymptome, wurden mögliche Einflüsse des Janus-Kinase (JAK) Inhibitors AG490 (auch Tyrphostin B42) auf diesen Verlauf untersucht. Zu diesem Zweck wurden zum Einen das zuvor definierte Maximum von 8 Stunden nach LPS-Applikation als Endpunkt ausgewählt, um eventuelle Beeinflussungen der erhobenen Parameter zu diesem Zeitpunkt optimal festhalten zu können. Zum Anderen diente der Zeitpunkt 24 Stunden nach LPS-Injektion der lückenlosen Aufzeichnung möglicher physiologischer Effekte über einen kompletten Tag.

1.1. Physiologische Parameter

1.1.1. Körperkerntemperatur

Intracerebroventrikuläre Injektionen des JAK-Inhibitors AG490 bzw. des Lösungsmittels (Cremophor = 25 % Cremophor®EL in PBS) erfolgten jeweils 60 Minuten vor der geplanten intraperitonealen Injektion, also zum Zeitpunkt $t = -1$ Stunde. Bei $t = 0$ Stunden wurden entweder 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS oder PBS (1 ml) injiziert. Die Verläufe der Körperkerntemperatur wurden über einen Zeitraum von 8- oder 24 Stunden aufgezeichnet.

Beide mit PBS behandelten Kontrollgruppen zeigten im Anschluss an die Injektionen über den Versuchstag keine relevanten Temperaturabweichungen vom normalen Tagesverlauf der Basaltemperatur (Abb. 57 A). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass weder das Lösungsmittel, noch der Inhibitor an sich pyrogene Eigenschaften aufwiesen, die die Reaktion auf eine LPS-Stimulation von vornherein hätten verschleiern können.

Nach der LPS-Injektion kam es im Vergleich zu den PBS-injizierten Tieren in beiden Gruppen (Cremophor oder Inhibitor) ohne initiale Hypothermie nach 2 - 3 Stunden zur Fieberentwicklung (Tab. 24). Mit AG490 vorbehandelte Tieren zeigten im Vergleich mit den Lösungsmittelkontrollen durchschnittlich 45 Minuten früher eine Fieberreaktion. Dabei stieg die Körperkerntemperatur zeitweise auf 39,5°C an, während mit Cremophor behandelte Tiere ein etwas moderateres Fieber mit Maximaltemperaturen von 39,1°C entwickelten, die allerdings bereits 45 Minuten früher auftraten. Die Unterschiede der Maximaltemperaturen erreichten dabei keine Signifikanz (Tab. 24). In beiden Gruppen hielt das Fieber etwa gleich lang an und ging nach 9,75 (AG490) bzw. 10 Stunden (Cremophor) wieder zurück. In der Gruppe AG490 & LPS zeigte sich zudem in der Nachtphase (19 - 21 Stunden *post injectionem*) eine zeitweise Absenkung der Körperkerntemperatur gegenüber der PBS-behandelten Gruppe (Abb. 58 B). Tiere, die mit Cremophor vorbehandelt worden waren, zeigten hingegen nach 21 - 22 Stunden eine verminderte Absenkung der Temperatur gegenüber ihrer direkten Kontrolle (Crem & PBS) zu Beginn der Hellphase (Abb. 58 A). Im direkten Vergleich (Abb. 57 B) erwies sich das Fieber der mit AG490 vorbehandelten, LPS-stimulierten Tiere im Zeitraum von 5,5 bis 8 Stunden nach der Injektion als signifikant höher als das der Vergleichsgruppe (Crem & LPS). Im Zeitraum von 13 - 15 Stunden *post injectionem* war die Temperatur nach AG490-Vorbehandlung stellenweise im Vergleich zur Cremophor-Vorbehandlung signifikant ernied-

rigt und auch nach 24 Stunden, am Ende des Versuchszeitraums, hatten sich die Temperaturen beider Gruppen noch nicht wieder komplett aneinander angeglichen.

	Crem & LPS	AG & LPS
n	5	5
Hypothermie	keine	keine
Beginn Fieber	t = 195 min bzw. 3,25 h	t = 150 min bzw. 2,5 h
Maximaltemperatur (n.s.)	39,06 ± 0,11°C bei t = 315 min bzw. 5,25 h	39,51 ± 0,2°C bei t = 360 min bzw. 6 h
Minimaltemperatur (n.s.)	37,46 ± 0,13 bei t = 90 min bzw. 1,5 h	37,23 ± 0,22°C bei t = -45 min bzw. 0,75 h
Ende Fieber	t = 600 min bzw. 10 h	t = 585 min bzw. 9,75 h
Dauer Fieber	405 min bzw. 6,75 h	435 min bzw. 7,25 h

Tab. 24: Zusammenfassende Darstellung des Temperaturverlaufs über 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor 25 % (Crem, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS; n.s.: nicht signifikant. (Dauer des Fiebers wurde nicht statistisch verglichen).

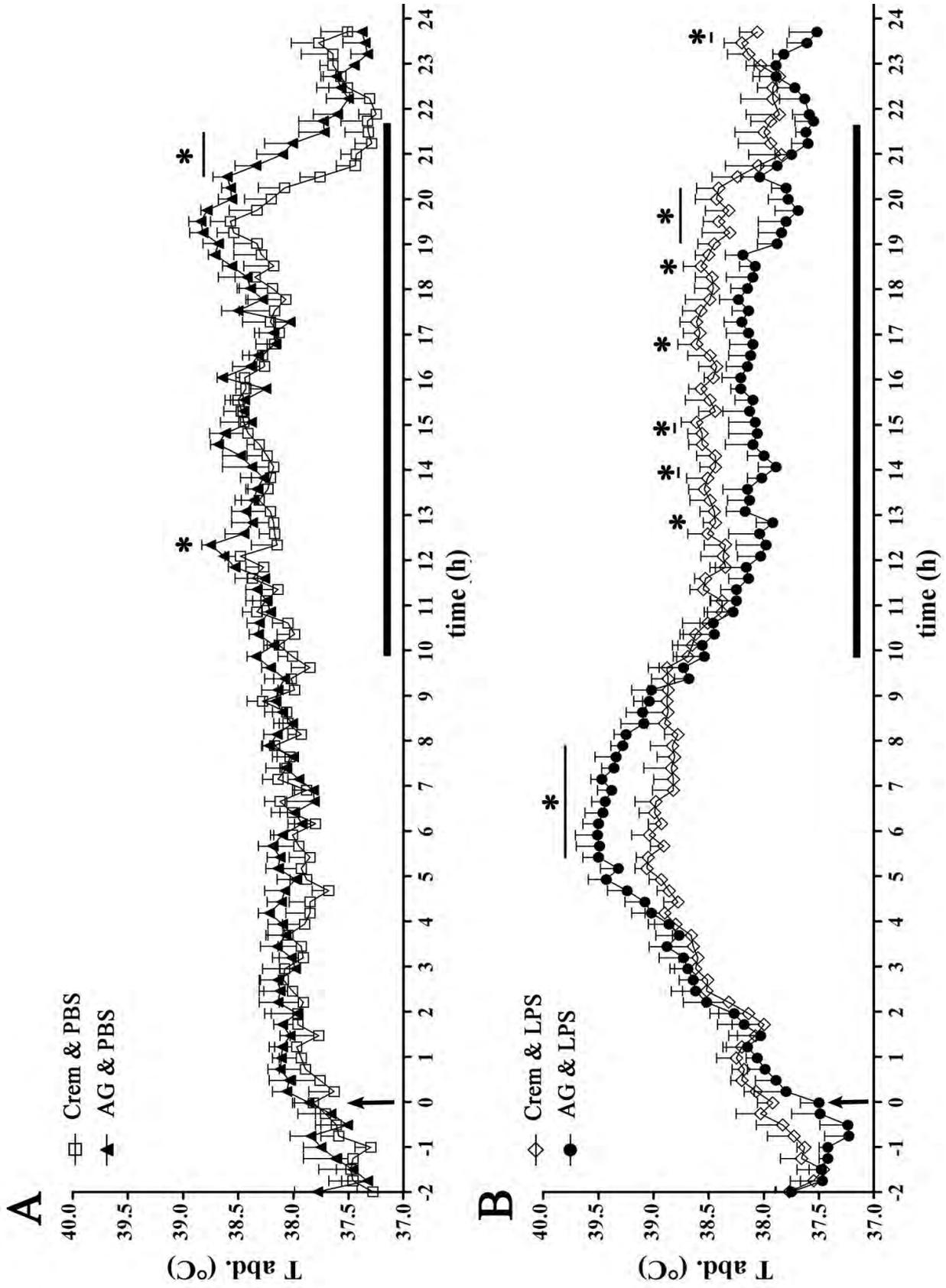


Abb. 57

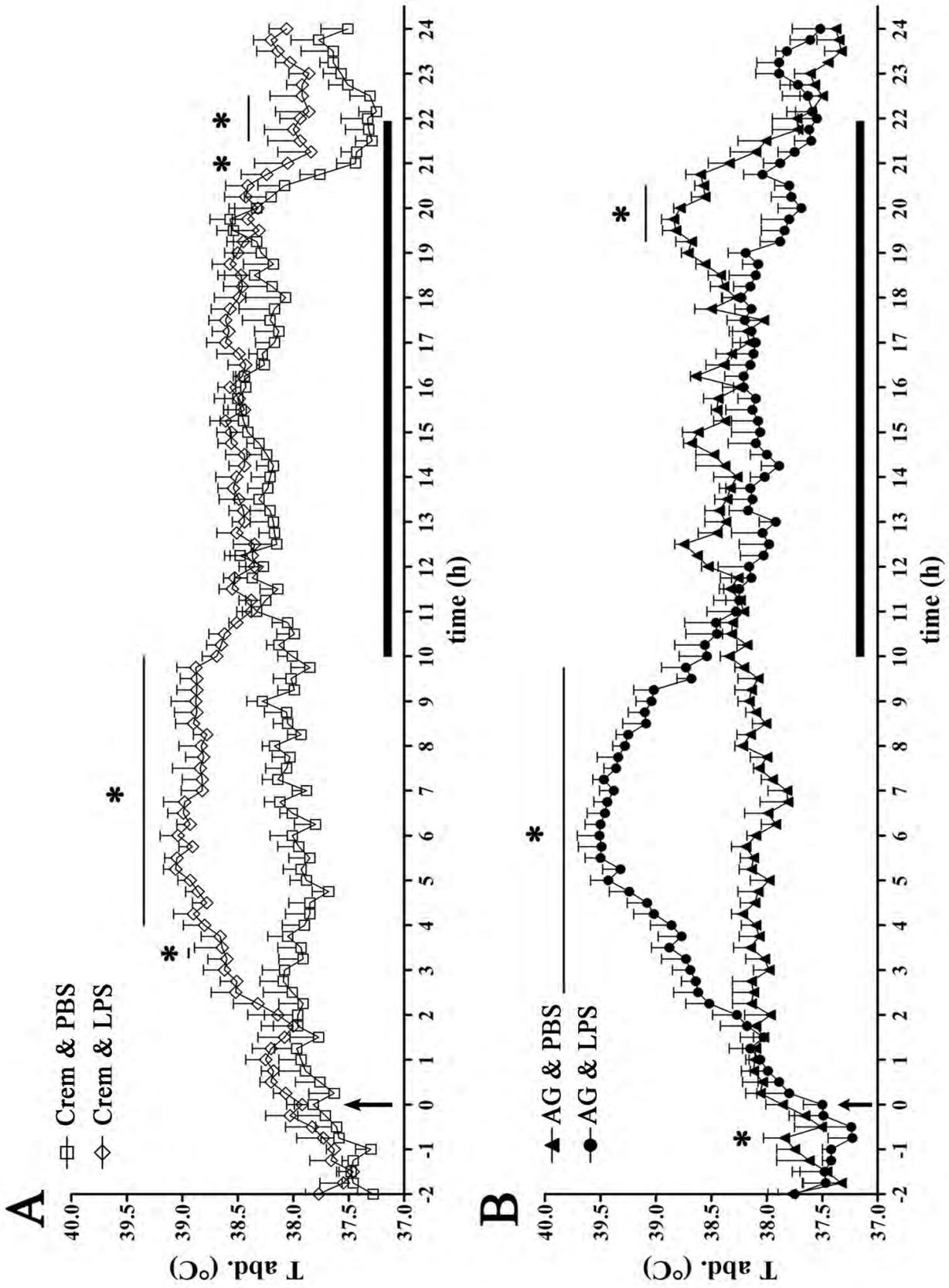


Abb. 58

Abb. 57 & 58: Verlauf der intraabdominal gemessenen Körperkerntemperatur nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion im Zeitraum von 24 h

Der Zeitpunkt der Injektion (i.p.) ist mit einem Pfeil markiert. Intracerebroventrikuläre Injektionen fanden zum Zeitpunkt $t = -1$ h, also 60 min vor intraperitonealen Injektionen statt. Die Dunkelphase ist in allen Graphen mit einer schwarzen Linie markiert. Crem: 25 % Cremophor®EL, AG: 5 mM AG490, LPS: 100 µg/kg KM.; * $P < 0,05$. Tierzahlen: Siehe Tab. 24.

In Abb. 57 sind der Vergleich beider Kontrollgruppen (Crem & PBS, AG & PBS, A) sowie die Gegenüberstellung beider LPS-stimulierter Gruppen (Crem & LPS, AG & LPS, B) dargestellt.

Abb. 58 zeigt die Einzelvergleiche zwischen LPS-stimulierten Tieren und ihren PBS-behandelten Kontrollen.

1.1.2. Fieberindex

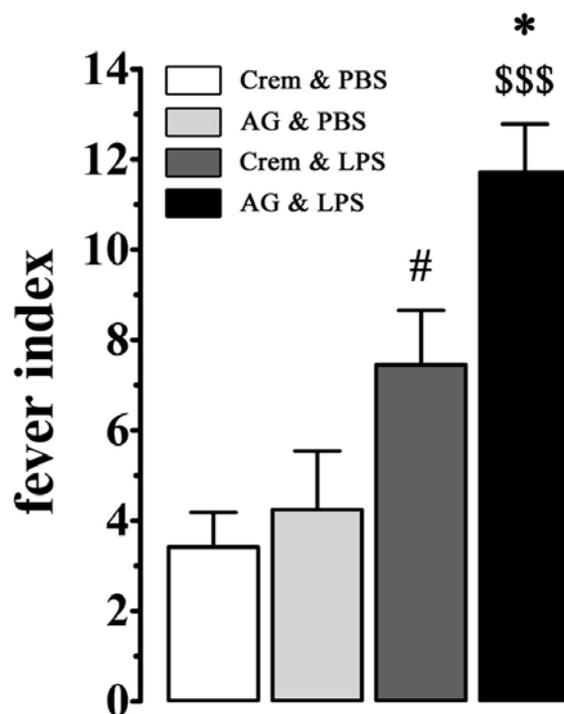


Abb. 59: Fieberindex vom Zeitpunkt 0 bis 10 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS. # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): # $P < 0,05$; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$\$\$ $P < 0,001$; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * $P < 0,05$. Tierzahlen: Siehe Tab. 24.

Die Betrachtung des Fieberindex, also der Fläche unterhalb der Fieberkurve auf Basis der mittleren Temperatur im Bereich $t = -2$ Stunden bis $t = 0$ (vgl. Abb. 21, S. 79), über eine Dauer von 10 Stunden bestätigte die Beobachtungen. So wiesen zum Einen beide LPS-stimulierten Gruppen im Vergleich zur direkten Kontrolle (gleiche Vorbehandlung, PBS i.p.) einen signifikant erhöhten Fieberindex auf, wobei die Signifikanz in der Gruppe AG & LPS deutlicher ausfiel (Abb. 59). Außerdem war der Fieberindex dieser Gruppe auch im Vergleich zur mit Cremophor vorbehandelten Gruppe (Crem & LPS) signifikant erhöht.

1.1.3. Lokomotorische Aktivität

Die lokomotorische Aktivität wurde über den gesamten Versuchszeitraum (8- oder 24 Stunden) aufgezeichnet. Die innerhalb von 24 Stunden nach LPS-Injektion gezählten Einzelaktivitäten ("counts") wurden nochmals in Tag- (Hellphase) und Nachtaktivität (Dunkelphase) untergliedert.

Aufgrund der Nachtaktivität der Tiere konnten in den Tagesstunden keine signifikanten Veränderungen der lokomotorischen Aktivität der einzelnen Gruppen festgestellt werden. In der zwölfstündigen Dunkelphase im Anschluss an die intraperitoneale Injektion von 100 µg/kg KM LPS zeigten beide entsprechend behandelten Gruppen, unabhängig von der intracerebroventrikulären Vorbehandlung, eine signifikante Verminderung der lokomotorischen Aktivität im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe, die stattdessen PBS erhalten hatte (Abb. 60 B). Diese betrug 73 % für die mit Cremophor vorbehandelte Gruppe und 56 % nach AG490-Vorbehandlung. Bei Betrachtung der lokomotorischen Gesamtaktivität über 24 Stunden nach den Injektionen zeigte sich lediglich in der mit dem Lösungsmittel Cremophor (Crem) vorbehandelten Gruppe anschließend an die LPS-Injektion eine deutliche Verminderung (75 %). Vorbehandlung mit AG490 dagegen konnte diesen Effekt der LPS-Stimulation nahezu ausschalten, so dass die mittlere Gesamtaktivität der Tiere dieser Gruppe nur um 20 % reduziert war und sich damit von der PBS-behandelten Kontrolle nicht mehr signifikant unterschied (Abb. 60 C). Im direkten Vergleich der jeweils über einen Zeitraum von 15 Minuten zusammengefassten Einzelaktivitäten konnte bereits in der Hellphase, vom Zeitpunkt $t = 3$ Stunden an eine tendenziell höhere Aktivität nach AG490-Vorbehandlung und anschließender LPS-Applikation beobachtet werden als nach Vorbehandlung mit Cremophor, die sich in den Nachtstunden fortsetzte (Abb. 60 A).

	Crem & PBS	AG & PBS	Crem & LPS	AG & LPS
n	5	5	5	5
24 h Aktivität ("counts")	6245 ± 741,2	5005 ± 755,9	1545 ± 421,5 ###	3994 ± 574,8 *
Tagesaktivität (12 h, "counts")	1349 ± 163	1544 ± 378,7	854,4 ± 113	2031 ± 764,7
Nachtaktivität (12 h, "counts")	4511 ± 671,3	3808 ± 523,4	1234 ± 181,1 ##	1660 ± 502,9 \$\$

Tab. 25: Gemittelte Zahlenwerte der kumulativen lokomotorischen Aktivität nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.); # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): ## P<0,01, ### P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$\$ P<0,01; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05

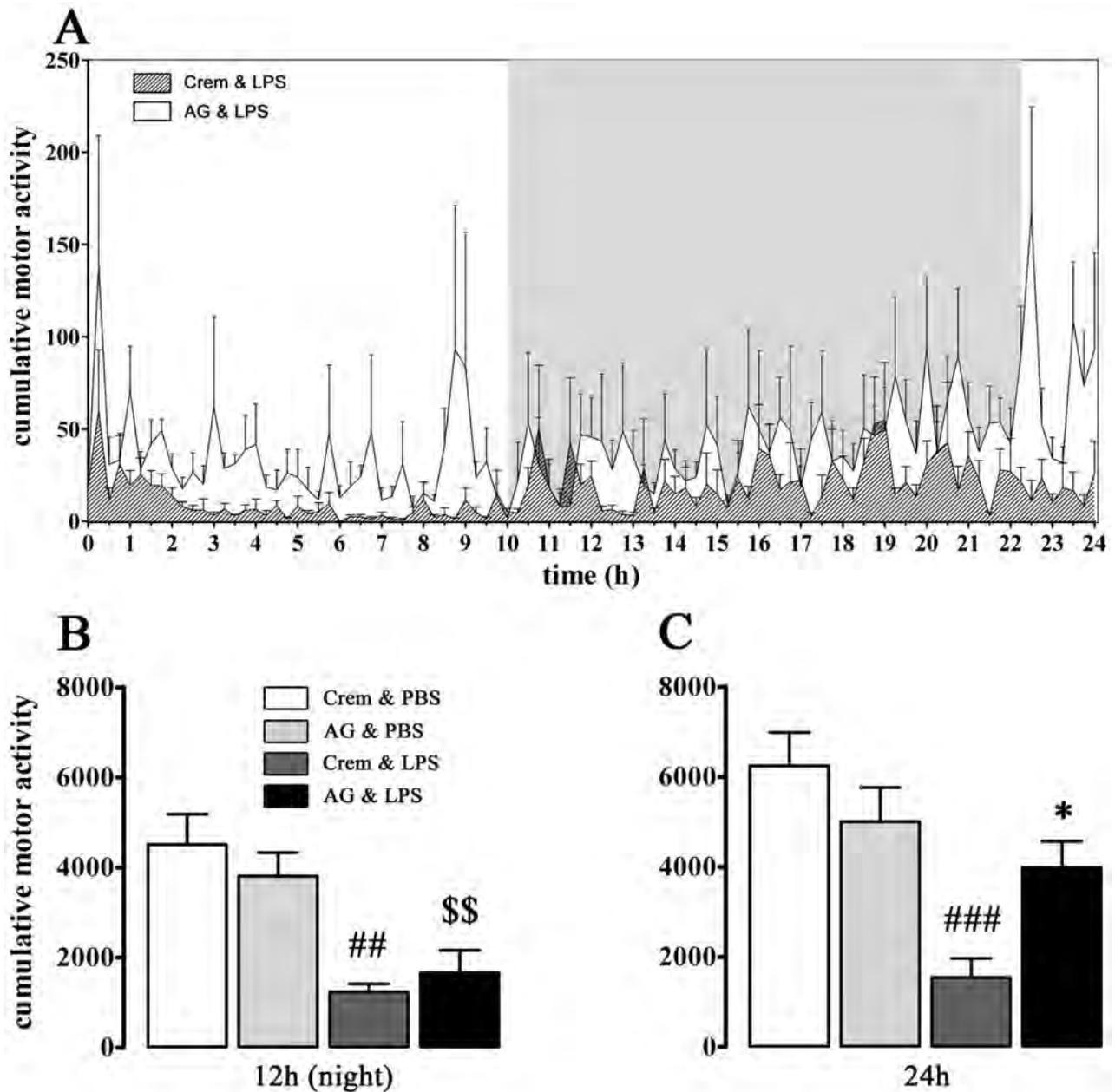


Abb. 60: Kumulative lokomotorische Aktivität innerhalb der Dunkelperiode (12 h) bzw. 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

A: Aktivitätsmuster (je über 15 Minuten gemittelte Gesamtaktivität) LPS-stimulierter Tiere nach Cremophor- oder AG490-Vorbehandlung. Die Nachtphase ist grau unterlegt. B: Gesamtaktivität aller Gruppen in der 12 stündigen Dunkelperiode, C: Gesamtaktivität aller Gruppen im gesamten Versuchszeitraum (24 h), AG490-Vorbehandlung hemmte den Aktivitätsverlust nach LPS-Stimulation im Vergleich zur PBS-Kontrolle nahezu komplett.

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): ## P<0,01, ### P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$\$ P<0,01; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05. Tierzahlen: Siehe Tab. 25.

1.1.4. Futter- und Wasseraufnahme

Der Futter- und Wasserkonsum wurde über den gesamten Versuchszeitraum (8- oder 24 Stunden) aufgezeichnet. Für die ersten 8 Stunden während der Hellphase, die den Injektionen folgte, war in beiden mit 100 µg/kg KM LPS stimulierten Gruppen eine Abnahme des Futterkonsums erkennbar, die jedoch nur in der mit AG490 intracerebroventrikulär vorbehandelten Gruppe signifikante Ausmaße annahm (Abb. 61 A). Aufgrund der Nachtaktivität der Tiere, wurde dieser Trend in den folgenden 12 Stunden der Dunkelphase deutlicher. Unabhängig von der Vorbehandlung, führte die intraperitoneale LPS-Stimulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe, die stattdessen PBS erhalten hatte, zu einer Verringerung der aufgenommenen Futtermenge. Nach Vorbehandlung mit Cremophor ging die Aufnahme um 84 % zurück. Tiere, die mit AG490 vorbehandelt worden waren, nahmen infolge der LPS-Injektion durchschnittlich 81 % weniger Futter auf als ihre direkten PBS-Kontrollen (Abb. 61 B). Innerhalb der 24 Stunden, die sich den intraperitonealen Injektionen anschlossen, zeigte sich ein entsprechendes Bild. Beide LPS-stimulierten Gruppen wiesen einen deutlich reduzierten Futterkonsum gegenüber ihren Kontrollen auf (80 % für beide Vorbehandlungen, Abb. 61 C, Tab. 26).

Auch die Reduktion des Wasserkonsums infolge der LPS-Injektion zeigte sich in den ersten 8 Stunden nur in der AG490-vorbehandelten Gruppe deutlich (Abb. 62 A). Während der Dunkelphase nahmen LPS-stimulierte Tiere nach Cremophor-Vorbehandlung durchschnittlich signifikant weniger Wasser auf als ihre PBS-behandelten Kontrollen (-62 %). AG490-Vorbehandlung dämmte den Effekt ein: So verringerte sich die Wasseraufnahme dieser Tiere infolge der LPS-Stimulation nur um 35 % verglichen mit der Kontrollgruppe (AG & PBS). Die Reduktion des Wasserkonsums war in der Nachtphase nach AG490-Vorbehandlung signifikant schwächer als in der LPS-stimulierten, Cremophor-vorbehandelten Gruppe (Abb. 62 B). Diese verminderte Adipsie infolge AG490-Vorbehandlung konnte für die Gesamtdauer des Versuchs von 24 Stunden allerdings nicht eindeutig gezeigt werden. Es fiel aber auch hier die Verringerung des Wasserkonsums nach AG490 und LPS im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrolle mit 42 % geringer aus als nach der Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel Cremophor (63 %, Abb. 62 C, Tab. 26).

	Crem & PBS	AG & PBS	Crem & LPS	AG & LPS
8 h (Hellphase)				
n	10	10	8	8
Futteraufnahme (g)	1,63 ± 0,26	3,37 ± 1,21	0,14 ± 0,06	0,53 ± 0,50 \$
Wasseraufnahme (g)	1,82 ± 0,66	4,17 ± 1,51	0,93 ± 0,61	0,03 ± 0,03 \$
12 h (Dunkelphase)				
n	5	5	5	4
Futteraufnahme (g)	16,22 ± 0,53	15,42 ± 0,59	2,64 ± 0,95 ###	2,88 ± 0,99 \$\$\$
Wasseraufnahme (g)	28,92 ± 1,39	30,94 ± 3,81	11,12 ± 1,75 ###	20,03 ± 4,76 \$, *
24 h				
n	5	5	4	5
Futteraufnahme (g)	18,06 ± 0,48	17,74 ± 0,34	3,65 ± 1,05 ###	3,54 ± 0,81 \$\$\$
Wasseraufnahme (g)	28,96 ± 1,33	31,74 ± 3,49	10,76 ± 2,81 ##	18,56 ± 5,49 \$

Tab. 26: Gemittelte Zahlenwerte der mittleren kumulativen Futter- und Wasseraufnahme nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.); # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): ## P<0,01, ### P<0,001; \$: Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$ P<0,05, \$\$\$ P<0,001; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05

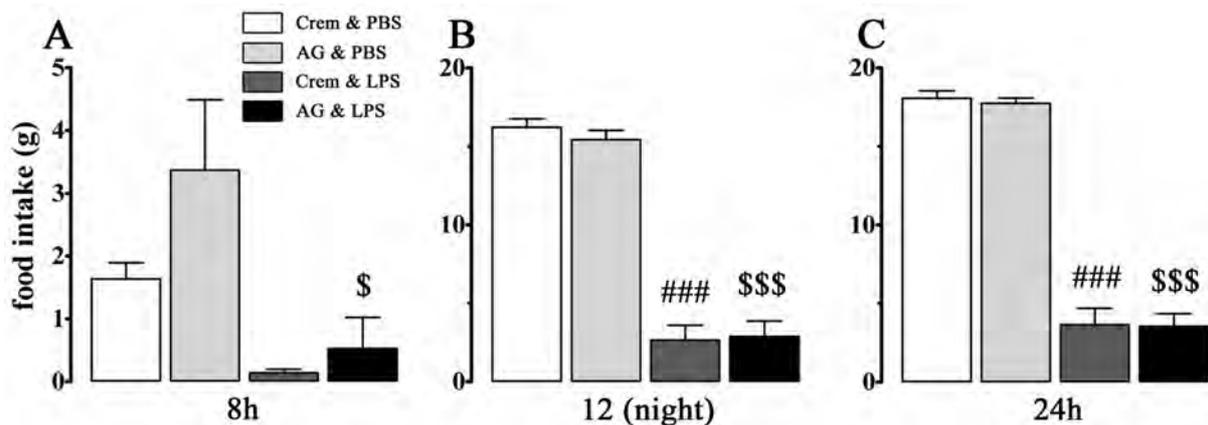


Abb. 61

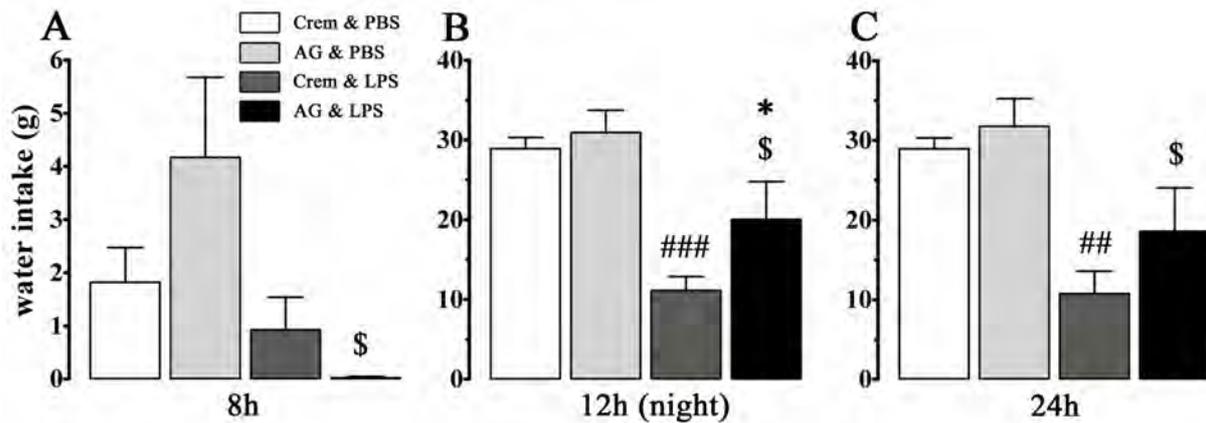


Abb. 62

Abb. 61 & 62: Kumulative Futter- und Wasseraufnahme in verschiedenen Zeiträumen innerhalb 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

A: Futter-/Wasseraufnahme (g) innerhalb der ersten 8 h nach den Behandlungen (Hellphase), B: Futter-/Wasseraufnahme in der 12 stündigen Dunkelphase im Anschluss an die Behandlungen, C: Gesamtfutter-/Wasserkonsum im kompletten Versuchszeitraum von 24 h. Vorbehandlung mit AG490 verringerte die LPS-induzierte Adipsie in der Nachtphase deutlich.

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): ## P<0,01, ### P<0,001; \$: Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$ P<0,05, \$\$\$ P<0,001; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05. Tierzahlen. Siehe Tab. 26.

1.1.5. Körpermasse

Die Dokumentation der Entwicklung der Körpermasse erfolgte wiederum über einen Zeitraum von 24 Stunden. Beide mit PBS behandelten Gruppen zeigten eine leichte Zunahme der Körpermasse (Abb. 63, Tab. 27), die von der Vorbehandlung (Cremophor oder AG490) nicht beeinflusst wurde. Injektion von 100 µg/kg KM LPS verursachte in beiden vorbehandelten Gruppen einen signifikanten Verlust an Körpermasse im Vergleich zur jeweiligen, PBS-behandelten Kontrollgruppe. Die Tiere der mit AG490 vorbehandelte Gruppe nahmen dabei nach LPS-Stimulation signifikant weniger ab, als die der Cremophor-vorbehandelten Vergleichsgruppe (Abb. 63 A). Dieser Unterschied lag im Schnitt bei 5,5 g. In Bezug auf das Ausgangsgewicht der Tiere vor dem Versuch konnte zwar ein entsprechender Trend ebenfalls beobachtet werden, allerdings erreichte der dieser (1,76 %) keine signifikanten Ausmaße (Abb. 63 B).

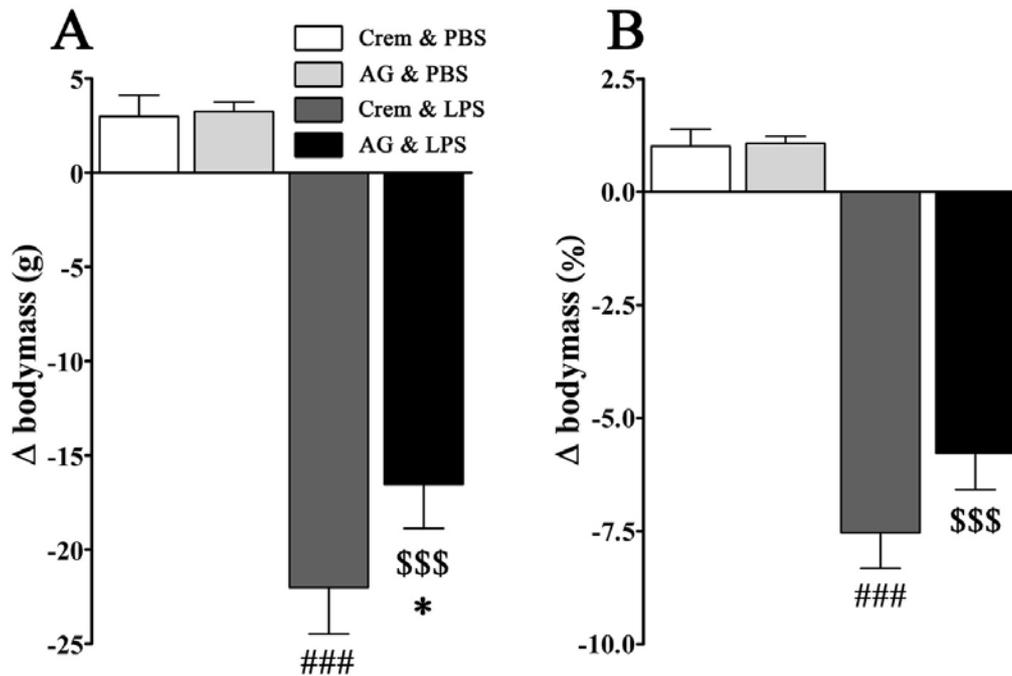


Abb. 63: Entwicklung der Körpermasse in Gramm (A) bzw. Prozent (B) innerhalb von 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Die Tiere wurden direkt vor dem Versuch sowie zum Endpunkt der Messungen nach 24 h gewogen.

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): #### P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$\$\$ P<0,001; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05. Tierzahlen: Siehe Tab. 27.

	Crem & PBS	AG & PBS	Crem & LPS	AG & LPS
n	5	5	5	5
Zu-/Abnahme (g)	2,98 ± 1,14	3,26 ± 0,49	-22,02 ± 2,46 ####	-16,54 ± 2,34 \$\$\$; *
Zu-/Abnahme (%)	1,01 ± 0,38	1,07 ± 0,16	-7,54 ± 0,79 ####	-5,78 ± 0,80 \$\$\$

Tab. 27: Mittlere Zu- oder Abnahme der Körpermasse innerhalb von 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion.

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.); # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): #### P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$\$\$ P<0,001; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05

1.2. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma

Plasmaproben der unterschiedlich vorbehandelten Tiere wurden 8 oder 24 Stunden nach deren intraperitonealen Behandlung entnommen (vgl. Kap. II.C., 2.3., S. 97) und mittels Bioassay auf das Vorhandensein von bioaktivem Interleukin (IL)-6 bzw. Tumornekrosefaktor (TNF)- α untersucht.

1.2.1. IL-6

Tiere, denen intraperitoneal PBS injiziert worden war, zeigten nach 8 Stunden nur basale Expression von IL-6 im Hypothalamus und wiesen auch im Vergleich zur ersten Teilstudie, in der die Tiere keine intracerebroventrikuläre Injektion erhalten hatten, keine Erhöhung auf (Abb. 43, S. 131). Weder die Applikation des Lösungsmittels Cremophor, noch des JAK-Inhibitors AG490 beeinflussten diese basale Expression zu diesem Zeitpunkt. Die Injektion von 100 μ g/kg KM LPS verursachte in beiden Gruppen, unabhängig von der Vorbehandlung, einen signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration nach 8 Stunden (Abb. 64 A, Tab. 29). 24 Stunden nach den intraperitonealen Injektionen konnte nach PBS-Behandlung wiederum keine Erhöhung der Plasmaspiegel an bioaktivem IL-6 über basale Werte hinaus festgestellt werden. Nach LPS-Stimulation waren die Werte zu diesem Zeitpunkt lediglich in der mit Cremophor vorbehandelten Gruppe noch signifikant erhöht, während AG490-vorbehandelte Tiere bereits auf Basalniveau abgesenkte Mengen an IL-6 aufwiesen (Abb. 64 B).

1.2.2. TNF α

Bioaktives TNF α konnte nach 24 Stunden in keiner Probe detektiert werden (Detektionslimit 6 pg/ml). 8 Stunden nach LPS-Applikation zeigten lediglich 2 von 4 Proben der Gruppe, die zuvor mit AG490 vorbehandelt worden war, messbare TNF α -Mengen, in allen anderen Gruppen konnte das Zytokin nicht detektiert werden (Abb. 65, Tab. 29).

	Crem & PBS	AG & PBS	Crem & LPS	AG & LPS
n (8 h)	5	4	3	4
n (24 h)	5	5	5	5

Tab. 28: Tierzahlen der Bestimmung bioaktiver Zytokine im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 μ g/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 μ g/kg KM LPS (i.p.)

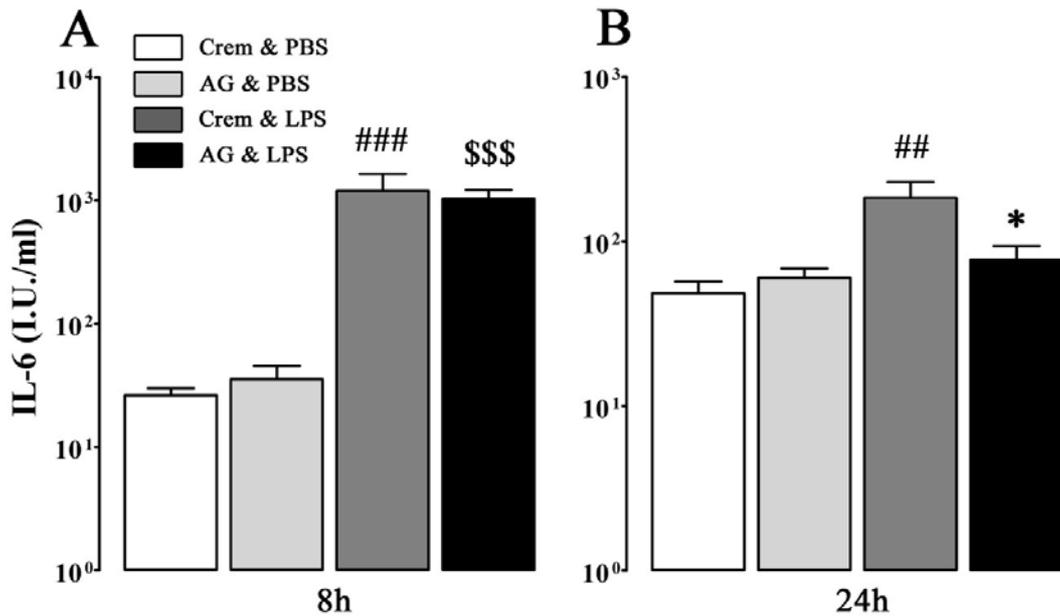


Abb. 64: Gehalte an bioaktivem IL-6 zum Zeitpunkt 8- und 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): ## P<0,01, ### P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$\$\$ P<0,001; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05. Die Werte wurden vor Berechnung der Statistik logarithmiert. Tierzahlen: Siehe Tab. 28.

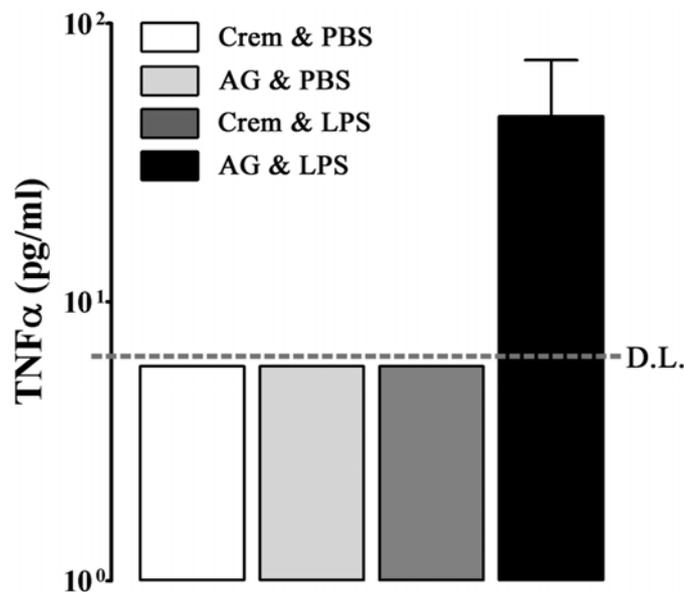


Abb. 65: Gehalte an bioaktivem TNFα zum Zeitpunkt 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Das Detektionslimit lag bei 6 pg/ml, in der Gruppe AG & LPS konnte nur in 2 von 4 Proben TNFα detektiert werden. Tierzahlen: Siehe Tab. 28.

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.).

	Crem & PBS	AG & PBS	Crem & LPS	AG & LPS
IL-6 (I.U./ml)				
8 h	26,4 ± 3,61	35,5 ± 10,15	1203 ± 441,1 ###	1033 ± 190,8 \$\$\$
24 h	48,4 ± 8,71	60,2 ± 8,56	184 ± 45,37 ##	77,2 ± 16,53 *
TNFα (pg/ml)				
8 h	< 6	< 6	< 6	46,34 ± 27,53 (3x < 6)
24 h	< 6	< 6	< 6	< 6

Tab. 29: Mittlere Konzentrationen bioaktiver Zytokine im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.); # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS); ## P<0,01, ### P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS); \$\$\$ P<0,001; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen:

* P<0,05

2. Einfluss von AG490 auf die Immunreaktivität inflammatorischer Transkriptionsfaktoren im OVLT und SFO

Die Beurteilung der NF-IL6-I.R. erfolgte auf der Grundlage immunhistochemischer Untersuchungen von 20 µm starken, coronalen Gehirnschnitten. Aufgrund der Ergebnisse der ersten Teilstudie, in der sich die maximale NF-IL6-I.R. 8 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 100 µg/kg KM LPS zeigte (vgl. Abb. 47, 48 S. 139; Tab. 22, S. 138), wurde dieser Zeitpunkt auch für die Analyse der Auswirkungen des JAK-Inhibitors AG490 gewählt. Betrachtet wurden vor allem die sensorischen circumventrikulären Organe (sCVO), also das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), das *Organum subfornicale* (SFO) und die *Area postrema* (AP), aber auch andere Regionen, die in den Untersuchungen der ersten Teilstudie NF-IL6-I.R. gezeigt hatten (Tab. 22, S. 138).

2.1. NF-IL6 und phospho-NF-IL6

Zunächst fiel eine geringgradige, von der Art der intracerebroventrikulären Behandlung (Cremophor oder AG490) unbeeinflusste NF-IL6-I.R. im gesamten Gehirn von intraperitoneal mit PBS behandelten Tieren auf (Abb. 66 A, B, E, F und a, b, e, f). Die Injektion von 100 µg/kg KM LPS verstärkte diese Immunreaktivität wie erwartet deutlich und unterschied sich in Menge und Intensität der Signale nicht von den Beobachtungen, die nach alleiniger Injektion von 100 µg/kg KM LPS oder 1 mg/kg KM LPS im Rahmen der ersten Teilstudie gemacht worden waren (Abb. 66 C, d, G, H und c, d, g, h, Abb. 46, S. 135). Die semiquantitative Beurteilung der Signaldichte ergab für das OVLT und das SFO eine mehr oder weniger moderate Immunreaktivität nach PBS-Behandlung in beiden Gruppen, die durch die LPS-Stimulation bis zum Maximum erhöht wurde („-“: vollständige Abwesenheit von NF-IL6-Signalen, „+++“ höchste darstellbare Intensität und Dichte). Im cerebralen Cortex zeigte sich ein nur in Einzelheiten abweichendes Bild (Tab. 30). Die NF-IL6-Signale kolokalisierten teilweise mit vW (von Willebrand Faktor)-markierten Endothelzellen, vor allem in Gehirnen von LPS-stimulierten Tieren. Die Verwendung eines Antikörpers, der sich gegen eine an Serin 105 phosphorylierte Form von NF-IL6 richtete (p-NF-IL6), zeigte sehr ähnliche Ergebnisse (Abb. 67). So konnte die durch JAK vermittelte Phosphorylierung von NF-IL6 an dem entsprechenden Serinrest (vgl. Kap. I., 3.2.2.2., S. 42) durch Vorbehandlung mit AG490 für den Zeitpunkt 8 Stunden nach LPS-Injektion nicht sichtbar gehemmt werden.

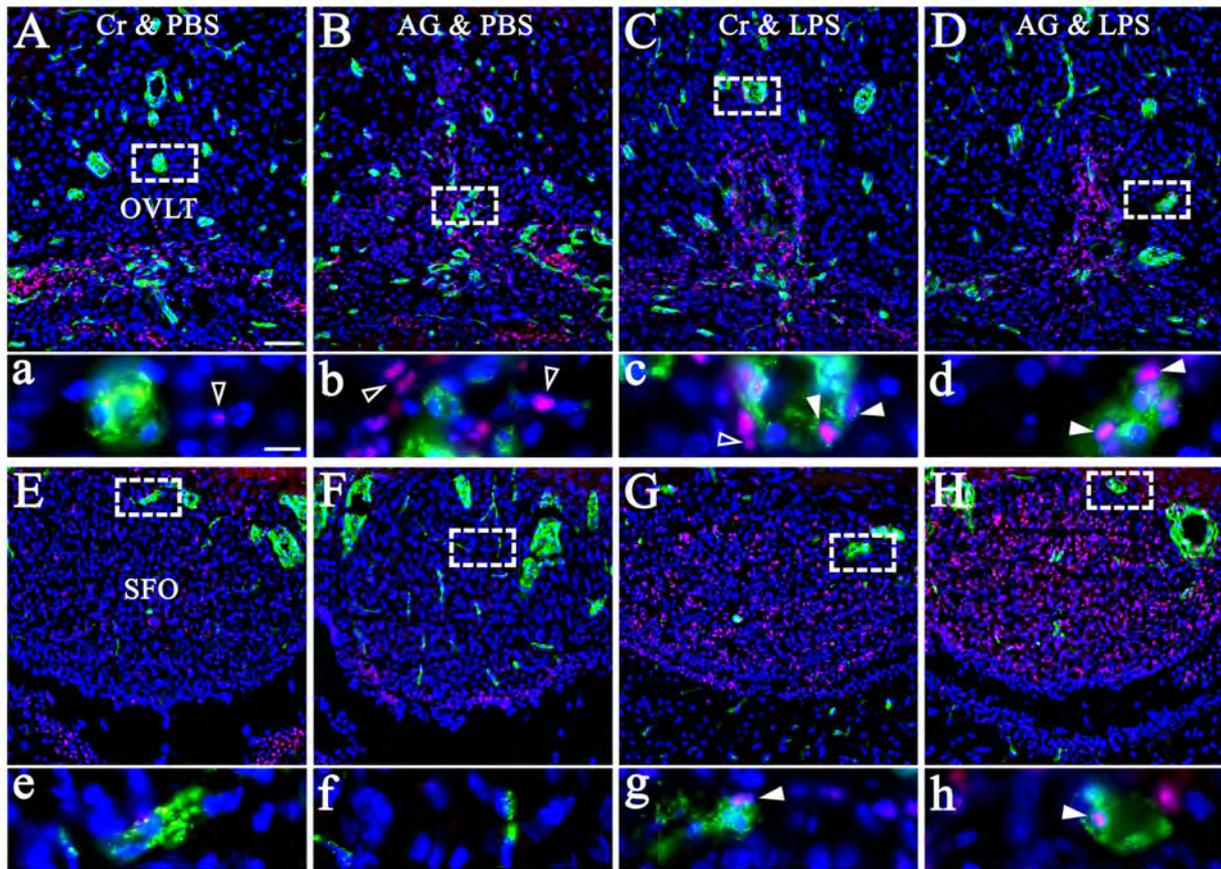


Abb. 66

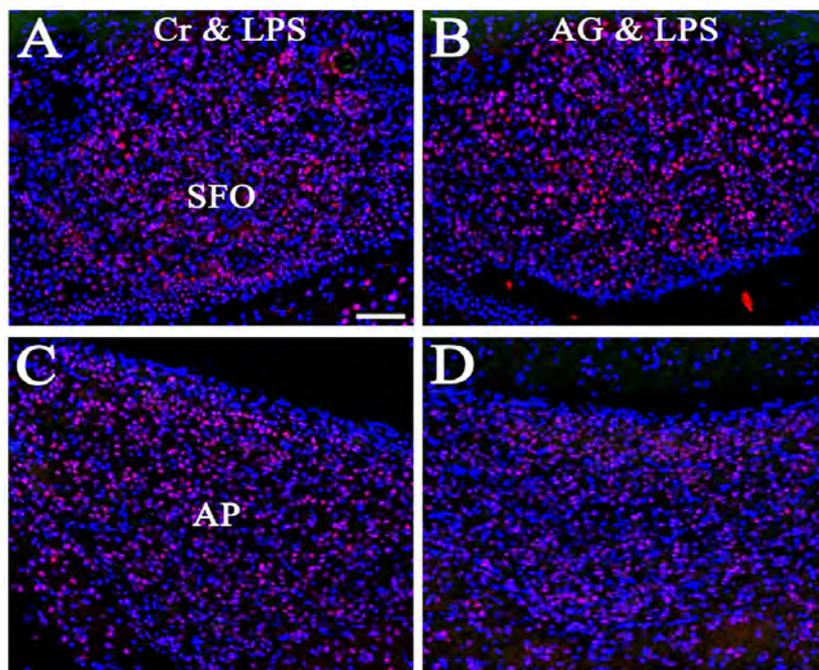


Abb. 67

Abb. 66: NF-IL6-I.R. im OVLT und SFO 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Übersichtsaufnahmen (A-H) zeigen die grundsätzliche Verteilung von nukleären NF-IL6-Signalen (pink), vergrößerte Ausschnitte (a-h) verdeutlichen deren teilweise Kolo-kalisation mit dem Zellmarker von Willebrand Faktor für Endothelzellen (grün). Der blaue Kanal zeigt die Kernfärbung (DAPI). Die vergrößerten Bereiche sind in Übersichtsaufnahmen durch einen weißen Kasten markiert. Gefüllte Pfeilspitzen verweisen auf NF-IL6-positive Endothelzellen, offene Pfeilspitzen zeigen nukleäre NF-IL6-Signale in anderen Zellphänotypen. Größenmarker in A entspricht 50 µm und gilt für alle Übersichtsaufnahmen, Größenmarker in a entspricht 10 µm und gilt für alle Ausschnittsvergrößerungen. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*, SFO: *Organum subfornicale*

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Cr, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Cr (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.).

Abb. 67: phospho (p)-NF-IL6-I.R. im SFO und in der AP 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Farbkanäle: pink: nukleäre p-NF-IL6-Signale, grün: p-STAT3-Signale, blau: Kernfärbung (DAPI). Größenmarker in A entspricht 50 µm und gilt für alle Aufnahmen. Es konnte kein Unterschied der p-NF-IL6-Signaldichte zwischen Cremophor- und AG490-vorbehandelten Tieren detektiert werden. Die schwachen p-STAT3-Signale sind durch die Überlagerung mit der stärkeren NF-IL6-Färbung nicht erkennbar, obwohl p-STAT3 in den untersuchten Regionen zum dargestellten Zeitpunkt vorlag (siehe Abb. 68 E-H). SFO: *Organum subfornicale*, AP: *Area postrema*

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Cr, i.c.v.) & LPS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & LPS (i.p.).

Ausgewählte Gehirnstrukturen	Nukleäre NF-IL6-Immunreaktivität (8 h)			
	Crem & PBS	AG & PBS	Crem & LPS	AG & LPS
Vorderhirn				
Cortex	+	+	+++	+++
Circumventrikuläre Organe				
<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>	+	++	+++	+++
<i>Organum subfornicale</i>	+	(+)	+++	+++
Alle Strukturen	+	+	+++	+++

Tab. 30: Semiquantitative Beurteilung der nukleären NF-IL6-I.R. in verschiedenen Hirnarealen 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). Zeichen: – = Keine I.R., +++ = maximale I.R.

2.2. STAT3 und phospho-STAT3

Da die Aktivierung der Janus-Kinase (JAK) auch Einfluss auf die nukleäre Translokation von STAT3 hat, wurde dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls hinsichtlich der beobachtbaren Immunreaktivität nach den verschiedenen Behandlungen in den sCVO und anderen Hirnarealen untersucht. Der Zeitpunkt 8 Stunden im Anschluss an die intraperitonealen Injektionen war hierbei ungünstig, da das Maximum der STAT3-I.R. einem früheren Zeitpunkt (2 - 4 Stunden) zugeordnet wird und die Immunreaktivität daran anschließend wieder deutlich abnimmt (Gautron et al., 2002; Harre et al., 2002). Dennoch war eine moderate STAT3-I.R. als Folge der Behandlung mit 100 µg/kg KM LPS erkennbar, die sich allerdings von der intracerebroventrikulären Applikation des JAK-Inhibitors AG490 im Vergleich zur Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel nicht unterschied (Abb. 68 A-C). Ein grundlegendes Vorliegen von STAT3-Signalen auch in PBS-behandelten Kontrolltieren konnte hier nicht festgestellt werden. Außerdem wurde immunhistochemisch überprüft, ob der verwendete JAK-Inhibitor das Vorkommen einer phosphorylierten Form des Transkriptionsfaktors (phospho-STAT3 oder p-STAT3) zum untersuchten Zeitpunkt beeinflusst hatte. Dazu wurde ein entsprechender Antikörper verwendet, der sich gegen die am Tyrosinrest 705 phosphorylierte Form von STAT3 richtete, da dieser der typischen Phosphorylierungsstelle durch die JAK entspricht. Ebenso wie für STAT3 konnten 8 Stunden nach LPS-Stimulation nur wenige p-STAT3-Signale detektiert werden. Eine Hemmung der Phosphorylierung an dieser Stelle durch AG490 wurde nicht festgestellt, die Signaldichte in der entsprechend vorbehandelten Gruppe war tendenziell sogar größer als im Gehirn Cremophor-vorbehandelter Tiere (Abb. 68 E-H).

2.3. NF-κB

Ähnlich verhielt es sich mit der Immunreaktivität des ebenfalls inflammatorisch bedeutsamen Transkriptionsfaktors Nuclear Factor (NF) κB, der seine maximale Aktivierung ebenfalls zu einem früheren Zeitpunkt (~1-3 Stunden) aufweist (Nadjar et al., 2003; Rummel et al., 2006). Die 8 Stunden nach LPS-Stimulation nachweisbare NF-κB-I.R. war sehr gering und zeigte ebenfalls keine Unterschiede aufgrund der Vorbehandlung (Abb. 69).

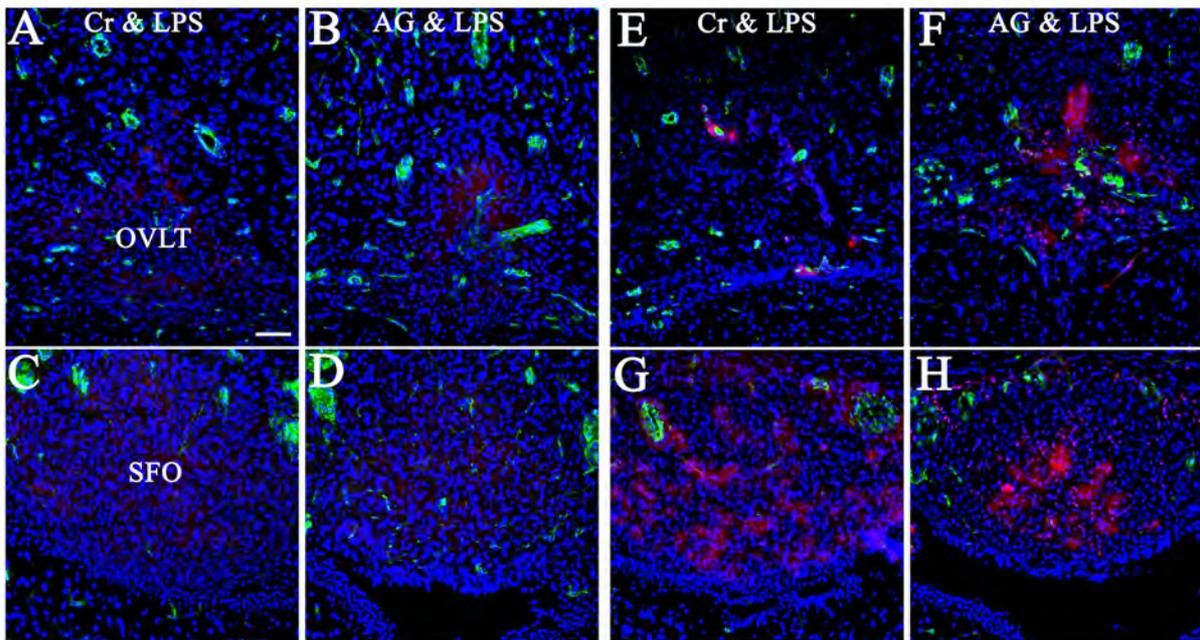


Abb. 68: STAT3- und p-STAT3-I.R. im OVLT und SFO 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

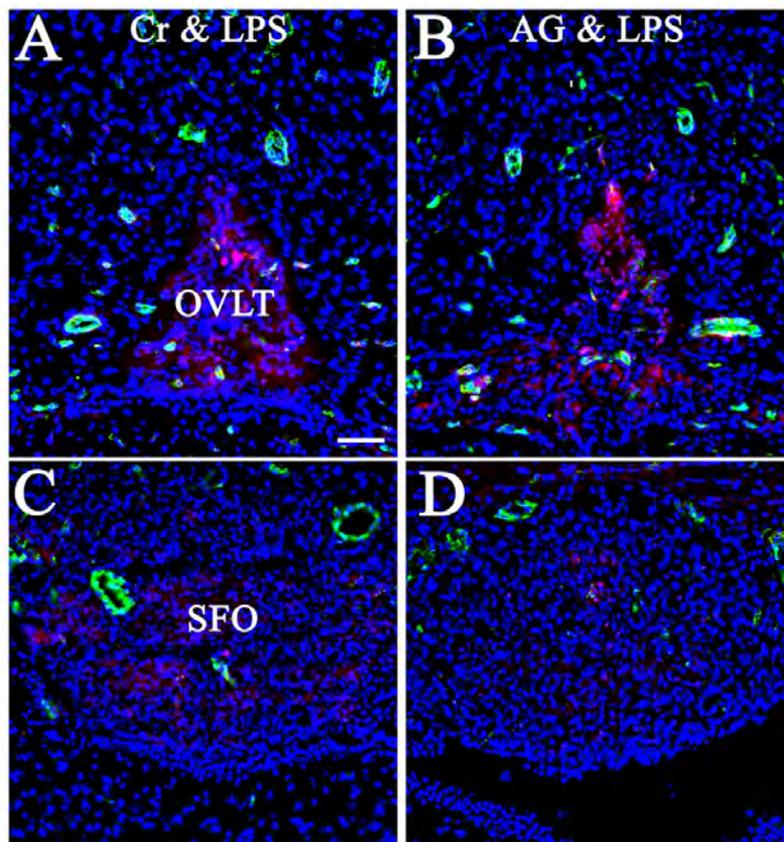


Abb. 69: NF-κB-I.R. im OVLT und SFO 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

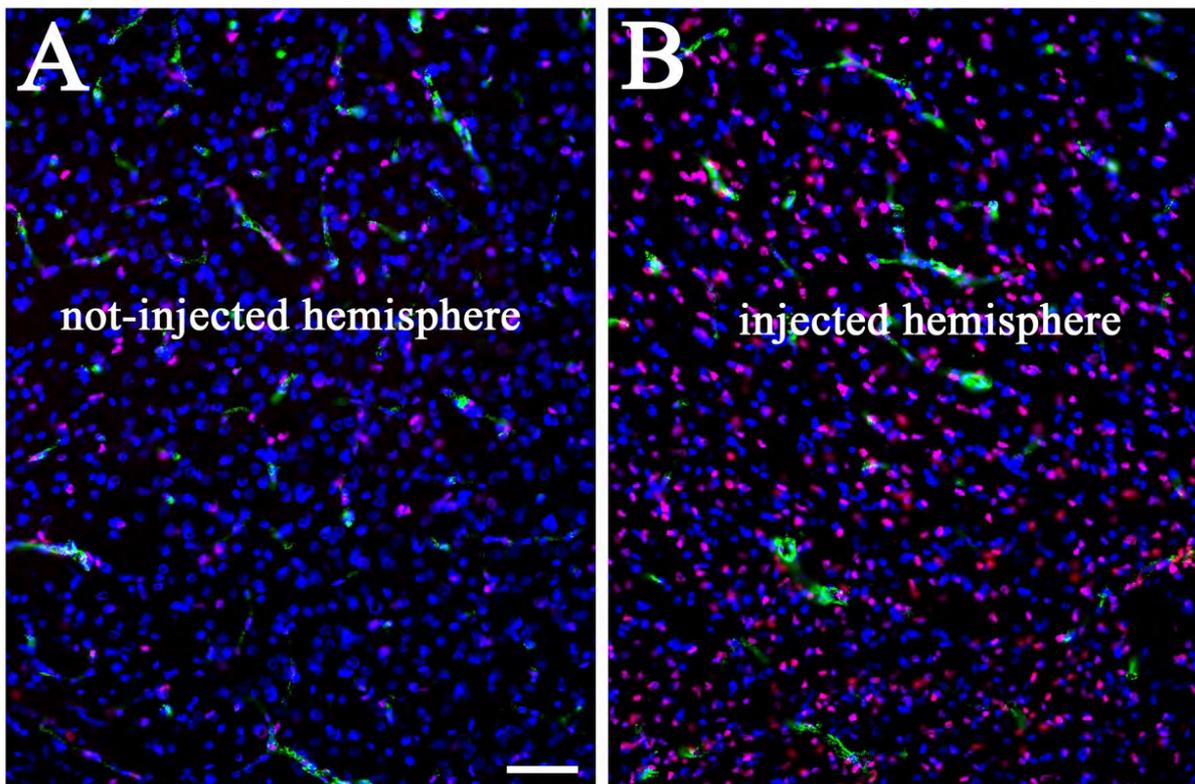
Abb. 68 & 69:

Farbkanäle: pink: Abb. 68: nukleäre STAT3-Signale (A-D) bzw. p-STAT3-Signale (E-H); Abb. 69: nukleäre NF- κ B-Signale, grün (beide): Endothelzellen (von Willebrand Faktor), blau (beide): Kernfärbung (DAPI). Größenmarker in A entspricht jeweils 50 μ m und gilt für alle Aufnahmen. OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*, SFO: *Organum subfornicale*

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Cr, i.c.v.) & LPS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & LPS (i.p.)

2.4. Einflüsse der i.c.v. Injektionen

Die grundlegende, von der intraperitonealen Behandlung unabhängige und in allen Kontrollgruppen auftretende NF-IL6-I.R. gab Hinweise auf Effekte, die sich möglicherweise allein aus der Methode der intracerebroventrikulären Injektion ergeben hatten. Immunhistochemisch wurde im rechten Anteil des cerebralen Cortex allgemein eine deutliche Verdichtung der NF-IL6-Signale festgestellt. Dies betraf auch Gehirnareale der für die Injektion genutzten Hemisphäre, die nicht in direkter Nähe zur Injektionsstelle lagen (Abb. 70).

**Abb. 70: NF-IL6-I.R. in den beiden Gehirnhemisphären 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion**

Exemplarisch sind die Hemisphären einer Ratte nach Vorbehandlung mit Cremophor®EL (25 %, i.c.v.) und anschließender LPS-Injektion (100 μ g/kg KM, i.p.) dargestellt. Die NF-IL6-Signaldichte in der rechten Hemisphäre (B), in die injiziert wurde, ist deutlich stärker als in der linken (A). Farbkanäle: pink: nukleäre NF-IL6-Signale, grün: Endothelzellen (von Willebrand Faktor), blau: Kernfärbung (DAPI). Größenmarker entspricht 50 μ m.

Auch beim direkten Vergleich der beiden Lateralventrikel konnte in allen Tieren die Seite, in die injiziert worden war, deutlich anhand der stärkeren NF-IL6-I.R. identifiziert werden. So zeigte sich nach intraperitonealer Injektion von PBS lediglich im rechten Ventrikel eine deutliche NF-IL6-I.R. von Ependymzellen und wenigen Zellen des *Plexus choroideus* (Abb. 71 A, B, E, F). LPS-behandelte Tiere wiesen dagegen in beiden Ventrikeln starke NF-IL6-I.R. innerhalb des *Plexus choroideus* auf (Abb. 71 C, D, G, H). Außerdem fiel bei relativ weit rostral aufgenommenen Bildern die Verformung und Ausdehnung des rechten Ventrikels nach der Injektion auf (Abb. 71 B, F). Noch deutlicher wurden die Einflüsse des Eingriffs bei Betrachtung der Einstichstelle selbst, bzw. des jeweils betroffenen Lateralventrikels (siehe auch Abb. 80, S. 185).

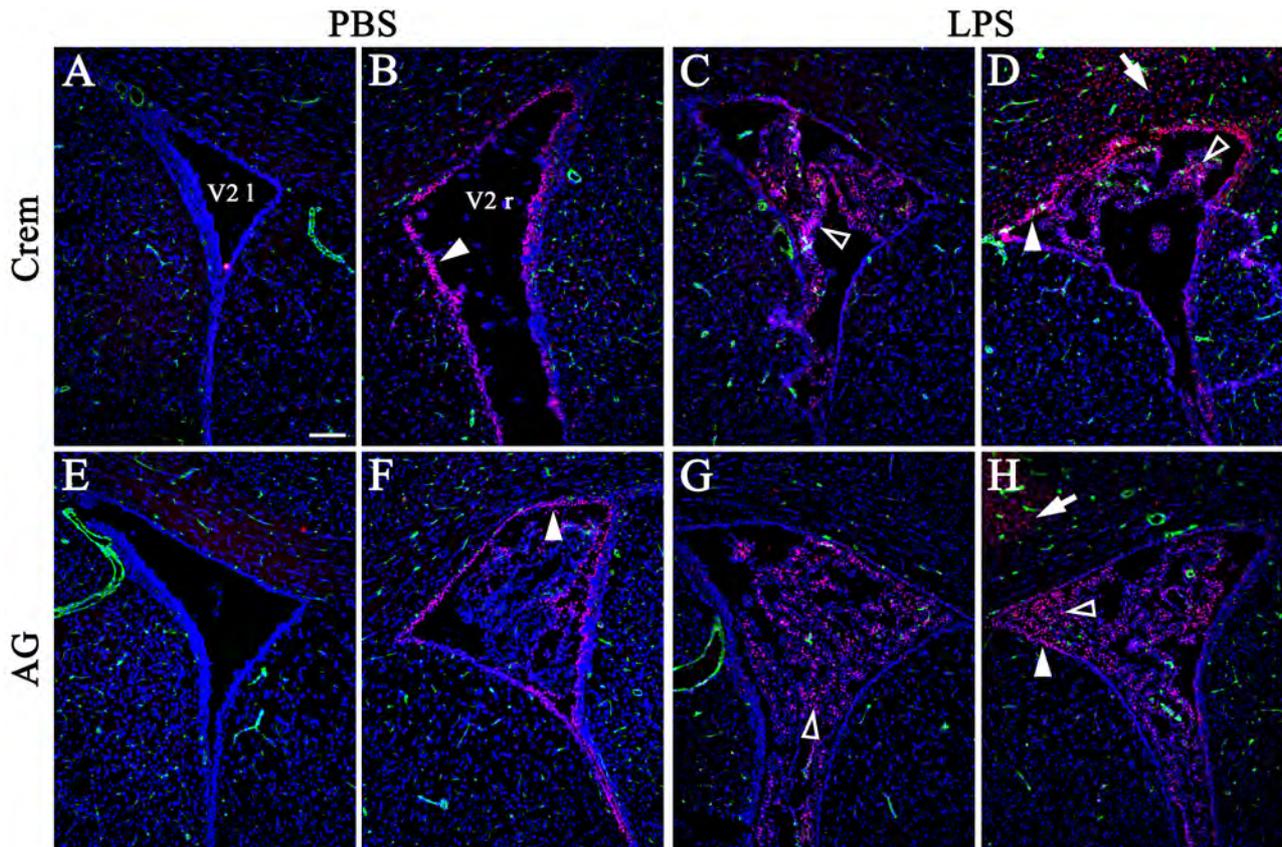


Abb. 71: NF-IL6-I.R. in den Lateralventrikeln 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Die Aufnahmen stammen aus verschiedenen Ebenen des Cerebrum (rostral-caudal), Aufnahmen einer Behandlungsgruppe zeigen jeweils die gegenüberliegenden Ventrikel ein und desselben Schnittes. In rostralen Bereichen (A, B, E, F) ist die Formänderung des rechten Ventrikels nach der Injektion deutlich zu erkennen. Nukleäre NF-IL6-Signale (pink) zeigten sich in Kontrolltieren (PBS i.p.) vor allem in ependymalen Zellen des rechten Ventrikels (A, B, E, F; gefüllte Pfeilspitzen), nach LPS-Stimulation (100 µg/kg KM) auch beidseitig im *Plexus choroideus* (C, D, G, H; offene Pfeilspitzen) und dorsal des rechten Ventrikels (gefüllte Pfeile). Weitere Farbkanäle: grün: Endothelzellen (von Willebrand Faktor), blau: Kernfärbung (DAPI). Größenmarker entspricht 100 µm. 2VI bzw. r: linker bzw. rechter Lateralventrikel

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.).

3. Beeinflussung der LPS-bedingten Induktion der Genexpression im Gehirn durch AG490

3.1. Induktion auf mRNA-Ebene im Hypothalamus

Die jeweiligen mRNA-Gehalte der verschiedenen Gruppen wurden für die Zeitpunkte 8- und 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 100 µg/kg KM LPS bzw. PBS, die eine Stunde im Anschluss an die intracerebroventrikuläre Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel (25 % Cremophor in PBS) oder dem JAK-Inhibitor AG490 (5 mM in Cremophor) erfolgt war, ermittelt.

3.1.1. Transkriptionsfaktoren und ihre negativen Regulatoren

Die Expression von NF-IL6-mRNA zeigte sich in beiden LPS-stimulierten Gruppen nach 8 Stunden nicht signifikant erhöht, verglichen mit der jeweiligen PBS-behandelten Kontrollgruppe, die die gleiche Vorbehandlung erhalten hatte (Abb. 72 A). Allerdings lag zum Zeitpunkt 24 Stunden nach LPS-Stimulation eine signifikante Induktion in der mit AG490 vorbehandelten Gruppe vor, sowohl im Vergleich mit der respektiven AG490 & PBS-Kontrolle als auch der Cremophor & LPS-Gruppe (Abb. 72 B). Tribbles (Trib) 1 als möglicher negativer Regulator von NF-IL6 hingegen zeigte nach 24 Stunden in beiden LPS-behandelten Gruppen keine Abweichungen auf mRNA Ebene (Abb. 72 C). Hier war allerdings zuvor infolge der LPS-Injektion eine signifikante Induktion aufgetreten, die entgegen der Ergebnisse zum Zeitverlauf der ersten Teilstudie schon zum Zeitpunkt 8 Stunden, also früher als erwartet, auftrat (Abb. 72). Sie fiel in der mit AG490 vorbehandelten Gruppe deutlicher aus als nach Injektion von Cremophor. Eine signifikante suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3-Induktion als indirektes Maß für eine STAT3-Aktivierung fiel nach 8 Stunden in keiner der LPS-behandelten Gruppen auf, was sich mit den Ergebnissen der Teilstudie zum Zeitverlauf deckte (Abb. 72 E, Abb. 53, S. 148). Auch hier gab es nach 24 Stunden in Tieren, die mit AG490 vorbehandelt und anschließend mit 100 µg/kg KM LPS stimuliert worden waren, eine signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren und zu solchen, die stattdessen mit Cremophor vorbehandelt worden waren. Signifikante Inhibitor of kappa B (IκB) α-Induktion als Nachweis einer NF-κB-Aktivierung zeigte sich entgegen der Studien zum Zeitverlauf (Abb. 53, S. 148) zum relativ späten Zeitpunkt von 8 Stunden nach LPS-Applikation in beiden entsprechenden Gruppen, wobei wiederum die Expressionssteigerung nach Vorbehandlung mit AG490 deutlicher ausfiel (Abb. 72 G). Zum Zeitpunkt 24 Stunden hatten die IκBα-mRNA-Gehalte aller Gruppen wieder Basiswerte erreicht (Abb. 72 H).

3.1.2. Inflammatorische Mediatoren

3.1.2.1. Zytokine

Die Gehalte an IL-1β und IL-6-mRNA unterschieden sich weder nach 8- noch nach 24 Stunden zwischen den verschiedenen behandelten Gruppen (Abb. 73 A-D). 8 Stunden nach LPS-Stimulation kam es in Tieren, die mit Cremophor vorbehandelt worden waren, zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 mRNA-Expression, analog zu den Ergebnissen der Teilstudie zum Zeitverlauf nach LPS-Applikation (Abb. 53, S. 148). Vorbehandlung mit AG490 hingegen kehrte diesen Effekt um und führte im Vergleich dazu zu signifikant erniedrigten IL-10 mRNA-Gehalten (Abb. 73 E). Nach 24 Stunden schien sich tendenziell eine IL-10-Expressionssteigerung in der Gruppe AG490 & 100 µg/kg KM LPS abzuzeichnen, dieser Trend nahm allerdings keine signifikanten Ausmaße an (Abb. 73 F). Die messbare Menge an Tumornekrosefaktor TNFα-mRNA zeigte für alle untersuchten Gruppen nach 8 Stunden keine signifikanten Unterschiede. 24 Stunden im Anschluss an

die LPS-Stimulation ergab sich allerdings in Tieren, die nicht mit dem Inhibitor, sondern lediglich mit dem Lösungsmittel Cremophor vorbehandelt worden waren, eine signifikante Abnahme der TNF α -mRNA gegenüber der PBS-behandelten Kontrolle (Abb. 73 I, J). In Bezug auf den IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) fanden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 73 G, H).

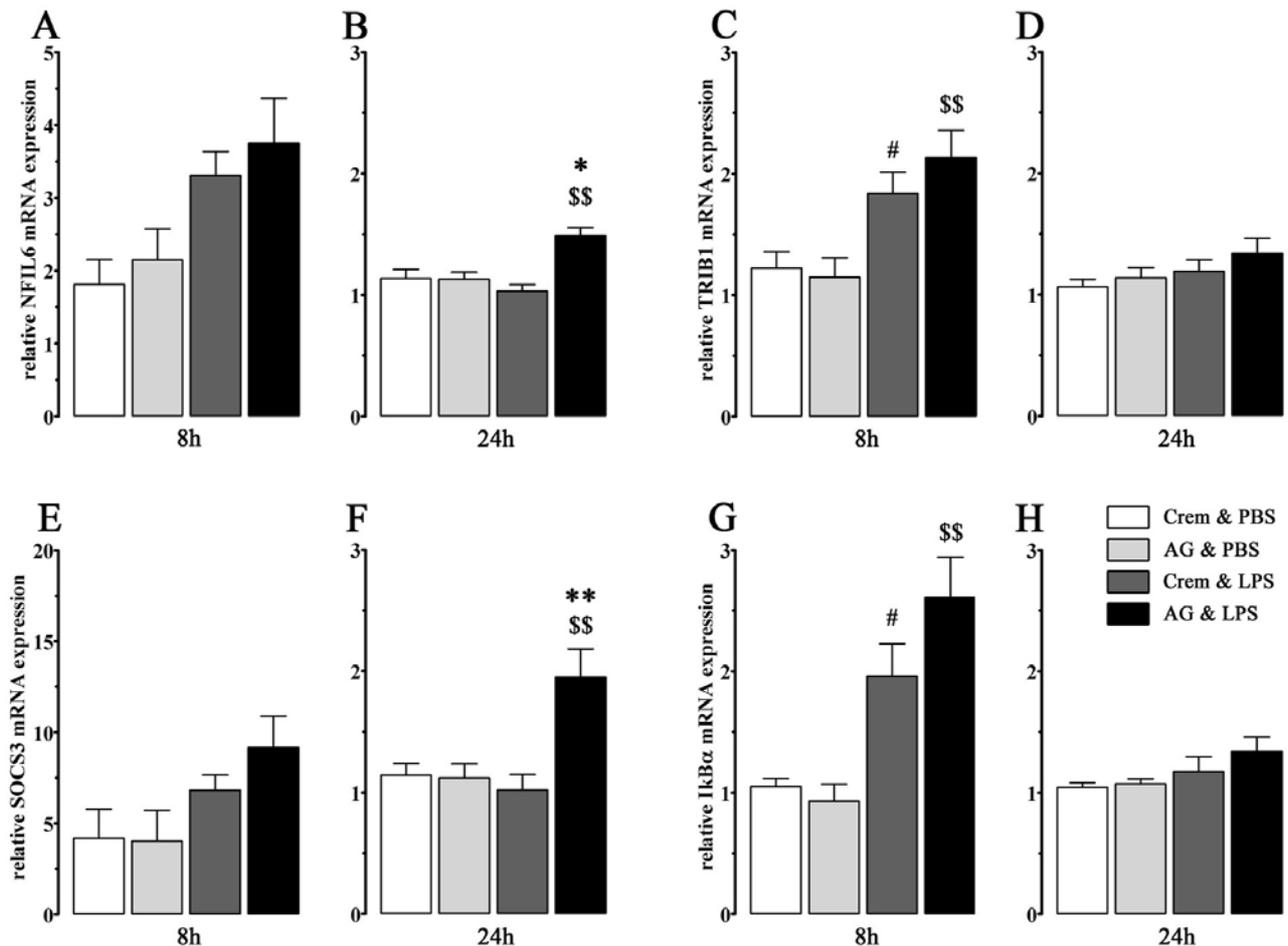


Abb. 72: Induktion der mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren und ihren negativen Regulatoren im Hypothalamus 8- und 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 μ g/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 μ g/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): # P<0,05; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$\$ P<0,01; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * P<0,05, ** P<0,01

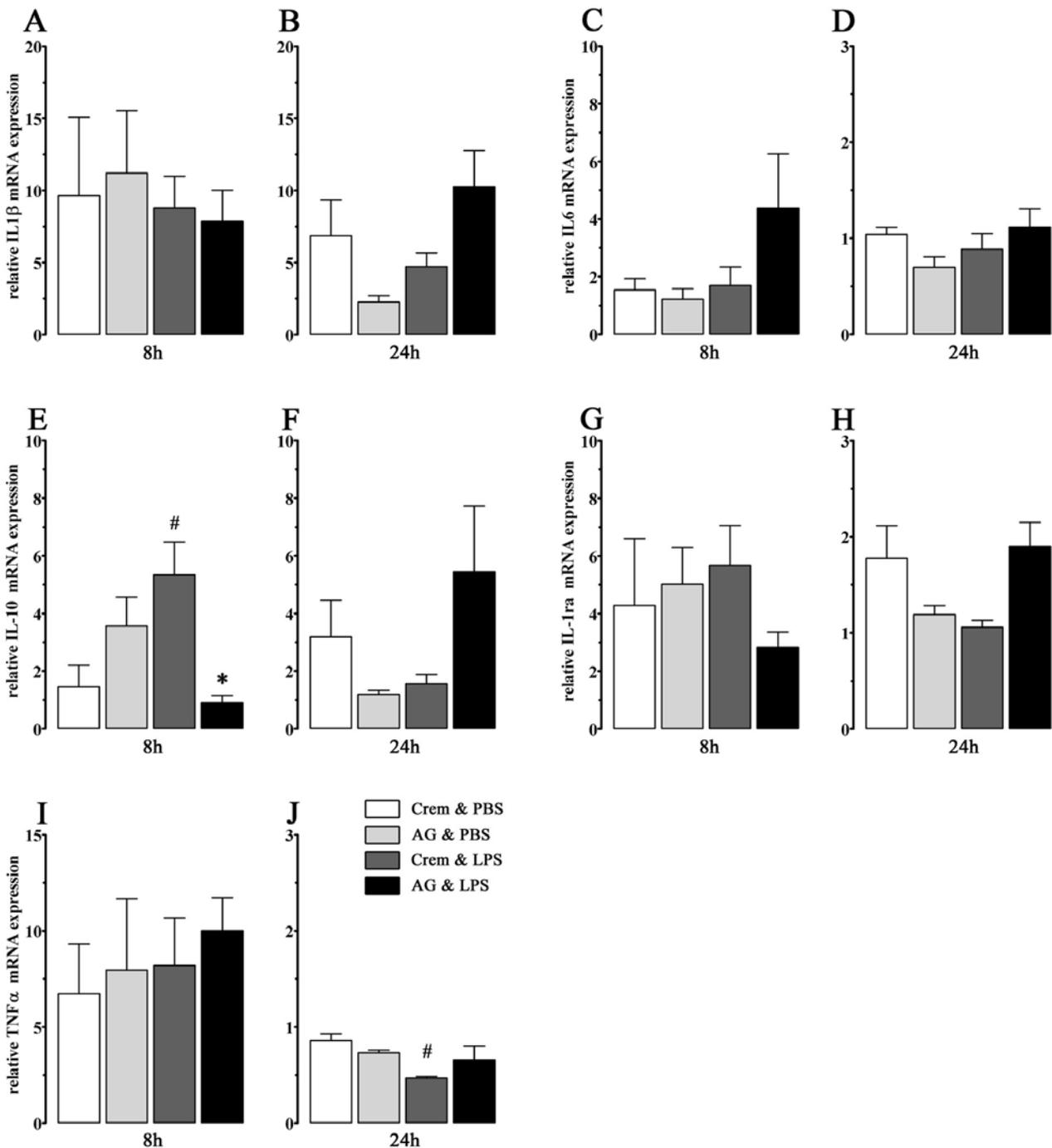


Abb. 73: Induktion der mRNA-Expression von Zytokinen im Hypothalamus 8- und 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrollgruppe (Crem & PBS): # $P < 0,05$; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * $P < 0,05$

3.1.2.2. Enzyme der Prostaglandinsynthese

Für COX2 zeigte sich 8 Stunden im Anschluss an die LPS-Stimulation nur nach Vorbehandlung mit AG490 ein Anstieg des mRNA-Gehalts gegenüber der PBS-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 74 A, C). Nach 24 Stunden waren keine signifikant unterschiedlichen COX2-mRNA-Gehalte zwischen den verschiedenen Gruppen mehr feststellbar (Abb. 74 B). Die LPS-bedingt gesteigerte mPGES-

Expression, die in der Teilstudie zum Zeitverlauf deutlich geworden war (Abb. 53, S. 148), konnte wiederum in beiden LPS-behandelten Gruppen festgestellt werden. Allerdings fiel der Anstieg in der mit AG490 vorbehandelten Gruppe signifikant höher aus als in der Kontrollgruppe, die Cremophor erhalten hatte (Abb. 74 C). Auch hier waren nach 24 Stunden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen detektierbar (Abb. 74 D).

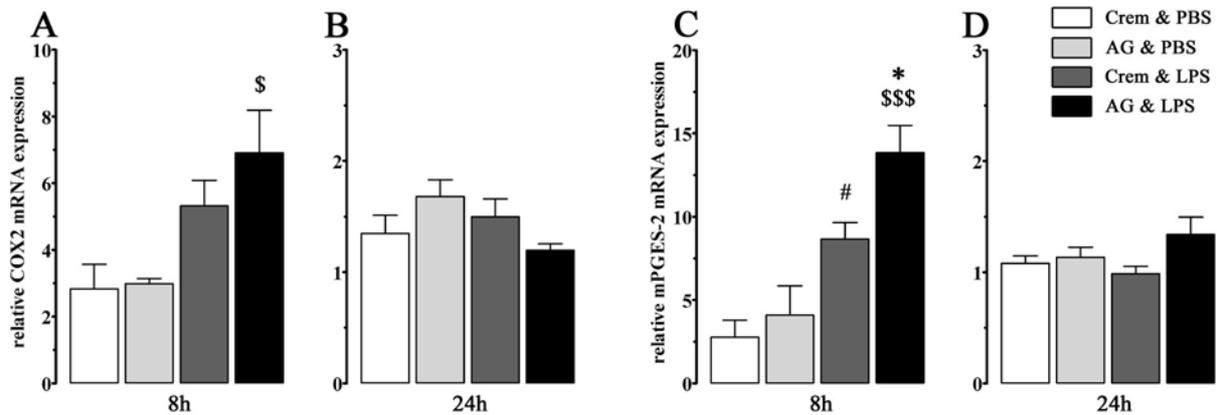


Abb. 74: Induktion der mRNA-Expression von Enzymen der Prostaglandinsynthese im Hypothalamus 8- und 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe Crem & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (Crem & PBS): # $P < 0,05$; \$ Vergleich der Gruppe AG & LPS mit der PBS-behandelten Kontrolle (AG & PBS): \$ $P < 0,05$, \$\$\$ $P < 0,001$; * Vergleich beider LPS-stimulierter Gruppen: * $P < 0,05$

3.2. Induktion von COX2 auf Proteinebene

Die Expression von COX2 im Hypothalamus wurde wiederum auf Proteinebene immunhistochemisch nachgewiesen. Dabei konnte in Kontrolltieren, die mit PBS behandelt worden waren, unabhängig von der intracerebroventrikulären Vorbehandlung keine COX2-Immunreaktivität festgestellt werden. Die Injektion von 100 µg/kg KM LPS bewirkte eine moderate COX2-I.R., die sich über das gesamte Gehirn erstreckte und vor allem im *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) und in gefäßartigen Strukturen im cerebralen Cortex deutlich wurde (Abb. 75 E-H). Die Dichte und Intensität der perinukleären Signale, die zu erheblichen Anteilen mit nukleären NF-IL6-Signalen kolokalisierten, zeigte ähnliche Ausmaße wie in der ersten Teilstudie 8 Stunden nach alleiniger Verabreichung von LPS (vgl. Abb. 56 S. 152). Die Vorbehandlung mit AG490 bewirkte keine deutlich sichtbare Veränderung der detektierten COX2-I.R. im Vergleich zur Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel Cremophor allein.

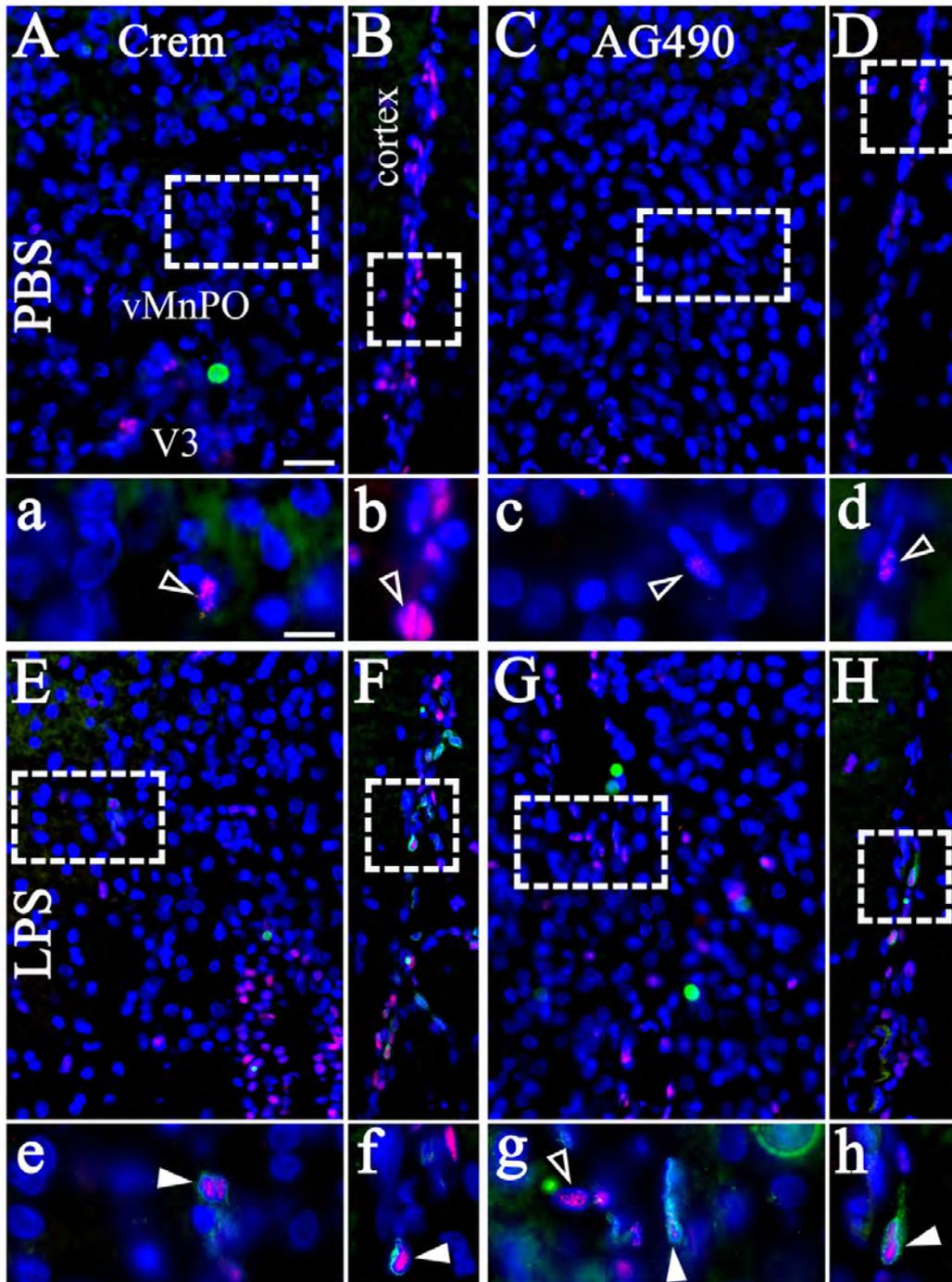


Abb. 75: NF-IL6 und COX2-I.R. im MnPO und gefäßartigen Strukturen des cerebralen Cortex 8 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

In Übersichtsaufnahmen (A-H) sind die Bereiche der vergrößerten Ausschnitte (a-h) mit weißen Kästen markiert. nukleäre NF-IL6-Signale (pink) kolokalisieren nur in LPS-stimulierten Tieren (E-H, e-h) mit perinukleärer COX2-I.R. (grün), angezeigt durch gefüllte Pfeilspitzen. Offene Pfeilspitzen markieren NF-IL6-immunreaktive Zellen, die keine COX2 exprimieren (A-D, a-d). Der blaue Farbkanal repräsentiert die Kernfärbung (DAPI). MnPO: *Nucleus praeopticus medianus*

Versuchsgruppen: Cremophor®EL 25 % (Crem, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 mM AG490 (AG, i.c.v.) & PBS (i.p.), Crem (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und AG (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.).

III.C. Einflüsse von anti-NF-IL6-siRNA auf LPS-induzierte Entzündungsreaktionen

1. Charakterisierung verschiedener siRNA Sequenzen in primären neuroglialen Kulturen der AP

1.1. Auswirkungen verschiedener siRNA Sequenzen auf die LPS-induzierte NF-IL6-I.R. *in vitro*

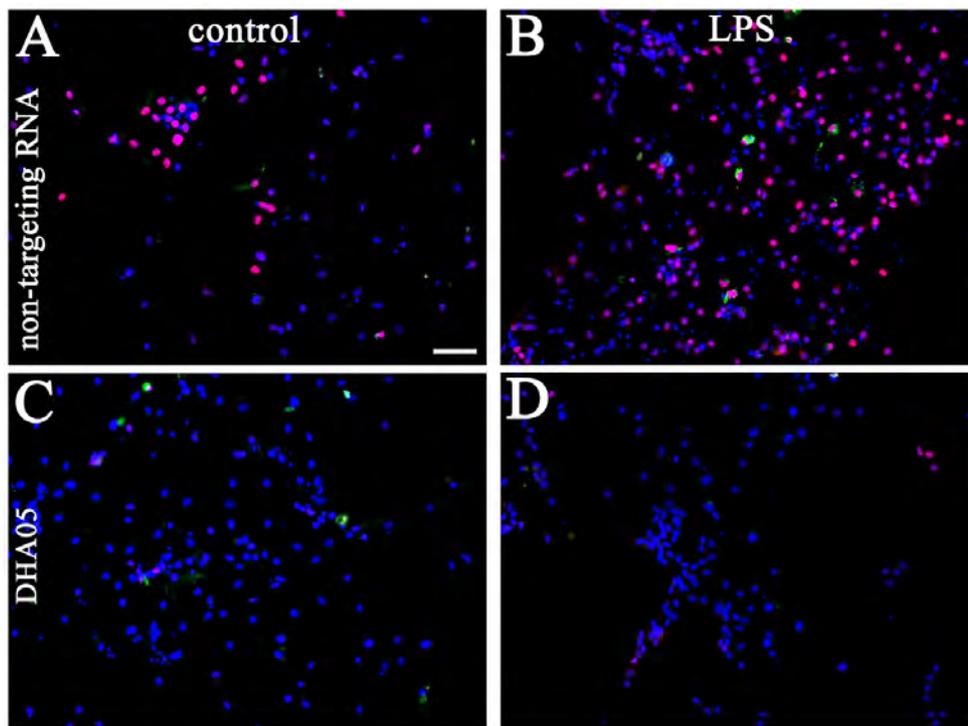


Abb. 76: NF-IL6-I.R. in primären neuroglialen Kulturen der AP nach Behandlung mit anti-NF-IL6-siRNA oder Kontroll-RNA und Inkubation mit LPS oder Kulturmedium über 6 h

Die blaue Kernfärbung (DAPI) zeigt die Umrisse der jeweiligen Kultur. Nukleäre NF-IL6-I.R. stellt sich pink dar. Nach Inkubation mit nicht-zielgerichteter RNA (non-targeting RNA) sind in unstimulierten Kulturen (A) bereits NF-IL6-Signale detektierbar. Diese konstitutive Expression, sowie die Steigerung der Signaldichte nach Stimulation mit 100 µg/ml LPS (B) werden von der ausgewählten siRNA LQ-092218-00-0005 (DHA05) fast komplett ausgeschaltet (C, D). Der grüne Farbkanal markiert Mikrogliazellen. Größenmarker in A entspricht 25 µm und gilt für alle Aufnahmen. AP: *Area postrema*

Die Auswirkungen verschiedener, gegen NF-IL6 gerichteter siRNA in Verbindung mit der Stimulation mit 100 µg/ml LPS wurden anhand immunzytochemischer Untersuchungen primärer neuroglialer Zellkulturen der AP beurteilt. 24 Stunden im Anschluss an die Inkubation mit der entsprechenden siRNA-Lösung und weitere 6 Stunden nach Stimulation mit LPS oder Kulturmedium in Kontrollen, wurden dazu Intensität und Dichte NF-IL6-immunreaktiver (i.r.) Zellen beurteilt. Dabei fiel zum Einen die konstitutive NF-IL6-I.R. einiger nicht-stimulierter Zellen auf, die sich schon beim Dosisvergleich nach LPS-Stimulation (Abb. 50 S. 141) gezeigt hatte. Diese konnte durch einige der anti-NF-IL6-siRNA (Konzentration 50 nM), nicht aber durch die nicht-zielgerichtete Kontroll-RNA (non-targeting RNA) reduziert werden (Abb. 76 A, C). Dabei erwies sich die siRNA mit der Bezeichnung LQ-092218-00-0005 von Dharmacon, im Folgenden als „DHA05“ bezeichnet, als effektivste

Sequenz. Stimulation der Zellen mit 100 µg/ml LPS über 6 Stunden verstärkte die NF-IL6-I.R. gegenüber der konstitutiven Signaldichte. Auch hier zeigten sich keine reduzierenden Effekte der non-targeting RNA in Kontrollkulturen, während Vorbehandlung mit DHA05 eine deutliche Reduktion der NF-IL6-I.R. bewirkte (Abb. 76). Ein ähnlich starker Effekt konnte durch keine der anderen getesteten anti-NF-IL6-siRNA erzielt werden. Die Reduktion der NF-IL6-I.R. fiel dabei sowohl bei stimulierten als auch bei unstimulierten Zellen sehr viel geringer aus und konnte in einigen Fällen gar nicht gezeigt werden (Tab. 31).

	NF-IL6-I.R. Kontrolle	NF-IL6 I.R. nach 100 µg/ml LPS
DHA05	(+)	(+) – ++
DHA06	++	+++
DHA07	(+)/+	+ / ++
DHA08	(+)	+ / ++
RUM2RX	++	+++
RUM4RX	(+)/+	+ / ++
RUM6RX	+ / ++	+ + / + + +
non-targeting RNA	++	+++

Tab. 31: Vergleich des reduzierenden Effekts verschiedener, anti-NF-IL6-siRNA auf die NF-IL6-I.R. in primären neuroglialen Zellkulturen der AP

Zeichen: – = keine NF-IL6-Signale, (+) = geringgradige NF-IL6-I.R., ++/+++ = mittel-/hochgradige NF-IL6-I.R. Alle RNA wurden in 50 nM Konzentration in serum-freiem Medium eingesetzt und über 24 h mit den Kulturen inkubiert. Kontrolle: Inkubation in frischem Kulturmedium. (Genauere Bezeichnungen der siRNA: siehe S. 60)

1.2. Auswirkungen auf die NF-IL6-I.R. in verschiedenen Zelltypen

Die Betrachtung der jeweils reagierenden Zelltypen deckte Unterschiede in der Beeinflussung durch die siRNA auf. So zeigten vor allem Neuronen, die mittels Färbung des Proteins MAP2 (microtubule associated protein) dargestellt wurden, eine grundsätzliche Expression von NF-IL6, die keine erkennbaren Unterschiede nach den verschiedenen Vorbehandlungen (non-targeting RNA oder anti-NF-IL6-siRNA DHA05) und Stimulationen (Kulturmedium = Kontrolle oder 100 µg/ml LPS) aufwies (Abb. 77 E, F, K, L). Ähnlich stellte sich die NF-IL6-I.R. von Mikrogliazellen dar, welche ebenso oftmals konstitutive NF-IL6-Expression zeigten, die von einer Vorbehandlung mit anti-NF-IL6-siRNA kaum beeinflusst wurde (Abb. 77 A, B, G, H). Zusätzlich erwies sich die Anzahl an Mikrogliazellen in einer Kultur als entscheidender Faktor für die Effektivität der eingesetzten siRNA, so dass deren übermäßiges Vorkommen meist mit einer geringeren Reduktion der NF-IL6-Signaldichte und -intensität einherging. Am deutlichsten zeigte sich die hemmende Wirkung der anti-NF-IL6-siRNA DHA05 auf die NF-IL6-I.R. in Astrozyten. Hier bestand zum Einen schon von vornherein eine geringere Grundaktivierung in nicht-stimulierten Kulturen, zum Anderen konnte durch die Vorbehandlung mit DHA05 aber auch eine nahezu vollständige Auslöschung der NF-IL6-Signale infolge der LPS-Stimulation erreicht werden (Abb. 77 C, D, I, J).

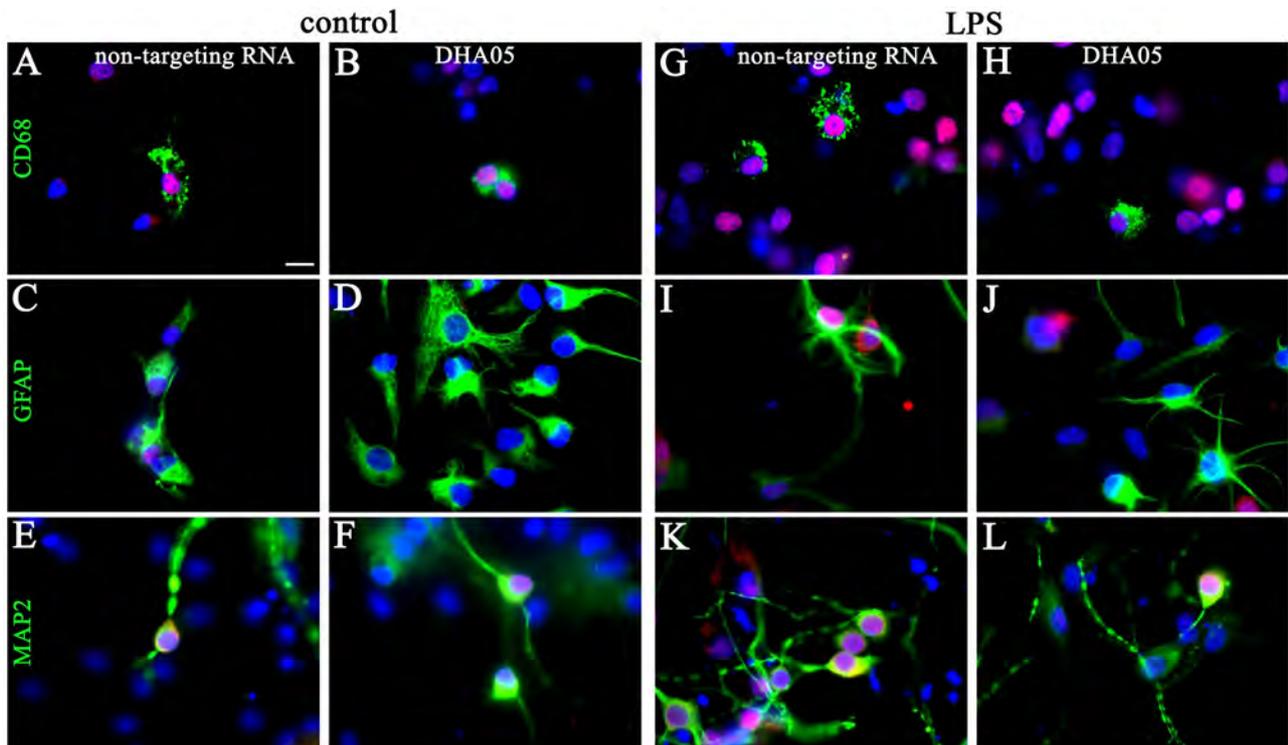


Abb. 77: NF-IL6-I.R. in Mikrogliazellen, Astrozyten und Neuronen nach Behandlung mit anti-NF-IL6-siRNA und Inkubation mit LPS oder Kulturmedium über 6 h

Nukleäre NF-IL6-Signale (pink) kolokalisieren zum Teil mit den verwendeten Zellmarkern (grün). Die Kernfärbung (DAPI) ist blau dargestellt. A - F: Unstimulierte Kulturen, die 6 h mit Kulturmedium inkubiert wurden. DHA05 hemmte die NF-IL6-I.R. vor allem in Astrozyten (D). G - H: Mit 100 µg/ml über 6 h stimulierte Kulturen. Eine deutliche Induktion der NF-IL6-I.R. war erkennbar, DHA05 wirkte vor allem in Astrozyten hemmend (J), die nicht-zielgerichtete RNA (non-targeting RNA) verminderte induzierte NF-IL6-I.R. nicht (G, I, K).

Verwendete Zellmarker: cluster of differentiation 68 (CD68, Mikrogliazellen), glial fibrillary acidic protein (GFAP, Astrozyten), microtubule associated protein 2 (MAP2, Neuronen). Größenmarker in A entspricht 10 µm, gilt für alle Aufnahmen.

1.3. Auswirkungen verschiedener Sequenzen auf die Konzentration bioaktiver Zytokine im Kulturmedium

Zur Bewertung verschiedener siRNA-Sequenzen in Bezug auf ihr Potential zur "downregulation" von möglichen NF-IL6-responsiven Zielgenen, wurden die Mengen an bioaktivem IL-6 und TNF α in Kulturüberständen herangezogen. Diese wurden zum Einen direkt nach 24 stündiger Inkubation der Zellen mit der jeweiligen RNA-Lösung entnommen, um mögliche pro-inflammatorische Effekte der RNA an sich aufzuzeigen bzw. auszuschließen (Abb. 78/ Abb. 79 A). Zum Anderen dienten die Überstände, die nach einer 6 stündigen Inkubation mit Kulturmedium (Kontrollen) oder 100 μ g/ml LPS entnommen worden waren, der Beurteilung des anti-inflammatorischen Potentials der jeweiligen Sequenzen, das möglicherweise mit einer effektiven "downregulation" von NF-IL6 in Zusammenhang hätte stehen können (Abb. 78/ Abb. 79 C).

Die getesteten siRNA wiesen nach Anwendung in einer Konzentration von 50 nmol/l kaum pro-inflammatorisches Potential in Bezug auf die Induktion der IL-6-Produktion in den primären neuroglialen Zellen der AP auf. Lediglich die Behandlung mit der Test-RNA RUM6RX bewirkte nach 24 Stunden eine sichtbare Erhöhung der IL-6-Menge im Kulturmedium im Vergleich zu den nur mit dem Transfektionsreagenz (DharmaFECT) bzw. mit der nicht-zielgerichteten RNA behandelten Kulturen (Abb. 78, Tab. 32). Auch eine eindeutige Induktion der TNF α -Produktion durch die Zellen konnte nur für RUM6RX gezeigt werden, allerdings gab es hier insgesamt größere Variationen zwischen den verschiedenen Sequenzen (Abb. 79). Ein letztendlicher Ausschluss für anschließende *in vivo* Versuche erfolgte daher zunächst einzig für RUM6RX, da bei allen anderen die Gefahr pro-inflammatorischer Effekte aufgrund der Sequenz als vernachlässigbar eingestuft wurde.

Im Anschluss an die 24 Stunden Vorinkubation mit der aufgrund der Ergebnisse der immunzytochemischen Vorversuche favorisierten siRNA erfolgte eine weitere 6-stündige Inkubation der Zellen mit frischem Kulturmedium (Kontrollen) oder 100 μ g/ml LPS. In Kontrollkulturen zeigte sich zunächst keine Hemmung der basalen IL-6 oder TNF α -Produktion (Abb. 78/ Abb. 79 B). Wurden die Kulturen stattdessen mit LPS stimuliert, trat zumindest im Hinblick auf die induzierte IL-6 Produktion durch die Zellen ein tendenziell hemmender Effekt der anti-NF-IL6 siRNA DHA05 auf (Abb. 78 C, Tab. 33). Signifikante Ausmaße wurden jedoch nicht erreicht, und ein ähnlicher, unterdrückender Effekt auf die LPS-induzierte TNF α -Expression war ebenfalls nicht beobachtbar. Diese Ergebnisse veranlassten allerdings nicht zum Ausschluss der Sequenz DHA05, da deren anti-inflammatorisches Potential kein zwingendes Wirksamkeitskriterium in Bezug auf die "downregulation" von NF-IL6 darstellte. Ein deutlicherer Einfluss einer der anderen getesteten siRNA-Sequenzen auf die basale oder induzierte Zytokinproduktion wurde nicht festgestellt und DHA05 daher in Anbetracht aller Vorversuche als die Sequenz der Wahl für nachfolgende *in vivo* Versuche festgelegt.

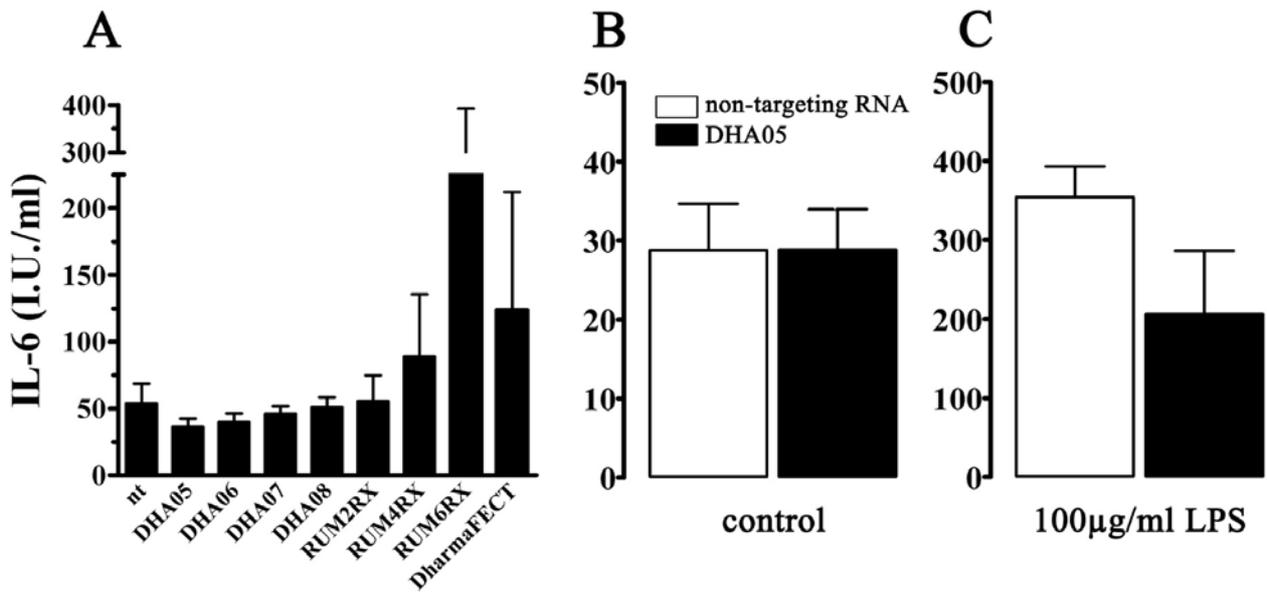


Abb. 78:

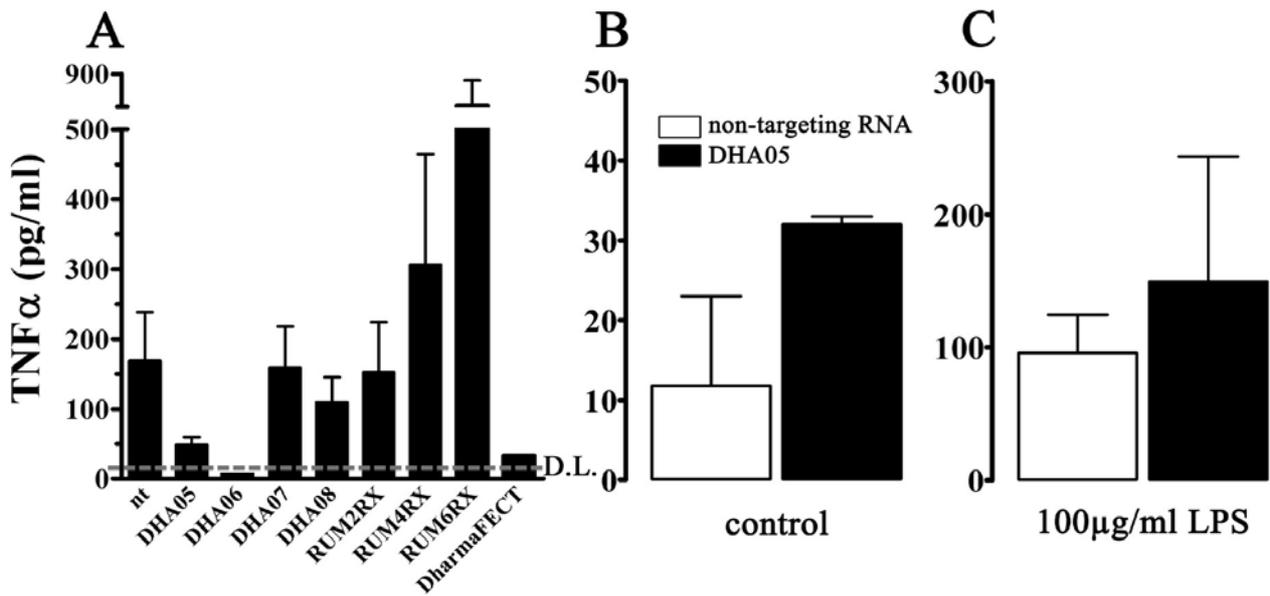


Abb. 79

Abb. 78 & 79: Gehalt an bioaktivem IL-6 bzw. TNF α im Zellkulturmedium nach 24 stündiger Inkubation mit verschiedenen siRNA allein oder anschließender Behandlung mit Kulturmedium oder LPS

A: Bioaktives IL-6/TNF α nach Inkubation mit Transfektionsreagenz (DharmaFECT) allein sowie einer nicht-zielgerichteten RNA (non-targeting RNA) und 7 verschiedenen anti-NF-IL6-siRNA (24 h). Konzentration siRNA: 50 nmol/l. B: Bioaktives IL-6/TNF α in Überständen nach 6 stündiger Inkubation mit frischem Kulturmedium im Anschluss an die Vorbehandlung (non-targeting RNA oder anti-NF-IL6-siRNA DHA05). C: Bioaktives IL-6/TNF α in Überständen nach 6 stündiger Inkubation mit 100 μ g/ml LPS im Anschluss an die Vorbehandlung (non-targeting RNA oder anti-NF-IL6-siRNA DHA05). Einzelne Werte in A und B stammen aus primären neuroglialen Kulturen anderer Hirnareale (*Nucleus arcuatus*, *Nucleus praeopticus medianus*, *Organum vasculosum laminae terminalis*). D.L.: Detektionslimit (6 pg/ml); Probenanzahl: Siehe Tab. 32 & 33).

	n	IL-6 (I.U./ml)	TNF α (pg/ml)
DharmaFECT	2	123,5 \pm 88,5	33 (1x < 6)
DHA05	10	36,5 \pm 5,88	48,8 \pm 11,01 (5x < 6)
DHA06	4	39,75 \pm 6,52	< 6
DHA07	7	46,14 \pm 5,45	159,6 \pm 58,28 (2x < 6)
DHA08	13	50,92 \pm 7,29	110 \pm 35,14 (9x < 6)
RUM2RX	4	55,25 \pm 19,27	152,7 \pm 71,82 (1x < 6)
RUM4RX	6	98 \pm 46,42	306,6 \pm 157,8 (1x < 6)
RUM6RX	4	233,3 \pm 158,4	609,5 \pm 230,4
non-targeting RNA	13	53,92 \pm 14,61	169 \pm 69,34 (7x < 6)

Tab. 32: Mittlere Konzentrationen bioaktiver Zytokine im Kulturmedium 24 h nach Inkubation mit verschiedenen siRNA-Lösungen

Konzentration der eingesetzten siRNA: 50 nmol/l, Detektionslimit des TNF α -Assays: 6 pg/ml.

	n	IL-6 (I.U./ml)	TNF α (pg/ml)
non-targeting RNA & Medium	10	28,80 \pm 5,87	11,75 \pm 11,25 (8 x < 6)
DHA05 & Medium	6	28,83 \pm 5,17	32 \pm 1 (4x < 6)
non-targeting RNA & 100 μ g/ml LPS	4	354,3 \pm 38,83	96 \pm 28,38
DHA05 & 100 μ g/ml LPS	3	206,3 \pm 79,96	149,3 \pm 94,48

Tab. 33: Mittlere Konzentrationen bioaktiver Zytokine im Kulturmedium nach 24 stündiger Inkubation mit siRNA und 6 h Inkubation mit Kontrollmedium oder LPS

Konzentration der eingesetzten siRNA (non-targeting RNA oder anti-NF-IL6-siRNA DHA05): 50 nmol/l, Konzentration LPS: 100 μ g/ml, Detektionslimit des TNF α -Assays: 6 pg/ml.

2. Beeinflussung der Entzündungsreaktionen durch zentrale Injektion von anti-NF-IL6-siRNA

Um Auswirkungen einer intracerebroventrikulär applizierten, anti-NF-IL6-siRNA auf LPS-induzierte Krankheitssymptome beurteilen zu können, diente zum Einen eine Untersuchung zum frühen Zeitpunkt von 4 Stunden nach der LPS-Injektion, da in der ersten Teilstudie zu dieser Zeit eine maximale NF-IL6-mRNA Induktion aufgetreten war (Abb. 53 S. 148). So konnte damit gerechnet werden, dass der erwartete Einfluss der siRNA-Behandlung auf die Expression von NF-IL6-mRNA sich zu diesem Zeitpunkt deutlich zeigen würde. Zusätzlich wurde wiederum ein 24 Stunden Intervall ausgewählt, um die Effekte der Behandlung auf physiologische Parameter darzustellen.

2.1. Distribution von siRNA im Gehirn nach der i.c.v. Injektion

Um die ordnungsgemäße Verteilung der intracerebroventrikulär injizierten siRNA-Lösung zu überprüfen, wurde zunächst die Einstichstelle im rechten Lateralventrikel mikroskopisch und immunhistochemisch überprüft. Dazu wurden 20 µm starke, coronale Gehirnschnitte der betreffenden Tiere aus der Region der Einstichstelle (*Bregma* + 1,5 mm lateral, - 0,8 mm kaudal) ausgewählt und der entscheidende Bereich, in dem die Injektionskanüle in den Ventrikel eingetreten sein sollte, bei bis zu 20 facher Vergrößerung betrachtet.

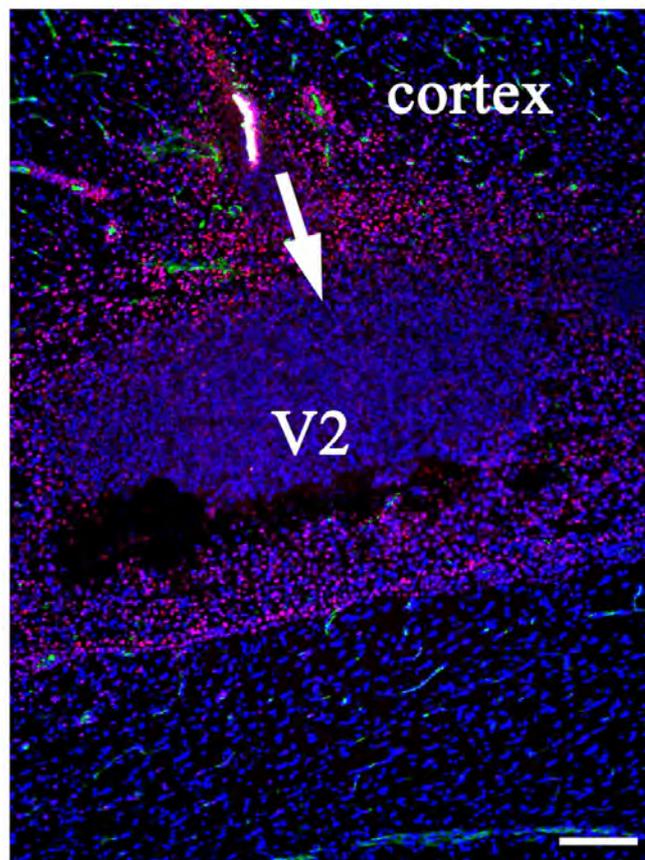


Abb. 80 :Injektionsstelle in den rechten Lateralventrikel (V2)

Dargestellt ist ein immunhistochemisch angefarbter Schnitt aus der Ebene *Bregma* + 1,5 mm lateral, - 0,8 mm kaudal. Farbkanäle: rot: NF-IL6-Signale, grün: Endothelzellen (von Willebrand Faktor), blau: Kernfärbung (DAPI). Der weiße Pfeil befindet sich innerhalb des Stichkanals, der z.T. mit Zelltrümmern gefüllt ist, und weist auf weitere Zelltrümmern im Ventrikellumen. In der Peripherie des Stichkanals, sowie innerhalb des Ventrikels konnte vermehrte NF-IL6-Immunreaktivität festgestellt werden. Größenmarker entspricht 100 µm.

Dabei konnten zum Einen häufig Aggregate im Ventrikel festgestellt werden, bei denen es sich vermutlich um Blutkoagel oder Trümmer von Zellen handelte, die im Zuge der Injektion in den Ventrikel eingedrungen waren (Abb. 80, Pfeil). Der Stichkanal selbst konnte aufgrund dieser Trümmer oftmals nur schwer als Hohlraum dargestellt werden, jedoch bewiesen die veränderte Form des betroffenen Ventrikels im Gegensatz zur kontralateralen Seite, die durch das Einbringen des Injektionsvolumens entstanden war, sowie das Vorhandensein von Aggregaten in Stichkanal und Ventrikelraum eindeutig die korrekt erfolgte Injektion.

Die Transfektionsmethode wurde im Hinblick auf das Verteilungsverhalten der RNA-Lösungen im gesamten Gehirn innerhalb von 24 Stunden mit Hilfe einer mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) markierten RNA überprüft. Des Weiteren wurde auf diese Weise die Effizienz der Einschleusung in Gehirnzellen beurteilt. Für die Untersuchungen wurden 20 µm starke Gehirnschnitte eines Tiers verwendet, dem 24 Stunden vor der Tötung 2 µl FITC-siRNA-Lösung (entspricht 5 µg) in den rechten Lateralventrikel appliziert worden waren. Eine Kernfärbung mit DAPI ermöglichte die Zuordnung eventueller Fluoreszenzsignale zu Zellkernen, um die intrazelluläre Lokalisation bestätigen zu können (Abb. 81 - 83).

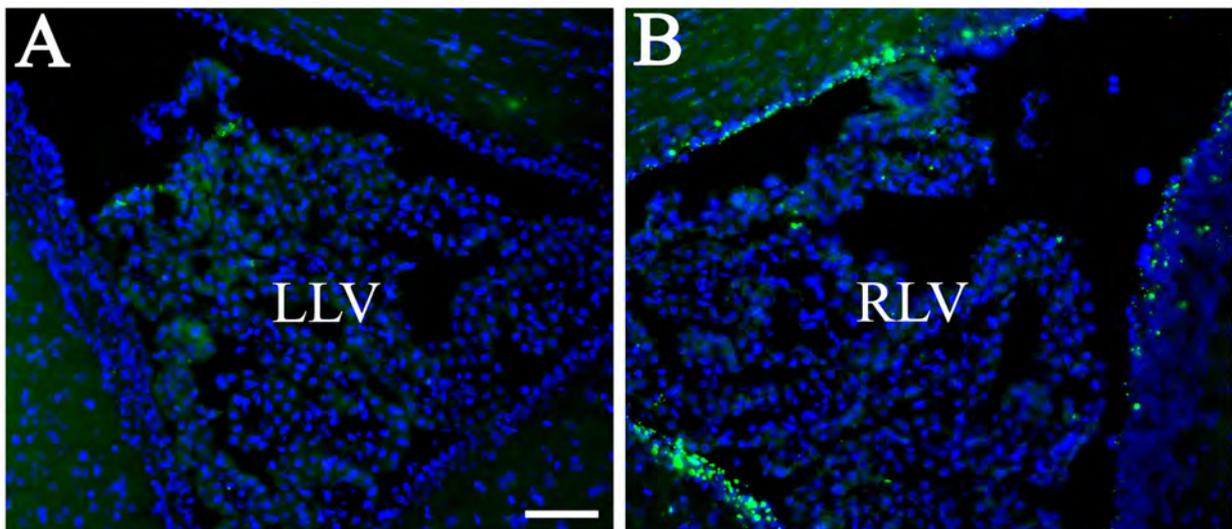


Abb. 81: Akkumulation fluoreszierender siRNA im rechten Lateralventrikel (RLV) 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion von FITC-siRNA

A: Aufnahme des linken Lateralventrikels (LLV). B: Gegenüberliegender rechter Lateralventrikel (RLV) des gleichen Tiers. Grüne Signale zeigen die Fluoreszenz der mit FITC markierten RNA an, Zellkerne sind blau angefärbt (DAPI). Die Signale wiesen hier keine intrazelluläre Lokalisation auf. Größenmarker entspricht 50 µm.

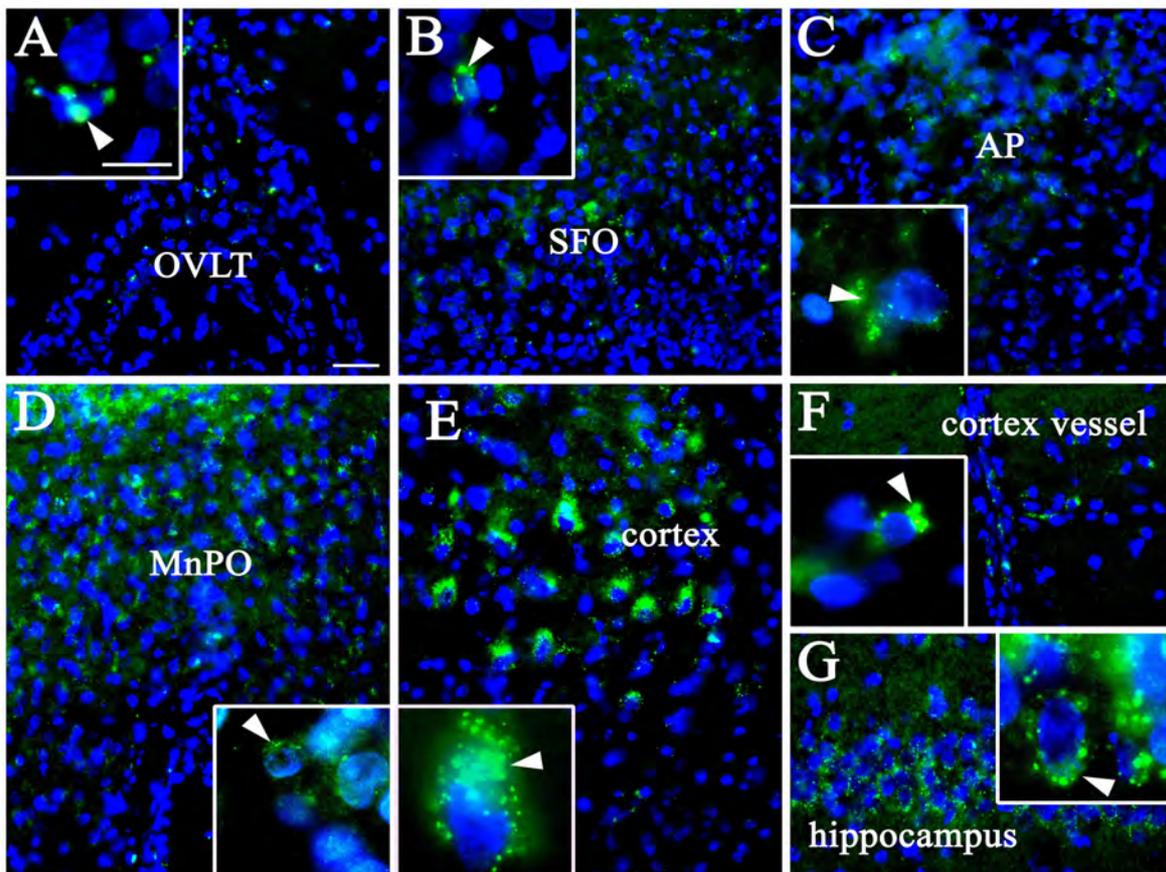


Abb. 82: Perinukleäre Immunfluoreszenz (I.F.) in verschiedenen Hirnarealen 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion von FITC-siRNA

Die Signale (grün), die die Akkumulation der markierten siRNA anzeigten, fanden sich in Zellen des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT, A), des *Organum subfornicale* (SFO, B), der *Area postrema* (AP, C), des *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO D), des cerebralen Cortex (E), sowie darin gelegener gefäßartiger Strukturen (F) und des Hippocampus (G). Die Morphologie der fluoreszierenden Zellen vor allem im cerebralen Cortex und im Hippocampus wies auf Neuronen hin. Zellkerne sind blau eingefärbt (DAPI). Weiße Pfeilspitzen verweisen auf perinukleäre I.F. Größenmarker (A) entspricht für alle Übersichtsaufnahmen 25-, für vergrößerte Ausschnitte 10 μm .

Zunächst wurde eine Akkumulation fluoreszierender Partikel im rechten Ventrikel festgestellt. Diese konnten keinen zellulären Strukturen zugeordnet werden und sammelten sich vor allem an den Wänden des Ventrikels (Abb. 81, B). Die Betrachtung der sensorischen circumventrikulären Organe (sCVO) zeigte zelluläre Fluoreszenz-Signale im OVLT, im SFO sowie in der AP (Abb. 82 A - C). Des Weiteren fanden sich im MnPO, im cerebralen Cortex und darin lokalisierten, großen Blutgefäßen sowie im Hippocampus fluoreszierende, perinukleäre Signale (Abb. 82 D - G). Das Muster der Fluoreszenz im Hippocampus entsprach dabei den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Niizuma, deren Vorgehen bei der Anwendung der RNAi *in vivo* als Grundlage der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuche herangezogen worden war (Niizuma et al., 2008). Da die angefärbten Zellen im Hippocampus morphologisch als Neuronen klassifiziert werden konnten, wurde anhand einer Doppelmarkierung mit Hilfe des Markerproteins „cluster of differentiation“ (CD) 68 außerdem exemplarisch eine Population von aktivierten Mikrogliazellen dargestellt, die ebenfalls die fluoreszenzmarkierte RNA aufgenommen hatten (Abb. 83). Diese Zellen zeigten eine deutliche Kolokalisation beider Signale und konnten in mehreren der vorgenannten Hirnareale detektiert werden.

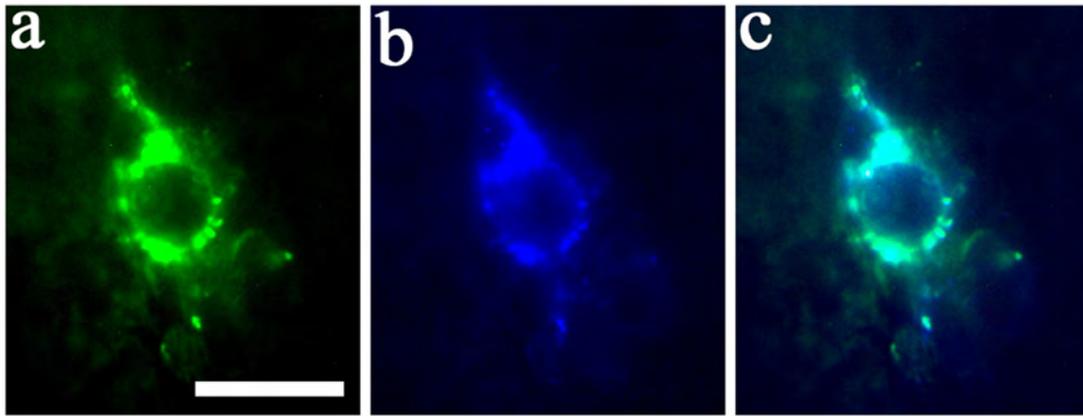


Abb. 83: Fluoreszierende Mikrogliazelle im cerebralen Cortex 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion von FITC-siRNA

a: Ansammlung grün fluoreszierender, FITC-markierter siRNA im Zytoplasma, b: Markierung der gleichen Zelle mit Hilfe des Markerproteins „cluster of differentiation“ (CD) 68 (blau), c: Übereinanderlagerung der Farbkanäle bestätigte das Vorhandensein beider Signale in ein und derselben Zelle. Größenmarker entspricht 10 μm .

2.2. Physiologische Parameter

2.2.1. Körperkerntemperatur

Die intraperitonealen Injektionen (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM LPS oder PBS) fanden zum Zeitpunkt $t = 0$ Stunden statt, während die intracerebroventrikulären Vorbehandlungen (vehicle = vc; non-targeting RNA = nt bzw. anti-NF-IL6 siRNA = si) zum exakt selben Zeitpunkt 24 Stunden im Voraus stattgefunden hatten.

Um direkte Reaktionen auf die intracerebroventrikulären Injektionen zu erfassen, wurde die Temperatur über den Zeitraum von $t = -2$ Stunden bis $t = 24$ Stunden am Vortag der intraperitonealen Injektionen aufgezeichnet. Im Vergleich zu Kontrolltieren, denen pyrogenfreies PBS in den Ventrikel injiziert worden war, zeigte sich in allen Behandlungsgruppen in einigen Tieren eine Temperaturerhöhung als Antwort auf die Injektionen (Tab. 34, Abb. 84). Die Reaktionen fielen individuell sehr unterschiedlich aus. In der Gruppe, die mit dem Lösungsmittel (vc) behandelt worden war, zeigte sich in 29 % der Fälle eine deutliche Temperaturerhöhung. Die Tiere, an denen RNA-Injektionen vorgenommen worden waren (nt, si) zeigten häufiger eine Fieberreaktion (50 % für nt, 63 % für si). Durchschnittlich stieg dabei die Temperatur nach Injektion der anti-NF-IL6-siRNA um ca. $0,3^\circ\text{C}$, jedoch nicht signifikant stärker als nach Injektion der Kontroll-RNA (nt, Tab. 34).

	vc	nt	si
n	7	17	16
Tiere mit Fieberreaktion	2	8	10
Maximaltemperatur (n.s.)	$38,55 \pm 0,12^\circ\text{C}$	$38,56 \pm 0,11^\circ\text{C}$	$38,83 \pm 0,14^\circ\text{C}$

Tab. 34: Zusammenfassende Darstellung des Temperaturverlaufs über 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion

vc: Lösungsmittel (vehicle), nt: nicht-zielgerichtete RNA (non-targeting RNA, 5 μg), si: gegen NF-IL6 gerichtete siRNA (anti-NF-IL6 siRNA, 5 μg); n.s.: nicht signifikant.

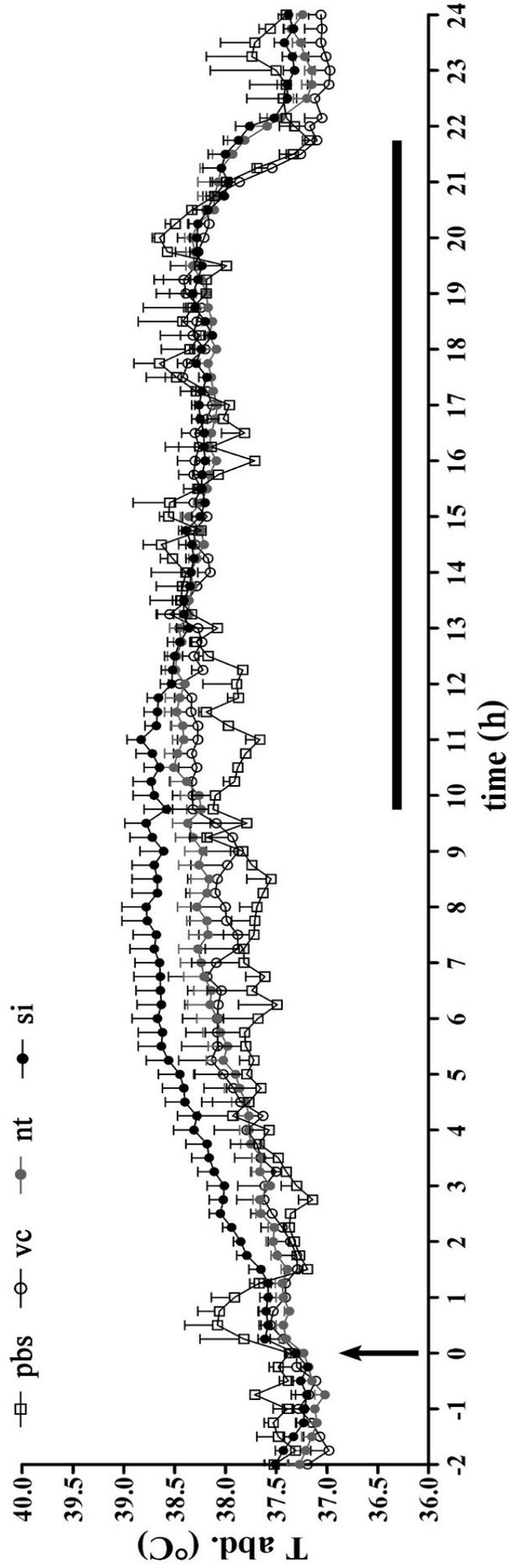


Abb. 84

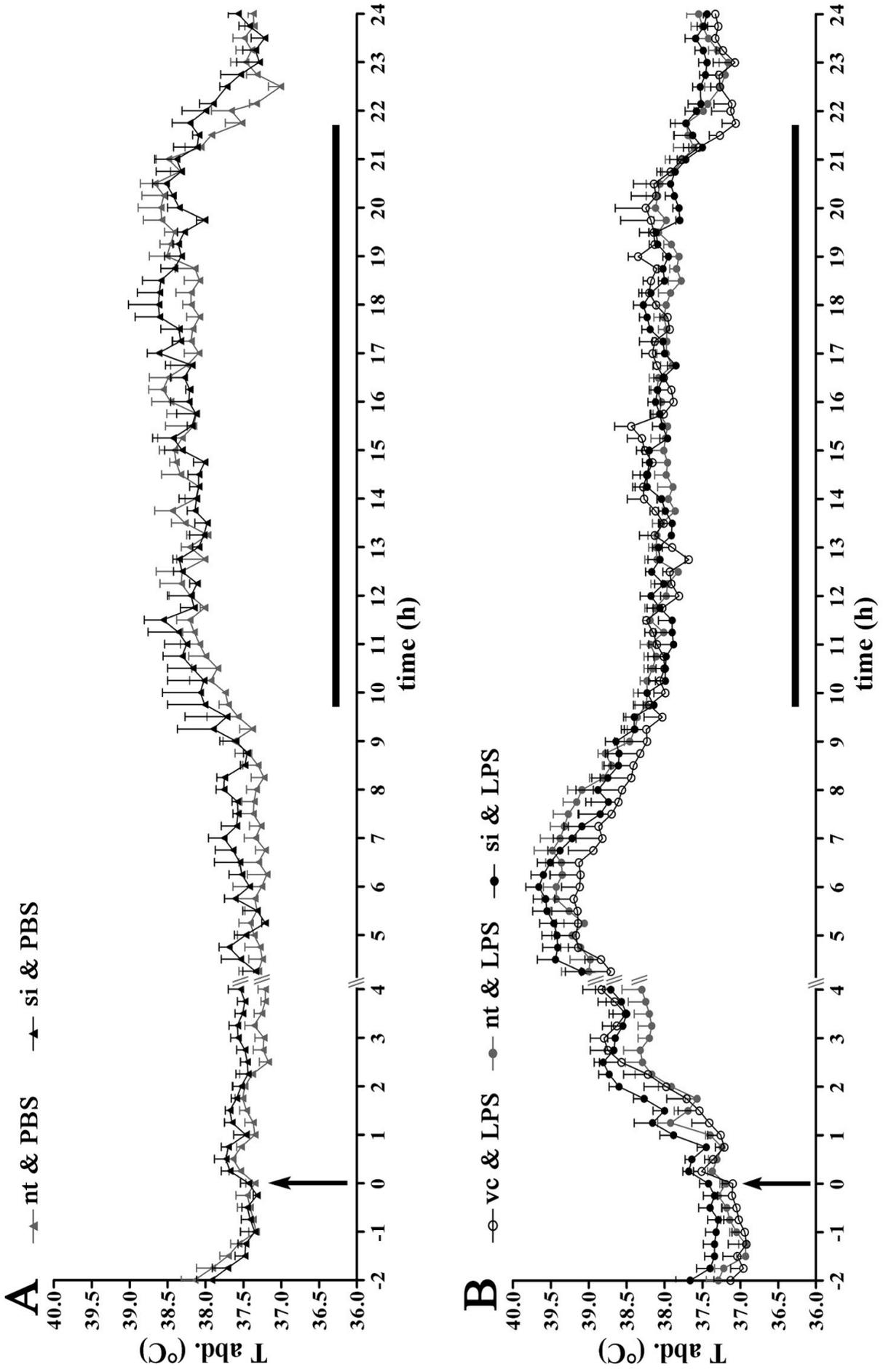


Abb. 85

Abb. 84: Verlauf der intraabdominal gemessenen Körperkerntemperatur innerhalb 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion

Gegenüberstellung der Temperaturverläufe verschiedener Behandlungsgruppen am Tag vor den intraperitonealen Behandlungen. Der Zeitpunkt der intracerebroventrikulären Injektion ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Dunkelphase ist mit einer schwarzen Linie markiert. pbs: Kontrolle (Phosphate-Buffered Saline), vc: Lösungsmittel (vehicle), nt: non-targeting RNA (5 µg), si: anti-NF-IL6-siRNA (5 µg). Tiere der mit anti-NF-IL6-siRNA behandelten Gruppe zeigten am häufigsten eine Fieberreaktion. Tierzahlen für pbs: n = 2, andere Gruppen: Siehe Tab. 34.

Abb. 85: Verlauf der intraabdominal gemessenen Körperkerntemperatur innerhalb 24 h nach intraperitonealer Injektion

A: Gegenüberstellung der Temperaturverläufe der Kontrollgruppen nach intraperitonealer Behandlung mit PBS. B: Gegenüberstellung der Temperaturverläufe der Versuchsgruppen nach intraperitonealer Behandlung mit 100 µg/kg KM LPS. Der Zeitpunkt der Injektion ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. Intracerebroventrikuläre Injektionen fanden zum gleichen Zeitpunkt am Vortag statt. Die Dunkelphase ist mit einer schwarzen Linie markiert. vc: Lösungsmittel (vehicle), nt: non-targeting RNA (5 µg), si: anti-NF-IL6-siRNA (5 µg). Bis zum Zeitpunkt t = 4 h wurden die Tiere der Endpunkte 4- und 24 h verwendet. Tierzahlen: Siehe Tab. 35.

	vc & LPS	nt & LPS	si & LPS
n	- 2 h bis 4 h: n = 6 bis 24 h: n = 3	- 2 h bis 4 h: n = 11 bis 24 h: n = 6	- 2 h bis 4 h: n = 10 bis 24 h: n = 5
Hypothermie	keine	keine	keine
Beginn Fieber	t = 140 min bzw. 2,3 h	t = 125 min bzw. 2,08 h	t = 60 min bzw. 1 h
Maximaltemperatur (n.s.)	39,21 ± 0,11°C bei t = 280 und 295 min bzw. 4,7 und 4,9 h	39,48 ± 0,24°C bei t = 405 min bzw. 6,75 h	39,66 ± 0,17 °C bei t = 360 min bzw. 6 h
Minimaltemperatur (§)	36,65 ± 0,03 bei t = 1010 min bzw. 16,8 h	36,95 ± 0,15 °C bei t = -80 min bzw. - 1,3 h	37,23 ± 0,28 °C bei t = -40/-45 min bzw. -0,7/-0,75
Ende Fieber	t = 600 min bzw. 10 h	t = 620 min bzw. 10,3 h	t = 610 min bzw. 10,2 h
Dauer Fieber	460 min bzw. 7,7 h	495 min bzw. 8,25 h	550 min bzw. 9,2 h

Tab. 35: Zusammenfassende Darstellung des Temperaturverlaufs über 24 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS und 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS.
§ Vergleich der Gruppen nt & LPS und si & LPS mit der Gruppe vc & LPS:
§ P < 0,05; n.s.: nicht signifikant. (Dauer des Fiebers wurde nicht statistisch verglichen.)

Die Kontrollen, bei denen Tiere 24 Stunden nach i.c.v. Injektion der RNA-Lösung eine intraperitoneale PBS-Injektion erhielten, zeigten jeweils keine Abweichungen der Körperkerntemperatur vom physiologischen Tagesverlauf (Abb. 85, A). Daher, und in Verbindung mit einem entsprechenden Vortest, wurde für die Temperaturaufzeichnung auf eine entsprechende Kontrolle mit dem Lösungsmittel (vehicle & PBS) verzichtet. Gegenüber diesen beiden Kontrollgruppen zeigten alle

LPS-stimulierten Gruppen unabhängig von der intracerebroventrikulären Vorbehandlung eine deutliche Fieberantwort ohne vorhergehende Hypothermie, die sich in zwei Hauptphasen unterteilen ließ (Abb. 85, B). Nach Vorbehandlung mit anti-NF-IL6-siRNA setzte das Fieber 65 (nt) bis 80 (vc) Minuten früher ein als in den anderen Gruppen (Tab. 35). Die Maximalwerte, die nach anti-NF-IL6-siRNA Injektion geringfügig höher waren, wurden in beiden Tiergruppen, die RNA-Lösungen erhalten hatten, nach etwa 6 - 7 Stunden erreicht. Nur mit dem Lösungsmittel vorbehandelte Tiere zeigten bereits nach 4 - 5 Stunden Maximaltemperatur. In allen Gruppen ging das Fieber nach ca. 10 Stunden zurück und es kam im weiteren Verlauf des Messzeitraums zu keinen auffälligen Abweichungen mehr. Die Unterschiede zwischen den Temperaturverläufen der 3 einzelnen Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Der Beginn der Fieberantwort sowie die Dauer wurden allerdings nicht statistisch verglichen.

2.2.2. Fieberindex

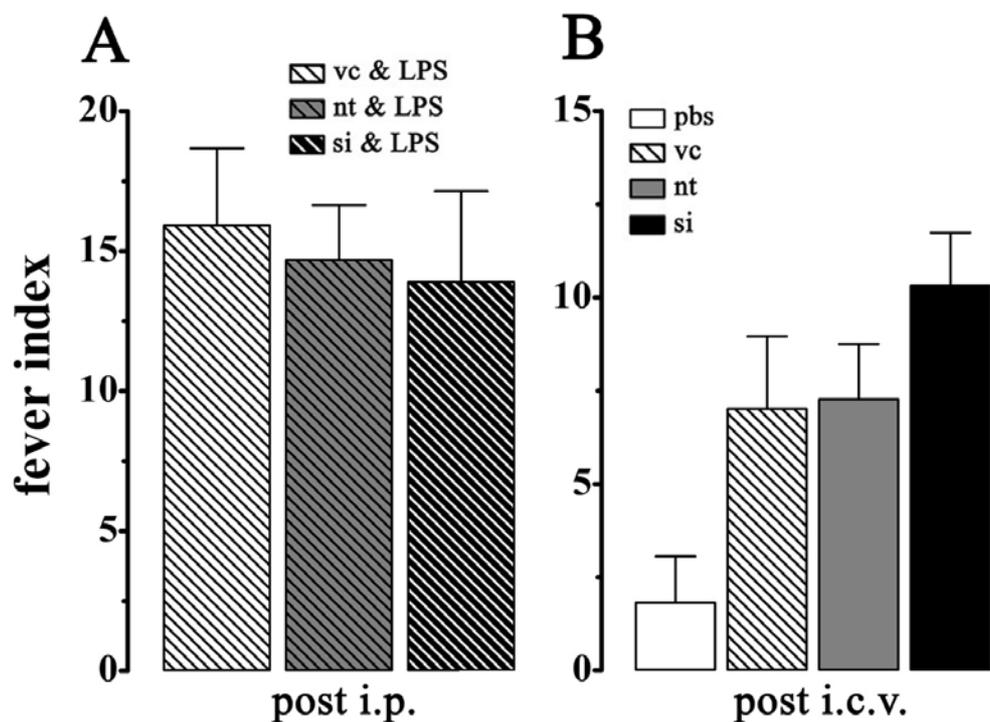


Abb. 86: Fieberindex vom Zeitpunkt 0 bis 10 h nach intracerebroventrikulärer oder intraperitonealer Injektion

A: Fieberindex über 10 h nach intraperitonealer Behandlung (t = 0 h), B: Fieberindex über 10 h nach intracerebroventrikulärer Behandlung (t = -24 h).

Versuchsgruppen: A: vehicle (vc, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.); B: PBS, vc, nt oder si (i.c.v.). Tierzahlen: Siehe Tab. 34 & 35.

Zusätzlich wurde der Fieberindex (Fläche unterhalb der Fieberkurve auf Basis der mittleren Temperatur im Bereich t = -2 Stunden bis t = 0) über eine Dauer von 10 Stunden betrachtet. Am Tag der intraperitonealen Injektion konnte zwischen den mit 100 µg/kg KM LPS stimulierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Zusammenhang mit den verschiedenen Vorbehandlungen festgestellt werden (Abb. 86 A). Im Zeitraum von 10 Stunden nach intracerebroventrikulären Applikationen am Vortag der intraperitonealen Stimulation, stellte sich der Fieberindex nach Behandlung mit dem Lösungsmittel (vc) oder den RNA-Lösungen (nt oder si) tendenziell höher dar, als nach Injektion von PBS (Abb. 86 B). Jedoch wurde jeweils keine Signifikanz erreicht.

2.2.3. Lokomotorische Aktivität

Die lokomotorische Aktivität wurde über den gesamten Versuchszeitraum (4- oder 24 Stunden) aufgezeichnet. Nach 4 Stunden zeigte sich während der Hellphase im Anschluss an die Injektion von 100 µg/kg KM LPS zunächst allgemein eine tendenziell höhere Aktivität der Tiere. Dieser Effekt war nach allen Vorbehandlungen (vehicle, non-targeting RNA oder anti-NF-IL6 siRNA), die 24 Stunden im Voraus erfolgt waren, zu beobachten (Abb. 87, A). Jedoch trat nur in der mit anti-NF-IL6 siRNA vorbehandelten Gruppe eine signifikante Aktivitätssteigerung gegenüber der stattdessen mit PBS behandelten Gruppen auf. Im Versuchszeitraum von 24 Stunden konnte zwar der erwartete Trend aller LPS-stimulierten Gruppen zu verminderter Aktivität festgestellt werden, allerdings nahmen diese Unterschiede zu den PBS-behandelten Kontrollgruppen keine signifikanten Ausmaße an (Abb. 87, B).

	nt & PBS	si & PBS	vc & LPS	nt & LPS	si & LPS
4 h Aktivität					
n	6	6	6	11	10
"counts" (Hellphase)	338,7 ± 37	355,2 ± 51,8	479,3 ± 36	546 ± 51,5	614,3 ± 61 §
24 h Aktivität					
n	3	3	3	6	5
"counts"	3511 ± 613,9	3498 ± 586	2597 ± 653,1	2266 ± 117,9	2354 ± 335,3

Tab. 36: Gemittelte Zahlenwerte der kumulativen lokomotorischen Aktivität nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vehicle (vc, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.);
§ Vergleich der Gruppe si & LPS mit der Gruppe si & PBS: § P<0,05

Um die möglichen Effekte der intracerebroventrikulär verabreichten RNA darstellen zu können, wurde außerdem die Aktivität der Tiere innerhalb der 24 Stunden nach der Applikation aufgezeichnet. Dabei zeigte sich, dass das Lösungsmittel nach intracerebroventrikulärer Verabreichung keine Veränderungen der lokomotorischen Gesamtaktivität gegenüber sterilem PBS hervorrief (Tab. 37). Die Injektion der RNA-Lösungen bewirkte eine leichte Verringerung der Aktivität (12 % für non-targeting RNA bzw. 27 % für anti-NF-IL6 siRNA) gegenüber der Applikation des reinen Lösungsmittels (vehicle). Diese Beobachtungen standen mit der in dieser Gruppe ebenfalls am deutlichsten darstellbaren Temperatursteigerung nach der intracerebroventrikulären Injektionen im Einklang. Sie stellten jedoch lediglich einen Trend, nicht aber signifikante Unterschiede dar (siehe auch Abb. 87 C).

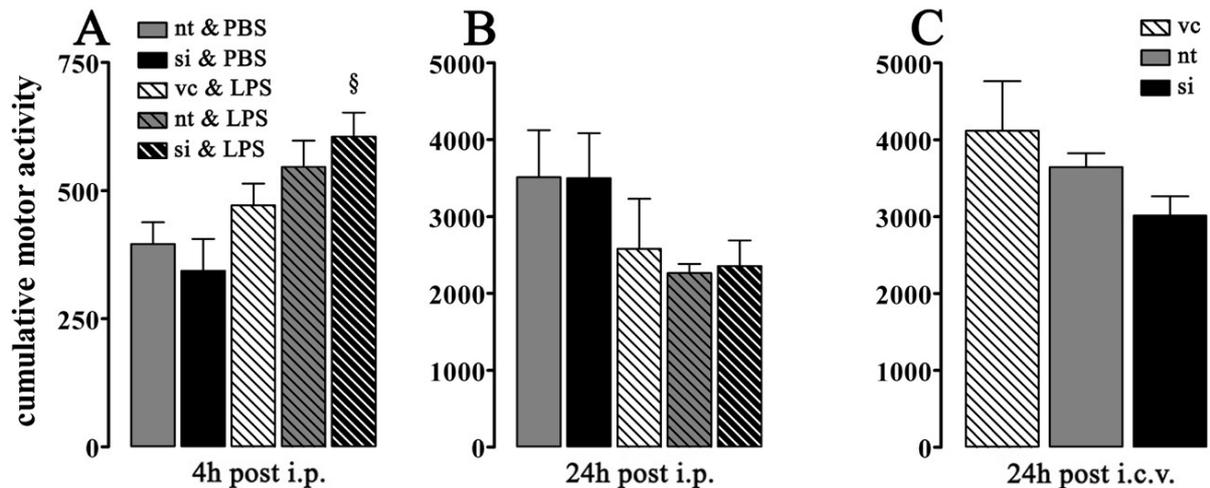


Abb. 87: Kumulative lokomotorische Aktivität innerhalb 4- oder 24 h nach intracerebroventrikulärer oder intraperitonealer Injektion

A/B: Gesamtaktivität innerhalb 4- oder 24 h nach intraperitonealen Injektionen. C: Gesamtaktivität 24 Stunden nach intracerebroventrikulären Injektionen.

Versuchsgruppen: A/B: 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vehicle (vc, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). C: PBS, vc, nt oder si (i.c.v.). § Vergleich der Gruppe si & LPS mit der Gruppe si & PBS: § $P < 0,05$. Tierzahlen: Siehe Tab. 36 & 37.

	pbs	vc	nt	si
n	2	7	17	16
24 h Aktivität ("counts")	4091 ± 174,5	4118 ± 643,5	3644 ± 180,5	3014 ± 249,7

Tab. 37: Gemittelte Zahlenwerte der kumulativen lokomotorischen Aktivität innerhalb 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion

Injektion erfolgte 24 h vor intraperitonealer Injektion; pbs: Phosphate-Buffered Saline, vc: Lösungsmittel (vehicle), nt: 5 µg nicht-zielgerichtete RNA (non-targeting RNA), si: 5 µg gegen NF-IL6 gerichtete siRNA (anti-NF-IL6 siRNA)

2.2.4. Futter- und Wasseraufnahme

Über 24 Stunden im Anschluss an die intraperitoneale Injektion wurde die aufgenommene Menge an Futter und Wasser für die einzelnen Gruppen untersucht. Unabhängig von der intracerebroventrikulär applizierten RNA (5 µg non-targeting RNA oder anti-NF-IL6-siRNA) kam es nach Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS zu einer signifikanten Verringerung der Futtermenge im Vergleich zu den mit PBS behandelten Kontrollgruppen (Abb. 88 A). Tiere, die keine RNA, sondern das gleiche Volumen des Lösungsmittels (vehicle) erhalten hatten, zeigten im Vergleich zu den RNA-behandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede nach der LPS-Stimulation. In Bezug auf den Wasserkonsum konnte ebenfalls als Antwort auf die LPS-Stimulation eine Reduktion in allen Gruppen festgestellt werden (Abb. 88 C). Diese nahm allerdings nur für die mit nt vorbehandelte Gruppe signifikante Ausmaße an (siehe auch Tab. 38).

Zur Untersuchung der nur auf der Applikation der verschiedenen RNA-Lösungen beruhenden Effekte, wurden außerdem die Futter- und Wasseraufnahme innerhalb 24 Stunden nach der intracerebroventrikulären Injektion aufgezeichnet. Hier bewirkte die anti-NF-IL6-siRNA eine verstärkte

Anorexie: Infolge der Applikation nahmen die mit dieser RNA-Lösung behandelten Tiere rund 17 % weniger Futter auf als mit dem Lösungsmittel behandelte, die Verminderung der Futteraufnahme gegenüber der Gruppe, die non-targeting RNA erhalten hatte betrug im Mittel sogar 29 % (Abb. 88 B, Tab. 39). Dies entsprach einem signifikanten Effekt der anti-NF-IL6-siRNA gegenüber der non-targeting RNA-Kontrolle. Die Wasseraufnahme wurde tendenziell ebenfalls durch Injektion der anti-NF-IL6-siRNA stärker vermindert als in den anderen Gruppen, jedoch konnte hier keine Signifikanz festgestellt werden (Abb. 88 D, Tab. 39).

	nt & PBS	si & PBS	vc & LPS	nt & LPS	si & LPS
n	3	3	3	5	5
Futteraufnahme (g)	22,8 ± 0,89	21,07 ± 0,42	8,37 ± 3,27	10,72 ± 1,06 ###	6,82 ± 0,82 §§§
Wasseraufnahme (g)	46,1 ± 1,89	35,3 ± 4,07	22,39 ± 10,89	26,45 ± 2,42 #	18,6 ± 2,67

Tab. 38: Gemittelte Zahlenwerte der mittleren kumulativen Futter- und Wasseraufnahme innerhalb 24 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vehicle (vc, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.); # Vergleich der Gruppe nt & LPS mit der Gruppe nt & PBS: # P<0,05, ### P< 0,001; § Vergleich der Gruppe si & LPS mit der Gruppe si & PBS: §§§ P<0,001

	pbs	vc	nt	si
n	2	6	16	16
Futteraufnahme (g)	20,15 ± 1,55	16,37 ± 3,34	19,26 ± 0,75	13,61 ± 1,36 **
Wasseraufnahme (g)	31,5 ± 5,8	36,44 ± 5,25	38,28 ± 3,34	27,52 ± 3,49

Tab. 39: Gemittelte Zahlenwerte der mittleren kumulativen Futter- und Wasseraufnahme innerhalb 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion

Die Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = -24 h vor der intraperitonealen Stimulation; pbs: Phosphate-Buffered Saline, vc: Lösungsmittel (vehicle), nt: 5 µg nicht-zielgerichtete RNA (non-targeting RNA), si: 5 µg gegen NF-IL6 gerichtete siRNA (anti-NF-IL6 siRNA). Für die Gruppe nt wurden nur n = 15 Tiere in die Ermittlung der Wasseraufnahme einbezogen; * Vergleich der Gruppe si (i.c.v.) mit der Gruppe nt (i.c.v.): ** P<0,01

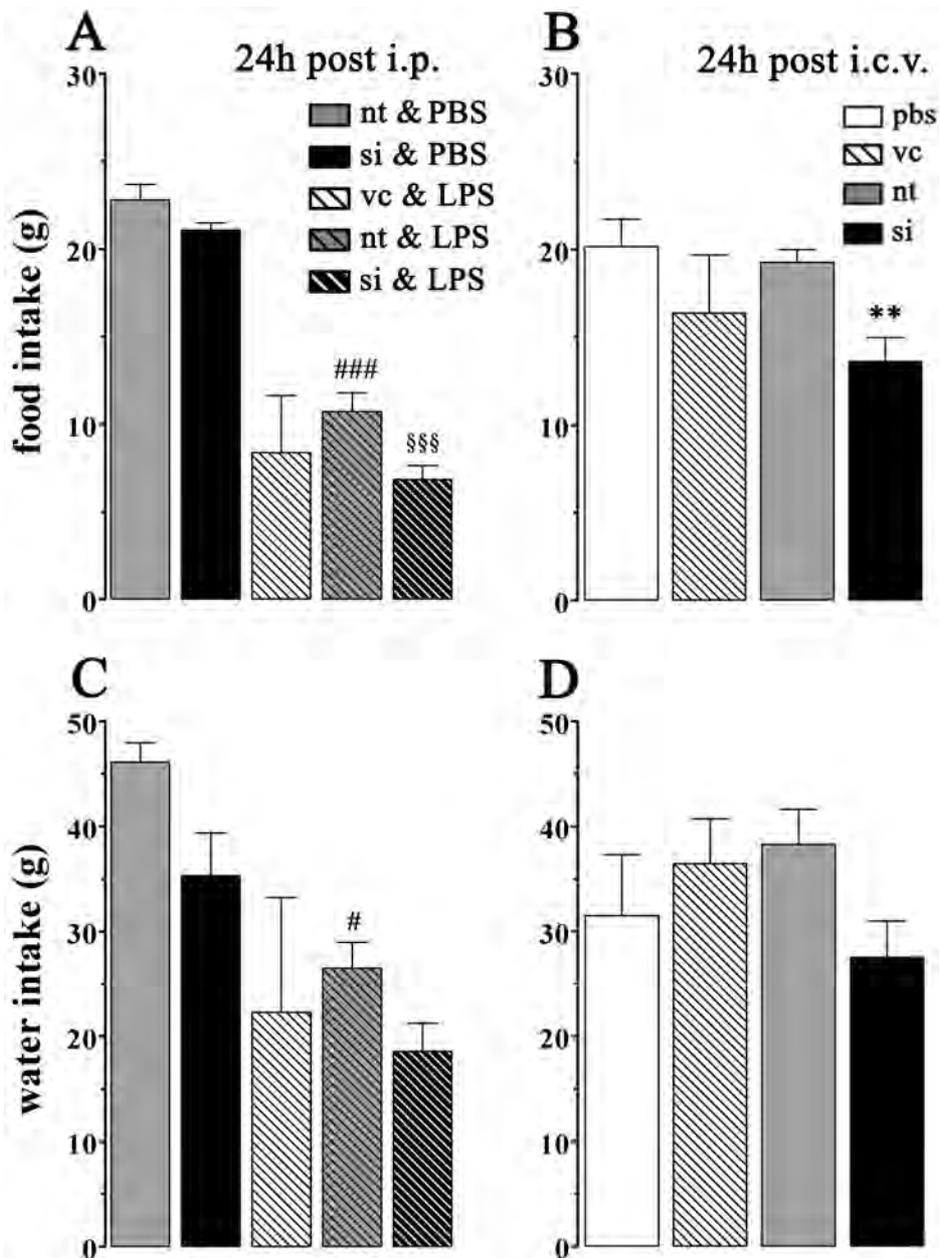


Abb. 88: Kumulative Futter- und Wasseraufnahme innerhalb 24 h nach intracerebroventrikulärer oder intraperitonealer Injektion

A/C: Futter-/Wasseraufnahme (g) innerhalb der 24 h nach intraperitonealer Stimulation (bei t = 0 h), B/D: Futter-/Wasseraufnahme (g) innerhalb der 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion (bei t = -24 h).

Versuchsgruppen: A/C: 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vehicle (vc, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). B/D: PBS, vc, nt oder si (i.c.v.). # Vergleich der Gruppe nt & LPS mit der Gruppe nt & PBS: # P<0,05, ### P< 0,001; § Vergleich der Gruppe si & LPS mit der Gruppe si & PBS: §§§ P<0,001; * Vergleich der Gruppe si (i.c.v.) mit der Gruppe nt (i.c.v.): ** P<0,01. Tierzahlen: Siehe Tab. 38 & 39.

2.2.5. Körpermasse

Die Entwicklung der Körpermasse in Prozent des Ausgangsgewichts wurde für den Zeitraum von 24 Stunden ausgewertet, der den intraperitonealen Injektionen folgte. In den mit PBS behandelten Gruppen konnte jeweils eine leichte Zunahme verzeichnet werden, die 24 Stunden zuvor erfolgte intracerebroventrikuläre Behandlung mit 5 µg non-targeting RNA bzw. anti-NF-IL6-siRNA hatte darauf keinen signifikanten Einfluss. Diese Vorbehandlungen wirkten sich außerdem auch nicht wesentlich auf den Verlust an Körpermasse nach LPS-Stimulation aus (Abb. 89 A, Tab. 40). So verloren beide RNA-behandelten Gruppen signifikant an Körpermasse, wobei der Verlust nach der Injektion von anti-NF-IL6-siRNA gegenüber der PBS-behandelten Kontrollgruppe größer ausfiel. Diese Beobachtung steht mit dem stärker reduzierten Futter- und Wasserkonsum der Tiere der Gruppe si & LPS im Einklang (Abb. 88). Für beide RNA-behandelten Gruppen gab es nach LPS-Applikation keinen signifikanten Unterschied zu den Tieren, die zuvor nur das Lösungsmittel (vehicle) erhalten hatten.

	nt & PBS	si & PBS	vc & LPS	nt & LPS	si & LPS
n	3	3	3	5	5
Zu-/Abnahme (%)	2,06 ± 0,11	4,09 ± 1,56	-4,3 ± 2,4	-2,98 ± 0,54 #	-3,6 ± 1,29 §§

Tab. 40: Mittlere Zu- oder Abnahme der Körpermasse innerhalb von 24 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vehicle (vc, i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). # Vergleich der Gruppe nt & LPS mit der Gruppe nt & PBS: # P<0,05; § Vergleich der Gruppe si & LPS mit der Gruppe si & PBS: §§ P<0,01

Des Weiteren wurde die Körpermassenzu- oder -abnahme infolge der intracerebroventrikulären Injektion der verschiedenen Substanzen allein in den daran anschließenden 24 Stunden aufgezeichnet. Hier fiel der deutliche Effekt der anti-NF-IL6-siRNA auf, der zu einer massiven Reduktion der Körpermasse im Anschluss an die Applikation führte (Abb. 89 B, Tab. 41). Diese erwies sich als signifikant unterschiedlich zur leichten Zunahme in der Gruppe der Tiere, die mit non-targeting RNA behandelt worden waren. Auch diese Entwicklung zeigt einen möglichen Zusammenhang zum Futter- und Wasserkonsum, der nach Injektion von anti-NF-IL6-siRNA am stärksten zurückging (Abb. 88).

	pbs	vc	nt	si
n	2	8	15	16
Zu-/Abnahme (%)	0,2 ± 0,07	-0,17 ± 1,07	1,28 ± 0,47	-3,74 ± 1,59 *

Tab. 41: Zusammenfassende Darstellung der Entwicklung der Körpermasse innerhalb von 24 h nach intracerebroventrikulärer Injektion

Die Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = -24 h vor der intraperitonealen Stimulation; pbs: Phosphate-Buffered Saline, vc: Lösungsmittel (vehicle), nt: nicht-zielgerichtete RNA (non-targeting RNA), si: gegen NF-IL6 gerichtete siRNA (anti-NF-IL6 siRNA); * Vergleich der Gruppe si (i.c.v.) mit der Gruppe nt (i.c.v.): * P<0,05

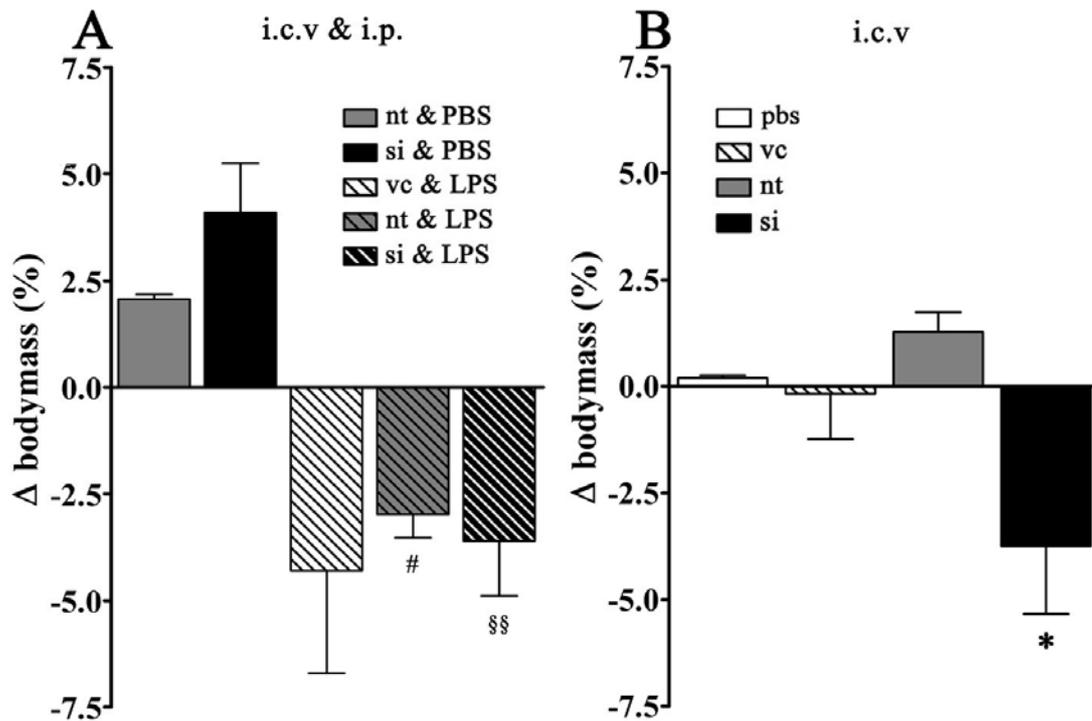


Abb. 89: Entwicklung der Körpermasse in Prozent innerhalb von 24 h nach intracerebroventrikulärer oder intraperitonealer Injektion

A: Entwicklung innerhalb 24 h nach intraperitonealer Behandlung (bei $t = 0$ h), B: Entwicklung innerhalb 24 h nach intracerebroventrikulärer Behandlung (bei $t = -24$ h). Die Tiere wurden direkt vor dem Versuch sowie zum Endpunkt der Messungen nach 24 h gewogen. Tierzahlen: Siehe Tab. 40 & 41.

Versuchsgruppen: A: 5 μ g non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 μ g anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vehicle (vc, i.c.v.) & 100 μ g/kg KM LPS (i.p.), 5 μ g nt (i.c.v.) & 100 μ g/kg KM LPS (i.p.) und 5 μ g si (i.c.v.) & 100 μ g/kg KM LPS (i.p.). B: PBS, vc, nt oder si (i.c.v.). # Vergleich der Gruppe nt & LPS mit der Gruppe nt & PBS: # $P < 0,05$; § Vergleich der Gruppe si & LPS mit der Gruppe si & PBS: §§ $P < 0,01$; * Vergleich der Gruppe si (i.c.v.) mit der Gruppe nt (i.c.v.): * $P < 0,05$

2.3. Konzentration bioaktiver pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma

Von den auf verschiedene Weise intracerebroventrikulär vorbehandelten Tieren wurden 4- oder 24 Stunden nach den intraperitonealen Applikationen Plasmaproben entnommen und mittels Bioassay auf das Vorhandensein von bioaktivem IL-6 bzw. TNF α untersucht.

2.3.1. IL-6

Die Gehalte an bioaktivem IL-6 in PBS-behandelten Kontrollgruppen lagen nach 4 Stunden oberhalb der in der Teilstudie zum Zeitverlauf ermittelten Werte, unabhängig von der intracerebroventrikulären Vorbehandlung (Abb. 90 A; siehe auch S. 132 Abb. 44 / Tab. 21). Eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration nach Stimulation mit LPS (100 μ g/kg KM) fand sich zu diesem Zeitpunkt lediglich im Plasma von Tieren, die mit dem Lösungsmittel (vehicle) intracerebroventrikulär vorbehandelt worden waren. Diese Erhöhung war außerdem gegenüber der Gruppe mit nicht-zielgerichteter RNA (non-targeting RNA) vorbehandelter Tiere signifikant. 24 Stunden nach der LPS-Stimulation erreichten die Plasmakonzentrationen von IL-6 in allen Gruppen wieder Basalwerte und unterschieden sich im Wesentlichen nicht (Abb. 90 B).

	vc & PBS	nt & PBS	si & PBS	vc & LPS	nt & LPS	si & LPS
n (4 h)	3	3	3	3	6	5
n (24 h)	0	3	3	3	5	5

Tab. 42: Tierzahlen für die Bestimmung bioaktiver Zytokine im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS, 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.).

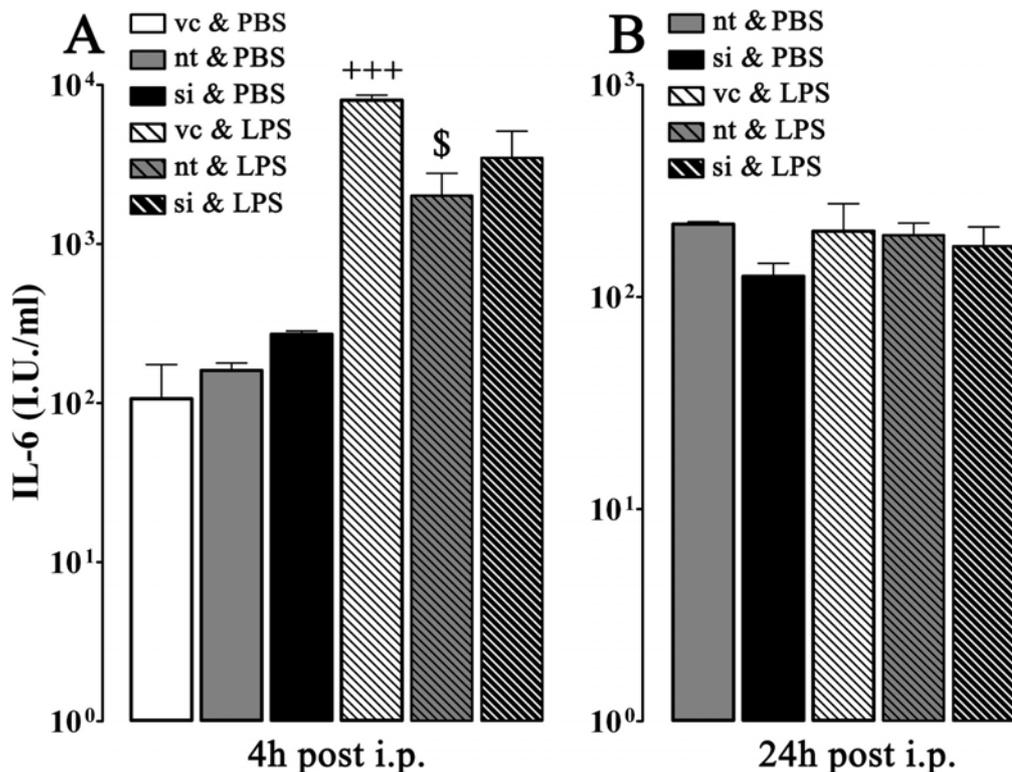


Abb. 90: Gehalte an bioaktivem IL-6 zum Zeitpunkt 4- und 24 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). + Vergleich der Gruppe vc & LPS mit der Gruppe vc & PBS: +++ P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe nt & LPS mit der Gruppe vc & LPS: \$ P<0,05. Die Werte wurden vor Berechnung der Statistik logarithmiert. Tierzahlen: Siehe Tab. 42.

2.3.2. TNF

Zum Zeitpunkt 24 Stunden konnte bei keinem der Tiere bioaktives TNFα nachgewiesen werden (Detektionslimit 6 pg/ml). 4 Stunden nach erfolgten intraperitonealen Injektionen, wiesen Tiere, die mit PBS behandelt worden waren, unabhängig von der Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel (vehicle) bzw. 5 µg der Kontroll-RNA (non-targeting RNA) oder der anti-NF-IL6 siRNA keine messbaren Mengen an bioaktivem TNFα im Blutplasma auf (Abb. 91). Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS bewirkte in allen vorbehandelten Gruppen deutlich erhöhte TNFα-Spiegel, die sich allerdings zwischen den einzelnen Gruppen nur minimal und nicht signifikant unterschieden.

	vc & PBS	nt & PBS	si & PBS	vc & LPS	nt & LPS	si & LPS
IL-6 (I.U./ml)						
4 h	106,7 ± 68,02	160,7 ± 18,32	271,3 ± 12,81	8020 ± 599,7 +++	2012 ± 767,9 \$	3483 ± 1637
24 h		220,7 ± 5,81	125,3 ± 18,99	204,7 ± 70,82	195,7 ± 27,58	173,6 ± 40,39
TNFα (pg/ml)						
4 h	<6	<6	<6	7508 ± 348,8	6778 ± 1749	8507 ± 1953
24 h		<6	<6	<6	<6	<6

Tab. 43: Mittlere Konzentrationen bioaktiver Zytokine im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). Detektionslimit des TNFα-Assays 6 pg/ml. + Vergleich der Gruppe vc & LPS mit der Gruppe vc & PBS: +++ P<0,001; \$ Vergleich der Gruppe nt & LPS mit der Gruppe vc & LPS: \$ P<0,05. Die Werte wurden vor Berechnung der Statistik logarithmiert.

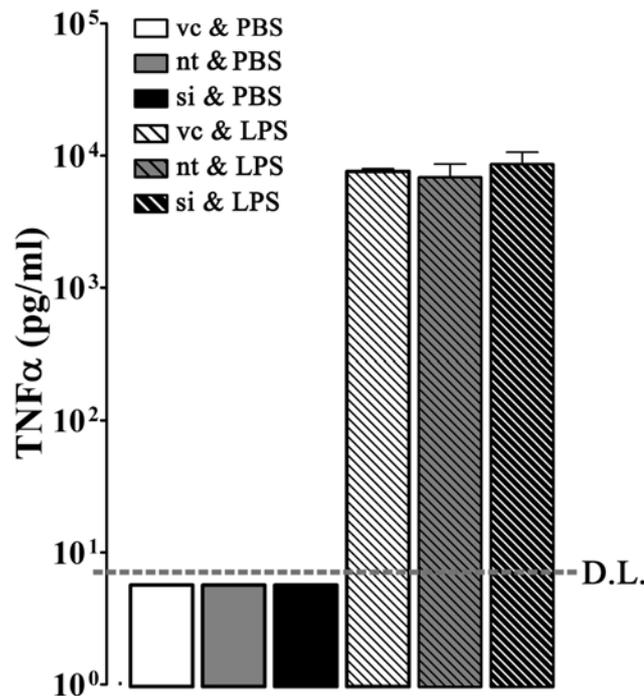


Abb. 91: Gehalte an bioaktivem TNFα zum Zeitpunkt 4 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). D.L.: Detektionslimit (6 pg/ml). Die Werte wurden vor Berechnung der Statistik logarithmiert. Tierzahlen: Siehe Tab. 42.

3. Einfluss der siRNA auf die Expression von NF-IL6 im Hypothalamus

3.1. Expression von mRNA

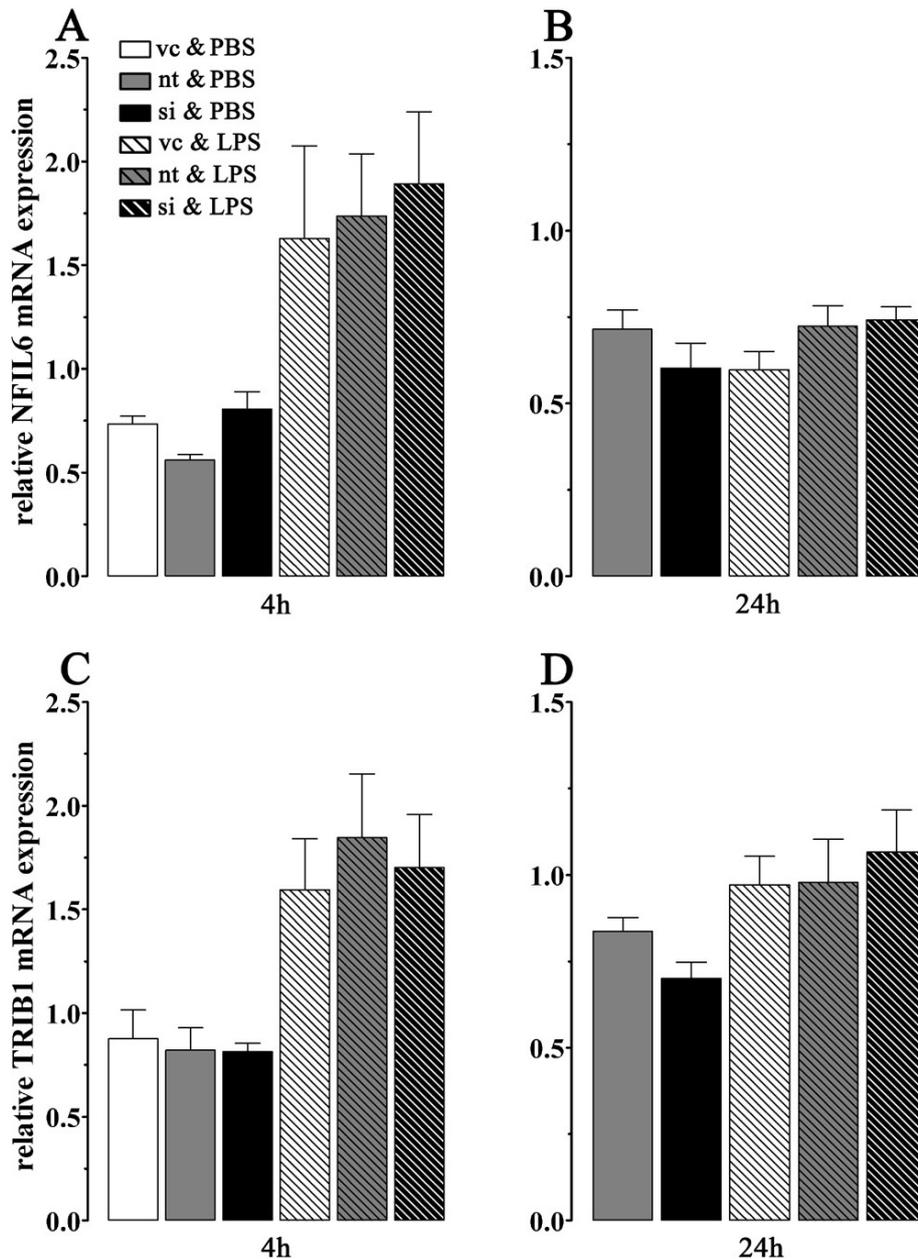


Abb. 92: Induktion der mRNA-Expression von NF-IL6 und Trib1 im Hypothalamus 4- und 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Die intracerebroventrikuläre Applikation der siRNA hatte keine Auswirkungen auf die Expression von NF-IL6-mRNA mit oder ohne LPS-Stimulation.

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.).

Um die "downregulation" der NF-IL6-mRNA durch die anti-NF-IL6-siRNA zu überprüfen, wurden Proben aus dem Hypothalamus für die Zeitpunkte 4- und 24 Stunden nach Applikation von 100 µg/kg KM LPS oder PBS (i.p.) untersucht. Dies entsprach damit einem Zeitraum von 28- bzw. 48 Stunden nach intracerebroventrikulärer Verabreichung der siRNA bzw. der Kontrolllösungen (vehicle oder non-targeting RNA). Infolge der LPS-Injektion stiegen in allen entsprechend behandelten Gruppen die NF-IL6-mRNA-Gehalte an, was jedoch weder für den Zeitpunkt 4- noch für den Zeitpunkt 24 Stunden signifikante Ausmaße erreichte (Abb. 92 A, B). Eine Verminderung der NF-IL6-Expression durch die Behandlung mit anti-NF-IL6-siRNA konnte im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen weder im basalen Bereich nach PBS-Behandlung noch im Zusammenhang mit der LPS-bedingten Geninduktion gezeigt werden. Tribbles (Trib) 1 -mRNA wies entsprechende Expressionen auf und zeigte sich ebenfalls durch die verabreichte anti-NF-IL6-siRNA unbeeinflusst (Abb. 92 C, D). Zur Verdeutlichung möglicher Nebeneffekte durch die siRNA-Lösungen wurde außerdem die Induktion von Interferon (IFN) α -mRNA analysiert. Dabei fielen lediglich eine leichte Erniedrigung der Expression in anti-NF-IL6-siRNA-behandelten Tieren 4 Stunden nach LPS-Stimulation sowie eine IFN α -induzierende Tendenz der non-targeting RNA auf, was jeweils keine signifikanten Trends darstellte (Abb. 93).

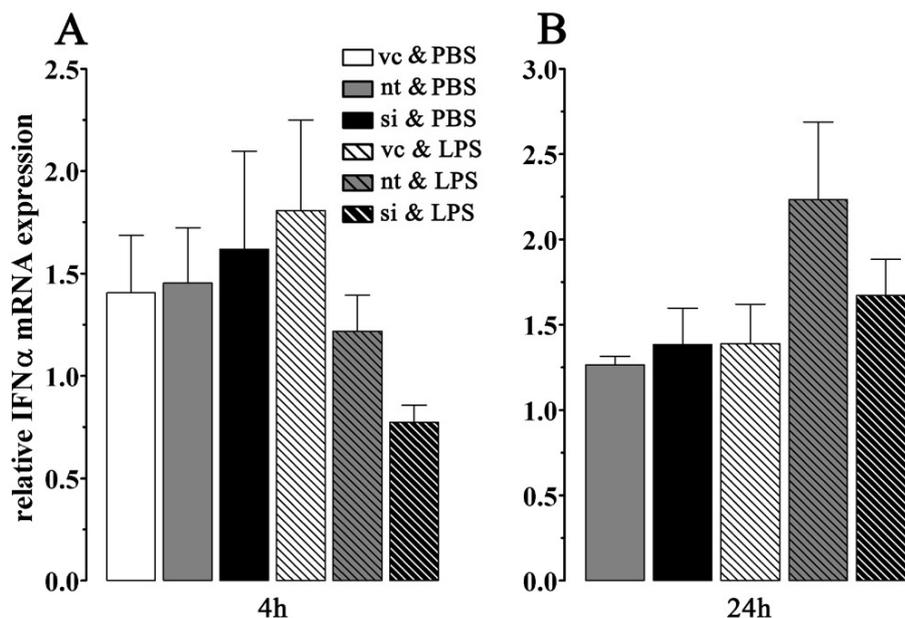


Abb. 93: Induktion der IFN α mRNA-Expression 4- und 24 h nach intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.).

3.2. NF-IL6 Immunreaktivität

Zur Beurteilung der Auswirkungen der anti-NF-IL6-siRNA auf die nukleäre Expression von NF-IL6 im Gehirn, verglichen mit der non-targeting RNA und dem reinen Lösungsmittel (vehicle) auf Proteinebene, dienten wiederum immunhistochemische Untersuchungen 20 µm dicker, coronaler Hirnschnitte. Dazu wurde zunächst exemplarisch das OVLT der Tiere aller Behandlungsgruppen für die Zeitpunkte 4 und 24 Stunden herangezogen.

Tiere, die intraperitoneal mit PBS behandelt worden waren, zeigten nach 4 Stunden vereinzelte NF-IL6-Signale, vor allem im Bereich der Hirnhäute, die aber nie mit Endothelzellsignalen (von Willebrand Faktor, vW) kolokalisierten (Abb. 94 A-C, a-c). Dabei war kein Unterschied zwischen den verschiedenen, 24 Stunden zuvor erfolgten, intracerebroventrikulären Vorbehandlungen (vehicle, 5 µg non-targeting RNA oder 5 µg anti-NF-IL6-siRNA) zu erkennen. In allen vorbehandelten Gruppen führte die intraperitoneale Injektion von 100 µg/kg KM LPS zu einer moderat ausgeprägten NF-IL6-I.R., was den Ergebnissen zum Zeitverlauf aus der ersten Teilstudie entsprach (Abb. 47, S.137). NF-IL6 I.R. war verbreitet mit vW-markierten Endothelzellen kolokalisiert. Eine Reduktion der NF-IL6-I.R. in Tieren, die intracerebroventrikulär mit anti-NF-IL6-siRNA vorbehandelt worden waren gegenüber solchen, die nur das Lösungsmittel erhalten hatten, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Folglich konnte auch kein Hinweis auf eine „downregulation“ der NF-IL6-Expression durch die siRNA dieser Sequenz aufgezeigt werden. Lediglich eine leichte Erhöhung der NF-IL6-Signaldichte in beiden RNA-behandelten Gruppen konnte dargestellt werden, wobei die induzierende Wirkung der non-targeting RNA etwas stärker ausfiel (Abb. 94 D - F). Dieses Bild spiegelte sich auch in der semiquantitativen Bewertung wieder (Tab. 44, -: keine NF-IL6-Signale, +++: maximale Signaldichte und -intensität).

Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der intraperitonealen Injektion waren in PBS-behandelten Kontrolltieren keine NF-IL6-Signale mehr detektierbar (Abb. 95 A - C). Auch nach LPS-Stimulation wurde in allen behandelten Gruppen nur in wenigen Einzelfällen NF-IL6-I.R. festgestellt, was sich wiederum mit den Ergebnissen der Teilstudie zum Zeitverlauf deckte (Abb. 49, S. 140, Abb. 95 D - F). Erkennbare Unterschiede zwischen den verschiedenen vorbehandelten Gruppen waren auch zu diesem Zeitpunkt weder qualitativ noch semiquantitativ detektierbar (Tab. 45).

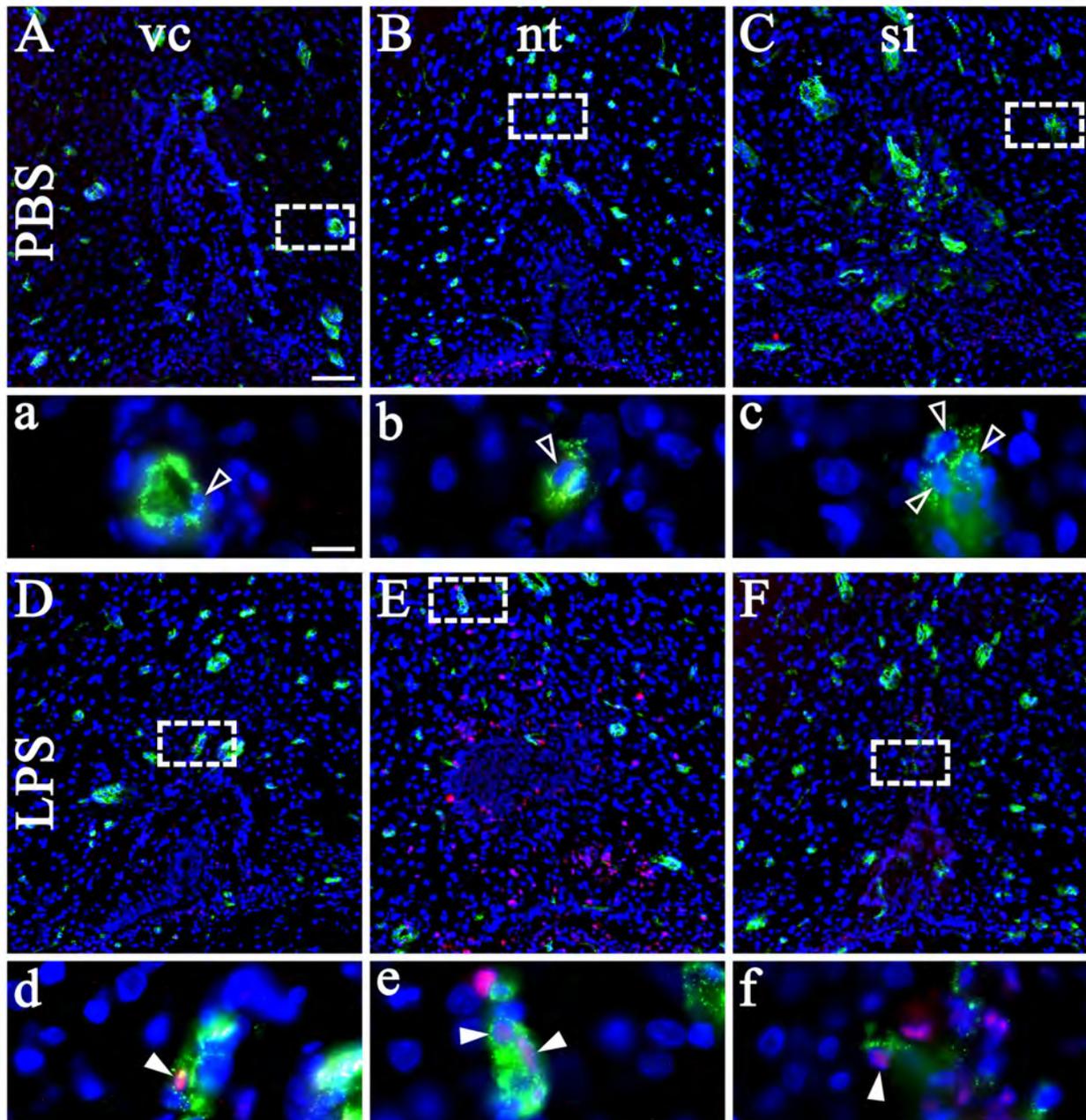


Abb. 94: NF-IL6-Immunreaktivität im OVLT 4 h nach intraperitonealer Injektion

Übersichtsaufnahmen (A - F) zeigen jeweils die Verteilung von nukleären NF-IL6-Signalen (pink) im gesamten OVLT. Bereiche der vergrößerten Ausschnitte (a - f) sind durch einen weißen Kasten markiert. Darin ist nach LPS-Stimulation (100 µg/kg, d - f) deutlich die Kolokalisation der NF-IL6-Signale mit von Willebrand Faktor (vW)-positiven Endothelzellen (grün) erkennbar. Der blaue Kanal stellt die Färbung aller Zellkerne (DAPI) dar. Gefüllte Pfeilspitzen zeigen die NF-IL6-immunreaktiven Endothelzellen an, während offene Pfeilspitzen vW-reaktive Zellen ohne NF-IL6-Signal markieren. Größenmarker in A (gilt für B - F) entspricht 50 µm, Größenmarker in a (gilt für b - f) entspricht 10 µm. Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*

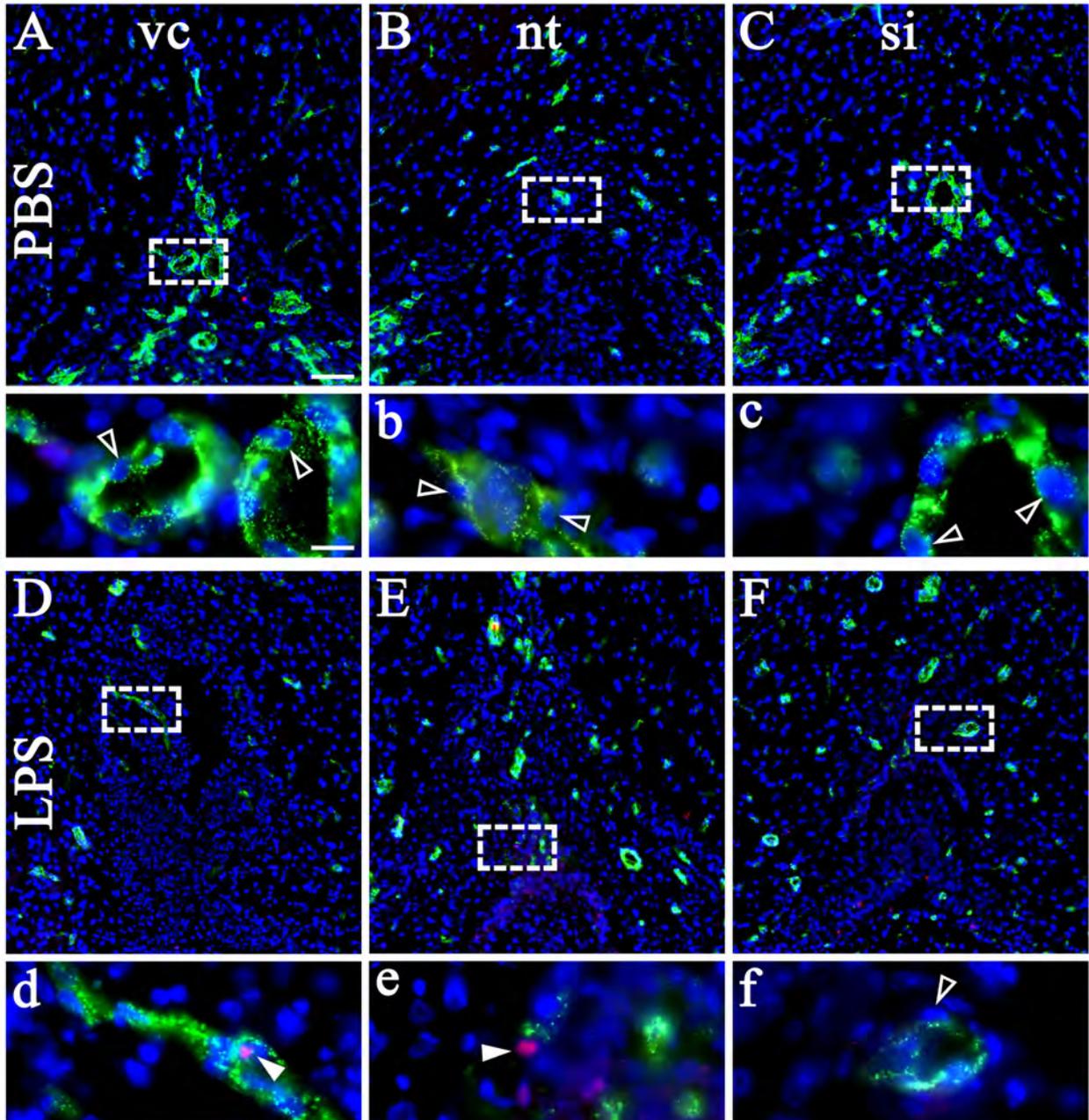


Abb. 95: NF-IL6-Immunreaktivität im OVLT 24 h nach intraperitonealer Injektion

Übersichtsaufnahmen (A - F) zeigen jeweils die Verteilung von nukleären NF-IL6-Signalen (pink) im gesamten OVLT. Bereiche der vergrößerten Ausschnitte (a - f) sind durch einen weißen Kasten markiert. Darin ist nach LPS-Stimulation (100 µg/kg, d - f) zum Teil Kolokalisation der NF-IL6-Signale mit von Willebrand Faktor (vW)-positiven Endothelzellen (grün) erkennbar. Der blaue Kanal stellt die Färbung aller Zellkerne (DAPI) dar. Gefüllte Pfeilspitzen zeigen die NF-IL6-immunreaktiven Endothelzellen an, während offene Pfeilspitzen vW-reaktive Zellen ohne NF-IL6-Signal markieren. Größenmarker in A (gilt für B - F) entspricht 50 µm, Größenmarker in a (gilt für b - f) entspricht 10 µm. Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). OVLT: *Organum vasculosum laminae terminalis*

Behandlung	Nukleäre NF-IL6-I.R.
vc & PBS	(+)
nt & PBS	(+)
si & PBS	-
vc & LPS	+
nt & LPS	++
si & LPS	++

Tab. 44: Semiquantitative Beurteilung der nukleären NF-IL6-I.R. im OVLT 4 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: vehicle (vc, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). Zeichen: – = Keine I.R., +++ = maximale I.R.

Behandlung	Nukleäre NF-IL6-I.R.
nt & PBS	-
si & PBS	-
vc & LPS	(+)
nt & LPS	(+)
si & LPS	(+)

Tab. 45: Semiquantitative Beurteilung der nukleären NF-IL6-I.R. im OVLT 24 h nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion

Versuchsgruppen: 5 µg non-targeting RNA (nt, i.c.v.) & PBS (i.p.), 5 µg anti-NF-IL6-siRNA (si, i.c.v.) & PBS (i.p.), vc (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.), 5 µg nt (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.) und 5 µg si (i.c.v.) & 100 µg/kg KM LPS (i.p.). Zeichen: – = Keine I.R., +++ = maximale I.R.

IV. DISKUSSION

1. NF-IL6 als später Zellaktivierungsmarker im Zeitverlauf LPS-induzierter systemischer Inflammationen

Anhand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eindeutig und detailliert gezeigt werden, dass NF-IL6 als neuer „später“ Zellaktivierungsmarker vielfältiges Potential für die Neurowissenschaften im Rahmen neuroanatomischer Studien zu Entzündungsreaktionen aufweist. Allgemein sind bereits einige derartige Aktivierungsmarker bekannt. So kann eine genomische Zellaktivierung im Gehirn im Verlauf systemischer Inflammationen über die Detektion zytokininduziert neu exprimierter Proteine untersucht werden. Zu diesen gehört z.B. c-Fos, welches allgemein als Marker für die Aktivierung von Neuronen angesehen wird (Elmqvist et al., 1993; Sagar et al., 1995). Darüber hinaus ist vor allem in frühen Phasen der Inflammation (Harre et al., 2002; Laflamme & Rivest, 1999; Nadjar et al., 2003; Rummel et al., 2004) auch über die Darstellung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT3, NF- κ B) eine Analyse der genomischen Aktivierung verschiedener Zellphänotypen möglich. NF-IL6 kann hingegen, unter anderem aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie, als später Aktivierungsmarker im Gehirn angesehen werden: Im Zeitverlauf trat hier die maximale NF-IL6-Aktivität im Gehirn im Zeitraum zwischen 6 und 8 Stunden nach einem LPS-Stimulus auf, was anhand der NF-IL6-I.R., sowie anteilig für den cerebralen Cortex auch im Western Blot belegt wurde (Abb. 55, S. 150). Dies bestätigt Ergebnisse aus vorangegangenen Studien, in denen ebenfalls eine relativ spät, während inflammatorischer Antworten auftretende NF-IL6-Aktivität gezeigt wurde. So kam es beispielsweise in murinen Makrophagen zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Stimulation mit LPS zu einer ansteigenden DNA-Bindungsaktivität von NF-IL6 (Tengku-Muhammad et al., 2000). In Mikrogliazellen wurde nach *in vivo*-Stimulation mit septischen LPS-Dosen nach 16 Stunden eine verstärkte NF-IL6-Expression nachgewiesen (Ejarque-Ortiz et al., 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte, induzierte NF-IL6-Aktivität in Strukturen und Zellphänotypen, die für die humorale Weiterleitung inflammatorischer Signale aus der Peripherie ins ZNS von Bedeutung sind, legt NF-IL6-Funktionen für diesen Weg nahe (Kap. IV., 1.1.). Außerdem kann NF-IL6, ebenso wie die Expression von c-Fos, als Marker neuronaler Aktivität dienen (Cortes-Canteli et al., 2008), möglicherweise auch im Rahmen der nervalen Signalweiterleitung nach peripherer Immunstimulation. Damit spielt dieser Transkriptionsfaktor potentiell eine wichtige Rolle für zukünftige Studien, die sich mit verschiedenen Wegen der Weiterleitung inflammatorischer Signale ins ZNS auseinandersetzen. Für diesen Zweck ist die Verwendung der bereits vielfach genutzten Aktivierungsmarker c-Fos (vorwiegend für neuronale Aktivität), STAT3 und NF- κ B (auch für Zellen des humoralen Signalwegs) durch deren kurzzeitige und frühe Aktivierung in vieler Hinsicht limitiert. Aus ihrem Zusammenspiel kann erst durch Einbeziehung von NF-IL6 ein Gesamtbild aktiver Zellen in räumlicher und nun auch vollständig zeitlicher Dimension erstellt werden. Darüber hinaus kommt NF-IL6 auch als Zellaktivitätsmarker nach traumatischen oder mechanischen Läsionen im Gehirn eine wichtige Bedeutung zu (vgl. Kap. IV., 2.1.).

Auf funktionaler Ebene gibt es Hinweise auf eine Rolle von NF-IL6 für die Aufrechterhaltung oder aber Beendigung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome. Dazu zählen beispielsweise Parallelen der NF-IL6-Aktivierung zu späten Phasen einerseits des Komplexes „sickness-behavior“, andererseits aber auch des Auftretens von Zytokinen im Blutkreislauf (Kap. IV., 1.2.).

Zeitliche Korrelationen der NF-IL6-Expression mit der Induktion relevanter Zielgene untermauern dies (Kap. IV., 1.3.).

1.1. NF-IL6-Expression im Gehirn und mögliche funktionale Auswirkungen

Die erste Teilstudie der vorliegenden Arbeit zeigt erstmalig ein deutliches, zeitabhängiges Muster der LPS-induzierten NF-IL6-I.R., welches sich für verschiedene Hirnregionen spezifisch darstellte. Von besonderem Interesse ist hierbei die deutliche Induktion der NF-IL6-I.R. in Hirnstrukturen und Zellen, die vor allem an der Übermittlung peripherer inflammatorischer Signale an das ZNS und der Induktion und Aufrechterhaltung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome beteiligt sind (z.B. sCVO und Zellen der Blut-Hirn-Schranke; siehe auch Kap. I., 2.2.1. und 2.3., sowie Kap. IV., 1.1.2.). Die Detektion mittels Western Blot zeigte lediglich für den cerebralen Cortex eine erhöhte NF-IL6-Expression nach LPS-Stimulation, während im Hypothalamus und Stammhirn keine Induktion festgestellt werden konnte. Erste Rückschlüsse bezüglich möglicher Aktivatoren von NF-IL6 im Gehirn können anhand von Korrelationen der NF-IL6-I.R. und den Konzentrationen bioaktiver Zytokine im Plasma im Zeitverlauf gezogen werden. Diese Ergebnisse lassen verschiedene Hypothesen zu funktionalen Auswirkungen der NF-IL6-Expression im Gehirn zu, welche im Folgenden näher erläutert werden sollen.

1.1.1. Anatomische Verteilungsmuster

Eine konstitutive Expression von NF-IL6 mRNA im Gehirn von Mäusen wurde bereits 1990 nachgewiesen, die höchste Konzentration lag dabei im Hippocampus vor (Kuo et al., 1990). Dies bestätigte sich in späteren Studien (Sterneck & Johnson, 1998), wobei der Großteil der NF-IL6-exprimierenden Zellen als Neurone identifiziert wurde. Zusätzlich wiesen Nadeau et al. in Neuronen zahlreicher Hirnstrukturen mittels *in situ* Hybridisierung eine induzierte Expression von NF-IL6 auf mRNA-Ebene nach axonalen Verletzungen nach (Nadeau et al., 2005). Auf Proteinebene wurde kürzlich von Ejarque-Ortiz et al. eine Induzierbarkeit von NF-IL6 im Gehirn von Mäusen in einem Modell des septischen Schocks durch LPS nachgewiesen. Dabei trat eine vermehrte NF-IL6-Expression in Mikrogliazellen auf (Ejarque-Ortiz et al., 2007). Allerdings wurden das anatomische Verteilungsmuster und die Expression von NF-IL6 in anderen Zellphänotypen, die für die Signalübermittlung inflammatorischer Stimuli ans Gehirn von Bedeutung sind, in den genannten Studien nicht näher untersucht, ebenso wie die Ratio von aktivierenden (LAP*, LAP) zu inhibierenden (LIP) NF-IL6-Isoformen, die nach einer Stimulation mit LPS vorlag (Ejarque-Ortiz et al., 2007, Nadeau et al., 2005).

Neben einer konstitutiven, nicht sichtbar durch LPS induzierbaren NF-IL6-Expression im Hippocampus, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch in Ependymzellen der Ventrikel und in der Hypophyse eine nukleäre NF-IL6-Grundreaktivität festgestellt werden. Diese war allerdings durch LPS zusätzlich induzierbar (Abb. 46, S. 135). Im Western Blot wurde nach LPS-Stimulation allein LAP (35 kDa) detektiert. Dies untermauert die Hypothese eines aktiven Eingreifens von NF-IL6 in die Expression von inflammatorischen Genen.

1.1.2. Mögliche Relevanz der NF-IL6-I.R. in bestimmten Hirnregionen

Hervorzuheben ist eine infolge peripherer LPS-Stimulation vermehrt in den sCVO (OVLT, SFO, AP) auftretende NF-IL6-I.R., da diese Regionen bedeutende Stationen der Übermittlung inflammatorischer Signale aus dem Blutkreislauf an die entsprechenden regulatorischen Zentren im Hypothalamus darstellen (Roth et al., 2004, vgl. Kap. I., 2.2.1.). Neben der bekannten Bedeutung des OVLT, des MnPO und des SFO für die Entwicklung von Fieber, sowie des SFO und der AP für Anorexie, Adipsie und Lethargie (Kap. I., 2.3.), sind auch für zahlreiche weitere Regionen, die in

dieser Studie durch induzierte NF-IL6-Expression auffielen, Funktionen im Regelkreis des „sickness-behavior“ beschrieben worden. So sind beispielsweise auch Zusammenhänge zwischen einer Aktivierung im RPa, der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine deutliche NF-IL6-Induktion aufwies (Abb. 46), und der Fieberinduktion, vermittelt über PGE₂ bekannt (Nakamura et al., 2002): Demnach können pyrogene Signale aus der POA durch Vermittlung über den RPa präganglionäre sympathische Neurone erreichen, die an der Thermogenese und damit schließlich an der Fieberentstehung beteiligt sind (Lazarus et al., 2007; Nakamura et al., 2002).

Die schon zu verhältnismäßig frühen Zeitpunkten auftretende, maximale NF-IL6-I.R. im ChP (Tab. 22, S. 138) könnte mit der diskutierten Funktion dieser Struktur als Weiterleitungsinstanz inflammatorischer Signale innerhalb des ZNS zusammenhängen. So wird z.B. ein Weg vermutet, in dem im ChP auf einen Stimulus hin gebildetes IL-1 β über Diffusion aus der Cerebrospinalflüssigkeit regulatorische Hirnareale erreichen kann (Konsman et al., 1999). Somit wäre eine Rolle von NF-IL6 für die frühe, evtl. direkt LPS-induzierte Bildung inflammatorischer Mediatoren im ChP und deren anschließende Weiterleitung denkbar.

Eine potentielle Bedeutung von NF-IL6 für die Aktivierung der HPA-Achse im Zuge systemischer Inflammationen ergibt sich aus den Ergebnissen mehrerer Untersuchungen: So könnte zum Einen eine direkte Beteiligung von NF-IL6 an der Expression von CRH und dem ACTH-Vorläufer Proopiomelanocortin (POMC) vorliegen. Eine Rolle von NF-IL6 in der Aktivierung des CRH-Promotors wurde von Stephanou et al. dargestellt (Stephanou et al., 1997). Außerdem zeigte sich eine vermehrte Transkription von POMC in Hypophysen-Adenomzellen, die mit einer NF-IL6-Überexpression in Zusammenhang stand (Abbud et al., 2004). Ebenso könnte NF-IL6 eine indirekte Rolle spielen, indem es Regulationsfaktoren der CRH-Freisetzung mit kontrolliert: In der ME scheint die Freisetzung von CRH unter anderem durch Prostaglandine und NO kontrolliert zu werden. Indirekt können diese beide durch NF-IL6 induziert werden, indem der Transkriptionsfaktor die Transkription der COX2 bzw. der induzierbaren NOS (iNOS) steigert (Chun & Surh, 2004; Kolyada & Madias, 2001). Die im Rahmen der vorliegenden Studien festgestellte, verstärkte NF-IL6-Expression in der ME steht somit möglicherweise mit einer vermehrten CRH-Sekretion im Zusammenhang. Dieses stammt ursprünglich aus Neuronen des PVN, die in die ME projizieren. Folgende Ausschüttung von ACTH aus corticotropen Zellen der Hypophyse, die ebenfalls induzierbare NF-IL6-I.R. zeigte, führt in diesem Modell letztendlich zur Freisetzung von Cortisol aus der Nebennierenrinde (Papadimitriou & Priftis, 2009). In corticotropen Pituizyten ist ein mögliches Zusammenwirken von NF-IL6 mit STAT3 ebenso denkbar. Die Induzierbarkeit von STAT3 durch IL-6 in diesen Zellen konnte bereits gezeigt werden (Gautron et al., 2003). Solch eine Interaktion von STAT3 und NF-IL6 bleibt allerdings in zukünftigen Kolokalisationsstudien noch zu bestätigen. Zusammenfassend könnte NF-IL6 also auf verschiedenen Ebenen (CRH, POMC, Freisetzung) eine potentielle Bedeutung für die Förderung der Cortisolfreisetzung besitzen und damit die Immunantwort nach systemischer Stimulation herunter regulieren. Antipyretische Eigenschaften von Cortisol und anderen Glucocorticoiden, z.B. Dexamethason (Watanabe et al., 1995) sind bereits seit langer Zeit bekannt (Kass & Finland, 1958). Kontinuierliche systemische Freisetzung von Cortisol kann beispielsweise LPS-bedingtes Fieber senken und die durch IL-1 β verursachte IL-6-Synthese hemmen (Chai et al., 1996a; Roth, 2006). Eine direkte Injektion von Corticosteroiden in den anterioren Hypothalamus reduziert LPS-Fieber nach Adrenalectomie, während Glucocorticoid-Rezeptorantagonisten in Wildtyp-Tieren erhöhtes Fieber hervorrufen (McClellan et al., 1994).

In Bezug auf die Funktion von NF-IL6 für das Langzeitgedächtnis im Hippocampus (Kap. I., 3.3.2., S. 45) konnte die dortige, starke konstitutive Expression von NF-IL6 (Kuo et al., 1990; Nadeau et al., 2005; Sterneck & Johnson, 1998) in dieser Studie ebenfalls gezeigt werden. Eine verstärkte NF-IL6-I.R. nach LPS-Stimulation, welche im Zusammenhang mit der bekannten Zytokininduktion im Hippocampus infolge derartiger Stimuli stehen könnte, war hier jedoch nicht detektierbar (Henry et al., 2008; Laye et al., 1994; vgl. Abb. 46, Tab. 22). Eine Beteiligung von konstitutiv exprimiertem NF-IL6 an dieser vermehrten Produktion inflammatorischer Zytokine ist aber ebenso denkbar wie eine im Rahmen dieser Studie nicht qualitativ detektierbare Induktion der schon basal starken NF-IL6-I.R. im Hippocampus.

1.1.3. Phänotypische Zusammensetzung reagierender Zellpopulationen und deren mögliche Rolle für die inflammatorische Reaktion im Gehirn

In vitro konnte NF-IL6-I.R. neben Mikrogliazellen in der Vergangenheit bereits mehrfach in Astrozyten und Neuronen gezeigt werden (Ejarque-Ortiz et al., 2007; Pahan et al., 2002). Diese trat auch *in vivo* nach Stimulation mit LPS oder Zytokinen (Ejarque-Ortiz et al., 2007; Pahan et al., 2002), temporärer Hypoxie (Haltermann et al., 2008) oder excitotoxischer Hirnschädigung (Cortes-Canteli et al., 2008; Ejarque-Ortiz et al., 2007) vermehrt auf. Die Induzierbarkeit von NF-IL6 durch VIP (vasoactive intestinal peptide), Noradrenalin und Glutamat bzw. KCl in diesen Zellen (Cardinaux & Magistretti, 1996; Cortes-Canteli et al., 2008; Sun et al., 2007) untermauert die Annahme der grundlegenden Rolle von NF-IL6 als Aktivierungsmarker von Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Phänotypisierung NF-IL6-exprimierender Zellpopulationen im Gehirn infolge einer *in vivo* LPS-Stimulation durchgeführt. LPS-bedingte nukleäre NF-IL6-I.R. trat dabei in Mikrogliazellen, Endothelzellen, perivaskulären Makrophagen, Astrozyten und Neuronen auf (Abb. 51, S. 143; Abb. 52; S. 145). Im Gegensatz zu Ejarque-Ortiz et al. (2007), die ausschließlich ruhende Mikrogliazellen darstellten, wurden hier Marker für aktivierte Mikrogliazellen verwendet. So konnte ein paralleles Auftreten der Aktivierung und der verstärkten NF-IL6-I.R. in diesen Zellen demonstriert werden (Abb. 51, E, K, Q). Obwohl eine NF-IL6-Expression allgemein in Endothelzellen, z.B. in der Lunge, (Kolyada & Madias, 2001) und Makrophagen (Akira, 1997; Tanaka et al., 1995) bekannt ist, konnte in der hier vorliegenden Studie erstmalig deutlich die Steigerung der NF-IL6-I.R. in Gehirnendothelzellen und perivaskulären Makrophagen demonstriert werden. Diese bilden entscheidende Instanzen der Übermittlung von peripheren Immunsignalen an das ZNS über die Produktion sekundärer Mediatoren wie PGE₂ (Kap. I., 2.2.) oder einwandernde Immunzellen (Rummel et al., 2010), woran demnach auch NF-IL6 beteiligt sein könnte. Die Bedeutung von Endothelzellen scheint für NF-IL6-vermittelte Effekte größer zu sein als dies für STAT3-bedingte Signalübermittlungen der Fall ist: In vorangegangenen Studien reagierten in den sCVO von Ratten und Meerschweinchen hauptsächlich Astrozyten (Gautron et al., 2002; Rummel et al., 2005a) mit STAT3-I.R. auf die LPS-Stimulation. Diese machten in der vorliegenden Arbeit generell nur einen geringen Prozentsatz NF-IL6-i.r. Zellphänotypen in diesen Hirnregionen aus (Abb. 52, Tab. 23). Eine mögliche Bedeutung der LPS-stimulierten NF-IL6-I.R. von Astrozyten und Mikrogliazellen für inflammatorische Reaktionen im Gehirn liegt in seiner Beteiligung an der Produktion sekundärer inflammatorischer Mediatoren wie Interleukinen und PGE₂ (Chakravarty & Herkenham, 2005; Herkenham et al., 1998; Nadeau & Rivest, 2000; Nguyen et al., 2002; Quan et al., 1997; vgl. Kap. I., 2.4.5.). NF-IL6-I.R. in Neuronen könnte hingegen deren direkte Aktivierung über afferente neuronale Wege (Price et al., 2008; vgl. Kap. I., 2.3.) anzeigen und damit eine Rolle von NF-IL6 für diesen Prozess vermuten lassen. Insgesamt könnten mehr NF-IL6-i.r. Neurone vorhanden sein, als in der vorliegenden Studie detektiert wurden, da hier nur nNOS-exprimierende

Neurone untersucht wurden. So ist nicht auszuschließen, dass NF-IL6 auch in weiteren Neuronengruppen, z.B. im OVLT oder im MnPO an deren direkter Aktivierung durch zirkulierende Mediatoren beteiligt ist (Hori et al., 1992; Matsuda et al., 1992; Stitt, 1986, 1991). Die Tatsache, dass in den meisten untersuchten Hirnregionen nicht die gesamte Zahl der NF-IL6-reaktiven Zellen eindeutig phänotypisch zugeordnet werden konnte (Abb. 52), unterstützt diese Annahme.

Bezüglich der Detektion aktivierter Mikrogliazellen und perivaskulärer Makrophagen mit gegen CD68 und CD163 gerichteten Antikörpern ist zu bedenken, dass eine rein spezifische Färbung der jeweiligen Zelltypen mit dieser Methode nur bedingt möglich ist. So wurde gezeigt, dass beide Antikörper anteilig auch Neutrophile Granulozyten anfärben (Matsumoto et al., 2007; Saito et al., 1991; Wu et al., 2003). Außerdem zeigen perivaskuläre Zellen eine schwache Reaktivität auf gegen CD68 gerichtete Antikörper (Dijkstra et al., 1985; Graeber et al. 1989). Daher können in der vorliegenden Studie Doppelmarkierungen perivaskulärer Zellen mit beiden Antikörpern nicht ausgeschlossen werden. Dies erklärt z.B. den über 100% liegenden Anteil identifizierter Zellphänotypen im MnPO (Abb. 52), da ein Teil der Zellen zu beiden Phänotypen gezählt wurde. Eine Verfälschung der Phänotypisierung durch Neutrophile Granulozyten ist allerdings aufgrund der Dosis von 100 µg/kg KM LPS und der untersuchten Zeitpunkte höchst unwahrscheinlich (Rummel et al., 2010). Erst bei höheren systemisch verabreichten LPS-Dosierungen und zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. 1 mg/kg LPS, 24 h) ist eine deutliche Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten ins Gehirn von Mäusen zu beobachten (Bohatschek et al., 2001; Rummel et al., 2010).

1.1.4. Potentielle Aktivatoren von NF-IL6 im Gehirn

Als Auslöser der beobachteten vermehrten NF-IL6-Expression im Gehirn kommt zum Einen LPS selbst in Frage, dessen zumindest indirekte, NF-IL6-induzierenden Eigenschaften in astroglialen Zellkulturen bereits gezeigt wurden (Ejarque-Ortiz et al., 2007; Kelicen & Tindberg, 2004; Perez-Capote et al., 2006). Das Vorhandensein entsprechender Rezeptoren (TLR4, CD14; Kap. I., 2.4.1.) in den sCVO, die in der vorliegenden Arbeit starke, LPS-induzierte NF-IL6-I.R. aufwiesen, spricht für eine verzögert auftretende, aber direkte Aktivierung von NF-IL6 durch LPS, wie sie auch für STAT3 beschrieben wurde (Rummel et al. 2005a, 2008). Auch Lu et al. (2009) gehen von einem direkten Aktivierungsweg von NF-IL6 über LPS aus, der unter anderem das Adapterprotein MyD88 einschließt, welches an der Signaltransduktion am TLR4 maßgeblich beteiligt ist (Kap. I., 2.5.2.2.). Sie stellten die Hypothese auf, dass ein LPS-Stimulus über den TLR4 eine MyD88-abhängige Aktivierung von NF-IL6 bewirkt bzw. dessen DNA-Bindungsaktivität und Expression steigert. Aktives NF-IL6 könnte so zusammen mit NF-κB die Produktion, unter anderem von TNFα und IL-6, bewirken. Diese Hypothese ergibt sich aus der Beobachtung, dass in MyD88-defizienten Makrophagen sowohl die NF-IL6- als auch die Zytokininduktion durch LPS verringert waren. Als Hinweis darauf, dass LPS selbst in Wildtypzellen die NF-IL6-Expression steigert und nicht die sekundär (z.B. über NF-κB-Aktivierung) gebildeten Zytokine, dienten TLR-Aktivierungsstudien in NF-IL6-defizienten Zellen. Da diese verminderte Reaktionen auf verschiedene TLR-Agonisten zeigten, ist zumindest zu einem Teil eine direkt LPS-vermittelte Aktivierung von NF-IL6 über TLR4 wahrscheinlich. Allerdings bleibt dabei unklar, warum die Aktivierung von NF-IL6 nach LPS-Stimulation, anders als für NF-κB, erst verzögert auftritt.

Eine mögliche Ursache für diese Verzögerung ist eine zusätzliche NF-IL6-Induktion durch pro-inflammatorische Zytokine (IL-1β, TNFα, IL-6) im Anschluss an einen LPS-Stimulus. Die Induktion von NF-IL6-mRNA *in vivo* durch diese endogenen Pyrogene wurde bereits für verschiedene Gewebe gezeigt (Akira & Kishimoto, 1992), wobei in diesen Studien allerdings keine deutliche

Expressionssteigerung im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Primäre Astrozyten von Mäusen reagierten *in vitro* hingegen auf eine Stimulation mit IL-1 β oder TNF α ebenfalls mit gesteigerter NF-IL6-mRNA-Expression (Cardinaux et al., 2000). Die Bedeutung dieser sekundären, potentiellen NF-IL6-Aktivatoren ist wie bereits erwähnt deshalb essentiell, weil die NF-IL6-I.R. erst relativ spät (6 - 8 Stunden nach LPS) ihr Maximum erreicht, einem Zeitpunkt, an dem die Ausschüttung der endogenen Pyrogene in die Zirkulation bereits größtenteils abgeschlossen ist (Kap. I., 2.1.). Eine dominierende Rolle von IL-6 ist dabei wahrscheinlich. Zum Einen fallen die Höchstwerte der Konzentration von bioaktivem IL-6 im Plasma mit dem Maximum der NF-IL6-I.R. im Gehirn zusammen (Abb. 43, Tab. 21; Kap. IV., 1.2.). Zum Anderen wurde seine Beteiligung (Rummel et al., 2006, 2008), sowie die von IL-1 β (Nadjar et al., 2003) und TNF α (Laflamme & Rivest, 1999) für die Zellaktivierung in Blutgefäßen des Gehirns während LPS-induzierten inflammatorischen Reaktionen mehrfach nachgewiesen. Auch hierin liegt ein Hinweis auf die Bedeutung von NF-IL6 vor allem für die späte Phase bzw. in der Vermittlung der zweiten Induktionswelle (Kap. I., 2.4.; S. 26) der Signalübermittlung ans Gehirn. Um eindeutig die Rolle von Zytokinen bei der LPS-induzierten NF-IL6-Aktivierung zu untersuchen, könnten in Folgestudien Anti-Zytokinstrategien wie beispielsweise zytokindefiziente Mäuse oder Zytokinantisera für *in vivo* oder *in vitro* Experimente verwendet werden.

1.1.5. Funktionsweise von NF-IL6 – mögliche Wichtung von Regulationsmechanismen seiner Aktivität

In Bezug auf die zahlreichen Möglichkeiten posttranslationaler Modifikationen von NF-IL6 und deren möglicher Auswirkungen auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors, z.B. über Phosphorylierungen (Kap. I., 3.2.2.), kann aus dieser Studie ein Trend entnommen werden: Die Bedeutung einer nukleären Translokation bereits vorhandener NF-IL6-Proteine vom Zytoplasma in den Nukleus für die NF-IL6-Aktivität wird diskutiert. Im Fall von STAT3- und NF- κ B-Aktivitäten spielt dieser Mechanismus bekanntermaßen eine wichtige Rolle (Chinery et al., 1997; Metz & Ziff, 1991; vgl. Kap. I., 3.2.2.3.), scheint aber für NF-IL6 aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse von untergeordneter Bedeutung zu sein. Diese Hypothese war bereits durch Studien anderer Arbeitsgruppen postuliert worden und konnte hier weiter untermauert werden (Ejarque-Ortiz et al. 2007). Immunhistochemisch konnte in der vorliegenden Arbeit dementsprechend keine zytoplasmatische NF-IL6-I.R. in ruhenden Zellen festgestellt werden, die sich möglicherweise bei deren Aktivierung in den Zellkern verlagert. Im Einklang mit den in einigen Hirnregionen erhöhten, mittels Western Blot detektierten NF-IL6-Konzentrationen (Abb. 55, S. 150), ist ein Modell wahrscheinlicher, in dem ein peripherer LPS-Stimulus in erster Linie die *de novo* Synthese von NF-IL6 initiiert, das dann im Nukleus akkumuliert und die Transkription von Zielgenen initiiert. Trotzdem kann eine mögliche Bedeutung der nukleären Translokation infolge inflammatorischer Stimuli nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da die in dieser Studie durch immunhistochemische Untersuchungen nicht nachweisbare zytoplasmatische NF-IL6-I.R. auf technischen Limitationen beruhen könnte. So ist es möglich, dass Epitope inaktiver (zytoplasmatischer) NF-IL6 für Antikörper möglicherweise nicht oder weniger gut zugänglich sind, da das Protein in seiner inaktiven Form stark kondensiert, also in stark gefalteter Tertiärstruktur vorliegt (Williams et al., 1995). Somit fände eine Detektion vor allem, wenn nicht ausschließlich, aktivierter NF-IL6-Proteine statt, die sich im Zellkern befinden. Inaktiv vorliegende NF-IL6 würden durch immunhistochemische Untersuchungen kaum erfasst, könnten allerdings im Western Blot durch die vorhergehenden Denaturierungsschritte, die Bindungsstellen für Antikörper zugänglicher machen können, trotzdem detektiert werden. Dies stellt eine mögliche Erklärung der Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Immunhistochemie

und des Western Blots im Hypothalamus dar, der keine gesteigerte NF-IL6-Expression zeigte (Abb. 55, S. 150). Während somit die immunhistochemischen Untersuchungen funktional auf eine LPS-induzierte *de novo* Synthese von NF-IL6 mit anschließender Akkumulation im Nukleus hinweisen, könnte die im Western Blot nicht belegte Expressionssteigerung des Proteins dennoch auf eine Bedeutung der nukleären Translokation vorliegender NF-IL6-Proteine infolge LPS-Stimulation hindeuten, welche nur außerhalb des Zellkerns immunhistochemisch kaum detektierbar wären.

1.2. NF-IL6-Aktivität und charakteristische Krankheitssymptome bzw. Plasmakonzentrationen bioaktiver Zytokine im Zeitverlauf

Ein Zusammenhang der räumlichen und zeitlichen Aktivierungsmuster von NF-IL6 im Gehirn mit der Entstehung, dem maximalen Auftreten oder dem Abklingen LPS-induzierter Krankheitssymptome erschließt sich aus der Korrelation dieser Parameter. Das Auftreten von Zytokinen im Blutkreislauf kann in Relation zur NF-IL6-Aktivität weitere Rückschlüsse auf mögliche funktionale Zusammenhänge ermöglichen.

In beiden Dosierungsgruppen (100 µg- oder 1 mg/kg KM LPS) trat zunächst eine unterschiedlich ausgeprägte, initiale Hypothermie auf, der ein mehr oder weniger deutlich mehrphasiges Fieber folgte (Abb. 37, Abb. 38, Tab. 16; S. 124/125). Neben der Entwicklung von Fieber wird Hypothermie inzwischen ebenfalls als adaptive thermoregulatorische Antwort z.B. auf infektiöse Stimuli verstanden (Romanovsky & Szekely, 1998). Der Nutzen dieser Reaktion liegt vermutlich vor allem im Einsparen von Energie. Der Entstehung dieser Hypothermie liegt eine sog. Dissoziation der Schwellenwerte zugrunde, d.h. die Temperaturschwelle für die Aktivierung von wärmeregulierenden Effektoren (zur Erniedrigung der Körperkerntemperatur) ist zum Einen erhöht, so dass es beispielsweise schon bei niedrigeren Körpertemperaturen zum Wärmeverlust durch periphere Vasodilatation kommt (Romanovsky et al., 1996a). Zum Anderen ist aber die Temperaturschwelle für die Aktivierung von kälteregulierenden Effektoren (zur Wärmeerhaltung) erniedrigt (Baumgartner et al., 1996; Vybiral et al., 1987). Zusätzlich gewinnt die Umgebungstemperatur an Bedeutung für die Entwicklung der Körperkerntemperatur, da thermoregulatorisches Verhalten gegenüber autonomen Effektoren in den Vordergrund rückt (Überblick: Romanovsky 2004). Dadurch erklärt sich die deutliche Abhängigkeit hypothermischer Reaktionen infolge inflammatorischer Vorgänge von der jeweiligen Umgebungstemperatur: Bei neutraler Außentemperatur (30°) reagieren Ratten auf eine niedrige LPS-Dosis (100 µg/kg KM) mit einem polyphasischen Fieber, auf eine hohe (1 mg/kg KM) mit einer kurzen Hypothermie und anschließendem Fieber. Bei subneutraler Temperatur von 22° hingegen reagieren alle diese Tiere mit einer frühen, dosisabhängigen Hypothermie (70 - 90 min), die von einem Abfall des arteriellen Blutdrucks begleitet wird (Steiner et al., 2009). Allgemein ist eine initiale Hypothermie, gefolgt von Fieber, die vorherrschende Antwort bei subneutralen Umgebungstemperaturen (Blanque et al., 1996; Romanovsky et al., 1996), wie sie auch in der vorliegenden Arbeit mit $25 \pm 1^\circ\text{C}$ während der Experimente vorherrschten.

Während PGE₂-vermitteltes Fieber als Reaktion auf hohe LPS-Dosen durch COX2-Hemmer unterdrückt werden kann, scheint die initiale Hypothermie bei subneutraler Außentemperatur zumindest anteilig durch COX1, möglicherweise in Verbindung mit COX2 vermittelt zu sein. Es wurde gezeigt, dass entgegen früherer Annahmen, auch die COX1 im Gehirn induzierbar ist und damit zur dortigen inflammatorischen Antwort beitragen kann (Deininger et al., 2000; Vellucci & Parrott, 1998). Eine vermehrte PGE₂-Synthese findet in dieser Phase im Gehirn nicht statt, so dass eine Beteiligung dieses Prostaglandins an hypothermischen Reaktionen auf LPS-Stimuli nicht wahr-

scheinlich ist (Steiner et al., 2009). Der zugrundeliegende Mechanismus scheint vielmehr auf der Bildung des potentiell kryogenen (also fiebersenkenden) PGD_2 in thermoregulatorischen Zentren zu beruhen (Chan et al., 1997), das ebenfalls über die COX1/2 unter nachfolgender Umwandlung von PGH_2 durch die Prostaglandin D-Synthase, gebildet werden kann (Ueno et al., 2005). Dabei könnte unter anderem auch perivaskulären Makrophagen eine entscheidende Rolle zufallen, welche durch die Synthese antipyretischer Produkte anschließend an eine Stimulation durch Prostaglandine eine reduzierte Thermogenese mit vermitteln (Derijk et al., 1994).

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine NF-IL6-Aktivität zum Zeitpunkt der Hypothermie detektierbar war, ist eine Bedeutung für die Synthese von Kryogenen, z.B. durch perivaskuläre Makrophagen, die hier deutliche NF-IL6-I.R. zeigten, denkbar. Im Dosisvergleich fällt in der vorliegenden Studie diesbezüglich auf, dass eine stark induzierte Expression von COX2 und mPGES, als Kennzeichen einer verstärkten PGE_2 -Synthese, vor allem nach Stimulation (8 Stunden) mit einer hohen LPS-Dosis von 1 mg/kg KM auftrat (Abb. 54, S. 149). Diese zu diesem Zeitpunkt demnach ansteigende PGE_2 -Menge korreliert aber nicht mit einem erhöhten Fieber gegenüber der 10 fach niedriger dosierten Gruppe (Tab. 16, S. 125). Möglicherweise liegt die Erklärung in den zu diesem Zeitpunkt nach Verabreichen der hohen Dosis noch aktiven kryogenen Mechanismen durch z.B. PGH_2 . PGE_2 -Wirkungen könnten so überdeckt oder sogar behindert werden, so dass eine Korrelation seiner Synthese (bzw. der dafür entscheidenden Enzyme COX2 und mPGES) mit der Höhe der Körperkerntemperatur nicht gegeben wäre.

Die Betrachtung des Fieverlaufs nach LPS-Stimulation mit 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM in Verbindung mit der NF-IL6-I.R. zeigt, dass diese ihr Maximum während der Plateauphase des Fiebers erreichte (vgl. Abb. 37, Tab. 16). Während generell für NF- κB und STAT3 nach Applikation von LPS die steigende I.R. vor bzw. parallel zum Anstieg der Fieberkurve auftritt (1 - 2 Stunden für NF- κB ; Nadjar et al., 2003; 3 - 4 Stunden für STAT3, Harre et al., 2002, Rummel et al., 2005a), begann mit dem üblicherweise auftretenden Abfallen der I.R. dieser beiden erst der Anstieg der NF-IL6-I.R. Damit liegt die Vermutung einer zeitlich aufeinander aufbauenden Funktion von NF- κB , STAT3 und NF-IL6 für die Fieberentwicklung nahe. In diesem Sinne könnte nach der vor allem STAT3- (Rummel et al., 2004) und NF- κB -vermittelten (Kozak et al., 2006) Initiation LPS-bedingter Krankheitssymptome, NF-IL6 an deren Aufrechterhaltung oder aber ihrem Rückgang beteiligt sein. Dies steht im Einklang mit der Hypothese von Poli et al., dass STAT3 und NF-IL6 zeitlich aufeinander folgend in Aktion treten, sowie der Beschreibung einer Rolle von NF-IL6 für die späte Phase der APR (Poli et al., 1998; siehe auch S. 47). Auch nach Verabreichung einer höheren LPS-Dosis von 1 mg/kg KM entwickelte sich das Maximum der NF-IL6-I.R. zeitlich parallel zu einer stabilen Phase des Fiebers (Abb. 38, S. 125). Wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde (Steiner et al., 2009; Szekely & Szelenyi, 1979), war in Tieren 24 Stunden nach Behandlung mit der hohen LPS-Dosis im Gegensatz zu Tieren, die mit der niedrigen Dosis behandelt worden waren, die Fieberreaktion noch nicht beendet. Nur diese Tiere wiesen zu diesem Zeitpunkt auch vermehrte NF-IL6-I.R. im Gehirn auf (Abb. 49 S. 140). Daraus erschließt sich ein eindeutiger Zusammenhang der Fieberreaktion mit NF-IL6, wobei die Untersuchung der Dosisabhängigkeit die diesbezügliche, potentielle Rolle von NF-IL6 weiter untermauert. Eine Abhängigkeit der NF-IL6-I.R. von der LPS-Dosis konnte, zumindest nach 8 Stunden, immunhistochemisch in der vorliegenden Studie allerdings nicht dargestellt werden (Abb. 49, S. 140) und entspricht der Beobachtung, dass auch das Fieber zu diesem Zeitpunkt nicht in dosisabhängiger Weise verstärkt wurde. Hingegen zeichnete sich eine LPS-Dosisabhängigkeit vor allem für die Symptome Anorexie und verminderte Futter- bzw. Wasseraufnahme ab (Abb. 40, Abb. 41; S. 128). Beide treten für gewöhnlich bereits früh (2 Stunden bzw. eine Stunde)

nach Applikation von LPS auf (Kent et al., 1996; Plata-Salaman, 1999) und lassen zunächst keine direkten Verbindungen mit der Aktivität von Transkriptionsfaktoren in den untersuchten Hirnregionen zu.

Bezüglich der Detektion der bioaktiven Zytokine TNF α und IL-6 im Plasma als endogene Mediatoren der LPS-induzierten Krankheitssymptome, bestätigte sich der bekannte Zeitverlauf, in dem TNF α bereits sehr früh erhöht ist (60 Minuten), so dass zum ersten Messzeitpunkt nach 4 Stunden in dieser Studie die stärkste Induktionswelle schon vorüber gewesen sein dürfte (Givalois et al., 1994; Kluger, 1991; Long et al., 1990; Roth et al., 1993). IL-6 dagegen zeigte, wie erwartet, eine kontinuierliche Erhöhung der Plasmakonzentration (Cartmell et al., 2000; Roth et al., 1993) und ist damit als möglicher Aktivator von NF-IL6 zu späteren Zeitpunkten von größerer Bedeutung (siehe auch Kap. I., 1.1.4.).

1.3. Mögliche Bedeutung von NF-IL6 für die Expressionsmuster potentieller Zielgene im Gehirn

Die Gene zahlreicher potentieller Mediatoren von Krankheitssymptomen, sind interessanterweise als Zielgene von NF-IL6 bekannt (Kap. I., 3.3.3.1. & 3.3.3.2.), so dass Zusammenhänge zwischen ihrer Induktion und der NF-IL6-Aktivität im Gehirn weitere Hinweise auf die funktionale Bedeutung des Transkriptionsfaktors für diese Krankheitssymptome liefern können. Bekanntermaßen werden IL-1 β , IL-6, IL-10, COX2 oder mPGES, die unter anderem als Zielgene von NF-IL6 in Frage kommen, durch LPS-Stimulation auf mRNA-Ebene induziert (Rivest, 2003). Die frühe Induktion der mRNA für TNF α , IL-1 β und IL-6, die normalerweise bereits 6 Stunden nach der LPS-Stimulation wieder zurückgeht (Dantzer, 2001), konnte auch in der vorliegenden Studie für den Hypothalamus gezeigt werden (Abb. 53, S. 148): Die Zytokin-mRNA zeigte zum frühesten analysierten Zeitpunkt von 4 Stunden nach dem Stimulus ihre maximale Expression. IL-10 und IL-1 β waren auch zu späteren Zeitpunkten noch deutlich induziert, was mit deren Bedeutung vor allem in späten Phasen inflammatorischer Reaktionen im Einklang stehen könnte (IL-10: Durez et al., 1993; Wang et al., 2001 bzw. IL-1 β : Edamitsu et al., 1995; May et al., 1991).

Die Darstellung der mRNA-Induktion von COX2 und mPGES als Schlüsselenzyme für die Synthese des wichtigen inflammatorischen Mediators PGE₂ bietet eine Möglichkeit, dessen Bedeutung zu analysieren, da PGE₂ selbst aufgrund schneller Freisetzung, niedriger zellulärer Konzentrationen und geringer Halbwertszeit immunhistochemisch nur schwer nachweisbar ist (Hamberg & Samuelsson, 1971; Matsumura & Kobayashi, 2004). Die beiden Enzyme sind unter anderem über IL-6 (peripher oder lokalisiert) induzierbar (Rummel et al., 2004; Rummel et al., 2011). Im Fall von COX2 scheint IL-6 dabei in Gehirndothelzellen als Verstärker der durch IL-1 β induzierten und NF- κ B-vermittelten Expression (Nadjar et al., 2005; Konsman et al., 2004) zu fungieren (Rummel et al., 2006, Rummel et al., 2011). Im Zusammenhang mit der möglichen Beteiligung von NF-IL6 an der Expressionssteigerung von COX2 und mPGES ist daher ein IL-6 / NF-IL6-vermittelter Weg denkbar, der vor allem in späteren Phasen der Inflammation von Bedeutung sein könnte, da beide Enzyme unter anderem als bedeutend während dieser späten Zeitpunkte angesehen werden (Kim et al., 2008; Nakano et al., 2007). Die im Rahmen der vorliegenden Studie auffallende, verlängerte Induktion von mPGES, die parallel mit der späten NF-IL6-I.R. auftrat, untermauert diese Hypothese. Eine Bedeutung von NF-IL6 für die PGE₂-Synthese wurde von Uematsu et al. (2002) bereits in peritonealen Makrophagen gezeigt. Dabei wurde eine TLR4 / MyD88 / NF-IL6-abhängige Induktion der mPGES vermutet. Die erstmalig in der vorliegenden Arbeit gezeigte Kolokalisation von NF-IL6-I.R. mit COX2-I.R. in Gefäßstrukturen (Abb. 56, S. 152) ist ein zusätzlicher, wichtiger

Hinweis darauf, dass NF-IL6 tatsächlich an der COX2-Expression in diesen Zellen beteiligt sein könnte. Eine entsprechende Rolle von NF-IL6 neben der diesbezüglichen Bedeutung von NF- κ B (Nadjar et al., 2005) wurde bereits postuliert (Kirtikara et al., 2000). Das relativ späte Auftreten NF-IL6 / COX2-doppelmarkierter Zellen (4 Stunden nach dem Stimulus) weist auf eine zeitabhängige Bedeutung verschiedener Transkriptionsfaktoren für die Initiation der gleichen Gene hin, da eine entsprechende Doppelmarkierung COX2-positiver Zellen mit NF- κ B bzw. phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3) bereits nach 2 Stunden möglich ist (Rummel et al., 2006).

Die Steigerung der Expression von I κ B α und SOCS3 als endogene, negative Regulatoren NF- κ B- bzw. STAT3-vermittelter Signalwege, stellt einen indirekte Marker der Aktivierung dieser Signalwege dar (Kap. I., 2.5.1.2.). Zum Zeitpunkt 4 Stunden trat in der vorliegenden Arbeit eine mRNA-Induktion von I κ B α und SOCS3 auf. Dies steht zeitlich mit der bereits deutlich verminderten Aktivierung NF- κ B- und STAT3-vermittelter Signalwege zu diesem Zeitpunkt (Harre et al., 2002; Nadjar et al., 2003; Rummel et al., 2005a) im Einklang. Die Expression der NF-IL6-mRNA selbst wies in dieser Studie ebenfalls nach 4 Stunden ihr Maximum auf, was im Hinblick auf die hier festgestellte, vermehrte Proteinexpression nach 6 - 8 Stunden folgerichtig erscheint.

Die Bedeutung des negativen Regulators von NF-IL6, Trib1, als mögliches Stoppsignal der NF-IL6-Aktivierung wird durch dessen vermehrte Expression, die sich, parallel zur Abschwächung der NF-IL6-I.R. und dem beginnenden Abklingen des Fiebers, 10 Stunden nach LPS-Stimulation am deutlichsten zeigt, untermauert. Untersuchungen zur verstärkten Trib1-Expression nach Behandlung mit IL-1 β in Endothelzell- und Makrophagen-Linien (Sung et al., 2006) lieferten bereits wichtige Hinweise auf eine Funktion des Proteins als negativer Regulator von NF-IL6-Aktionen auch im Säuger. Auch die Bedeutung der NF-IL6-Aktivität für die Expression bestimmter Zielgene kann anhand einer Hemmung durch Trib1 eingegrenzt werden. So legen Ergebnisse von Yamamoto et al. (2007), die eine unterdrückte Expression der NF-IL6-Zielgene mPGES und IL-10 in Trib1-überexprimierenden Zellen beschrieben, eine Rolle von NF-IL6 als spät aktiviertem Transkriptionsfaktor nahe. Auch in der vorliegenden Studie fielen die deutliche Induktion von Trib1 mit dem Absinken von IL-10 und mPGES zusammen. Ein solches mögliches „Stoppsignal“ NF-IL6-vermittelter Signalwege könnte von großem klinischen Interesse sein, da in Entzündungsprozesse involvierte Mechanismen möglicherweise durch die Unterdrückung der NF-IL6-Aktivität gezielt gehemmt werden könnten. Allerdings sind zur genaueren Eingrenzung eines entsprechenden therapeutischen Potentials von Trib1 weiterführende Studien nötig. Durch eine Überexpression des Proteins (konditionelle „knock-in“ Maus) könnte z.B. die postulierte Rolle von Trib1 als NF-IL6-Inhibitor zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf systemischer Inflammationsprozesse bestätigt werden.

Eine potentielle Bedeutung von NF-IL6 für die Expression der genannten Zielgene ergibt sich neben dem Auftreten zeitlicher Parallelen zwischen NF-IL6-Aktivität und dieser Zielgeninduktion aus dem Verteilungsmuster der Zielgen-mRNA (COX2, mPGES, I κ B α , IL-6, IL-1 β , IL-10) während inflammatorischen Reaktionen. Dieses wurde mittels *in situ* Hybridisierung ermittelt (Lacroix & Rivest, 1998; Laflamme & Rivest, 1999; Vallières & Rivest, 1997; Wong et al., 1997; Yamagata et al., 2001) und deckt sich in seiner Ausprägung weitgehend mit der hier dargestellten Verteilung der NF-IL6-I.R. nach LPS-Stimulation.

Die späte NF-IL6-Aktivierung in der vorliegenden Arbeit stellt einen deutlichen Unterschied zur Funktion von STAT3 und NF- κ B dar, die gemeinhin als Unterstützer der Initiation der zentralnervösen Immunantwort angesehen werden. Unklar bleibt der Stellenwert dieser späten NF-IL6-Aktivierung, die zum Einen lediglich eine Modulation anderer bestehender Mechanismen bedingen,

zum Anderen aber auch als hauptsächlicher Träger dieser Reaktionen fungieren könnte. Ein Modell der zumindest teilweise sukzessiven Induktion durch die drei bedeutenden Transkriptionsfaktoren wäre denkbar, so dass die Expressionssteigerung pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren von NF- κ B, STAT3 und NF-IL6 in chronologischer Reihenfolge initiiert werden könnte. Die Bedeutung einzelner Transkriptionsfaktoren für bestimmte Zielgene wäre dabei, gemäß ihres zeitlichen Auftretens, für verschiedene Inflammationsmodelle variabel. Dabei könnten sich auch Interaktionen zwischen diesen Transkriptionsfaktoren, welche für zahlreiche Zielgene beschrieben wurden (siehe auch Kap. I., 3.2.3.), in erheblichem Maße auswirken. So ist die synergistische Aktivierung der Transkription von IL-6 durch NF- κ B und NF-IL6 bekannt (Billack et al., 2002; Matsusaka et al., 1993), ebenso die unterstützende Funktion von STAT3 auf die NF-IL6-Transkription (Niehof et al., 2001) oder eine von NF-IL6 getragene Kontrolle der NF- κ B-Aktivität über die Inhibition von I κ B α (Cappello et al., 2009).

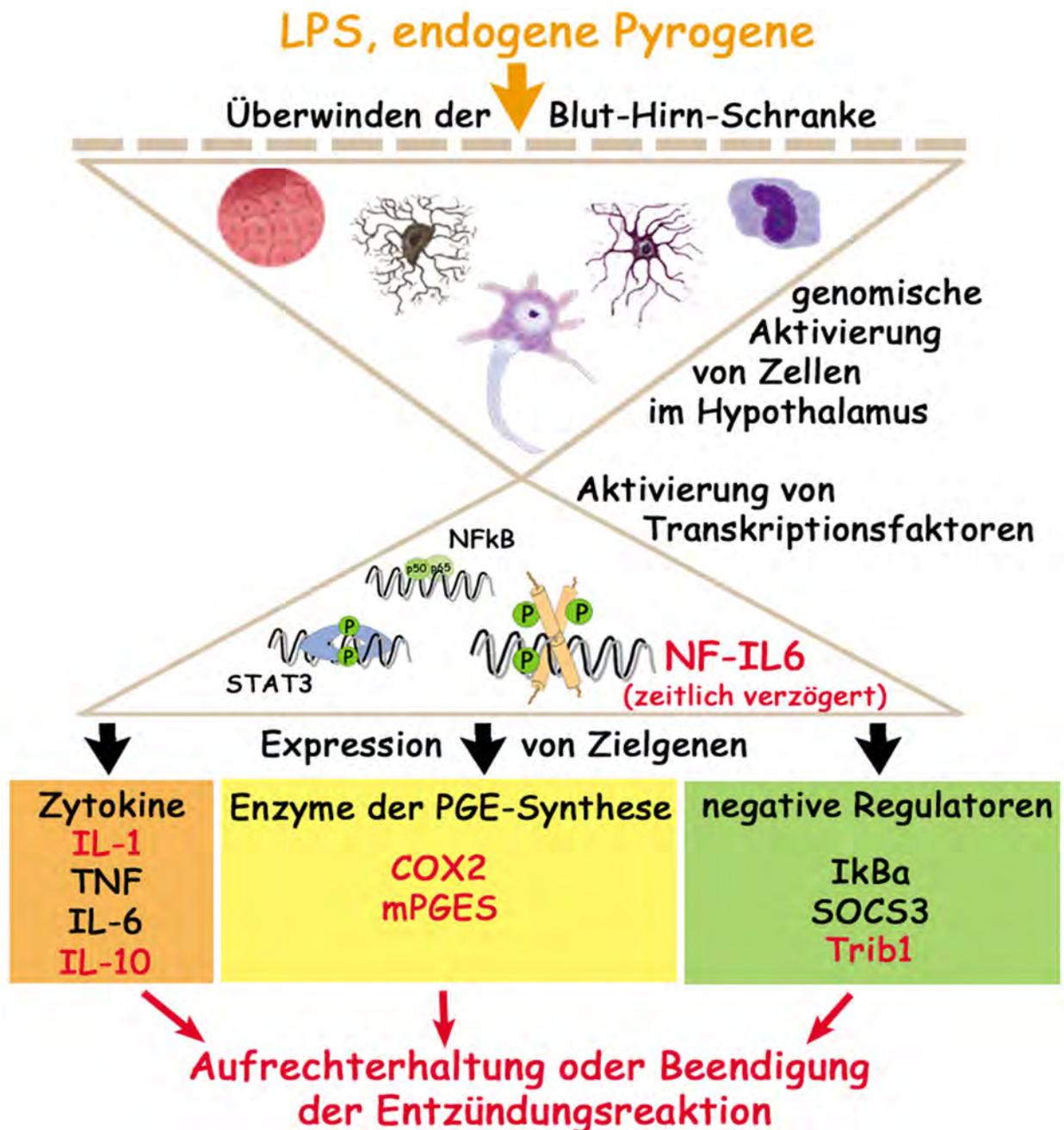


Abb. 96: Schematische Darstellung potentieller NF-IL6-Funktionen

Aus der ersten Teilstudie der vorliegenden Arbeit ergeben sich zahlreiche Anhaltspunkte bezüglich Funktionen von NF-IL6 innerhalb der involvierten Regelkreise. Diese sind hier rot hervorgehoben (vgl. Abb. 4, S. 31). Das räumlich-zeitliche NF-IL6-Aktivierungsmuster weist auf eine zeitlich verzögerte Rolle des Transkriptionsfaktors im Verlauf systemischer Inflammationen hin. Außerdem zeigte auch die verlängerte Expression potentieller Zielgene wie IL-1 β , IL-10 und mPGES zeitliche Parallelen mit dem verstärkten Auftreten von NF-IL6-I.R. im Hypothalamus. Die späte Kolo-kalisation von COX2- mit NF-IL6-I.R. weist auf die Bedeutung von NF-IL6 für dieses Zielgen hin. Von besonderem Interesse ist die erstmalige Beschreibung der späten Induktion von Trib1 im Verlauf systemischer Inflammationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Dieses könnte als potentielles „Stopp-signal“ NF-IL6-vermittelter Reaktionen von Bedeutung sein. Generell kommt anhand der Ergebnisse der ersten Teilstudie eine Rolle von NF-IL6 sowohl für die Aufrechterhaltung als auch für die Beendigung der inflammatorischen Antwort in Frage.

2. Mögliche Bedeutung von NF-IL6 im Verlauf zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome

Um die tatsächliche Bedeutung von NF-IL6 bzw. seiner Aktivierung für die Ausprägung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome näher betrachten zu können und Aussagen über dessen Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und STAT3 treffen zu können, sind Inhibitionsstrategien einzelner Signalwege oder deren Einzelkomponenten eine geeignete Methode. In den Teilstudien 2 und 3 der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf direkt im Gehirn auftretenden Wirkungen von NF-IL6, vor allem in Verbindung mit STAT3, weshalb eine zentrale Aktivierungshemmung eines oder beider Transkriptionsfaktoren durch intracerebroventrikuläre Inhibitionsstrategien angestrebt wurde (vgl. Kap. I., 4.2. & 4.3.).

2.1. NF-IL6 als Aktivierungsmarker im Gehirn nach traumatischen Läsionen

Die vergleichende Betrachtung der NF-IL6-I.R. nach unterschiedlicher Behandlung in der zweiten und dritten Teilstudie zeigte, dass die invasive Methode der intracerebroventrikulären Implantation einer Injektionskanüle (eine Woche nach Implantation) bzw. die Verabreichung eines Bolus von 2 μ l (verschiedene Zeitpunkte: 9-, 25-, 28-, 48 Stunden später) die basale Menge an NF-IL6-Signalen vermehren kann (Abb. 66, S. 168; Abb. 94, S. 204; eine entsprechende konstitutive STAT3-Expression aufgrund implantierter Kanülen war in vorangegangenen Studien nicht aufgetreten; Hübschle et al., 2001). So fand sich zum Einen auch in Gehirnen von Tieren, denen lediglich das jeweilige Lösungsmittel in den rechten Lateralventrikel injiziert worden war, eine deutlich erhöhte NF-IL6-I.R., verglichen mit denen der ersten Teilstudie, die ausschließlich intraperitoneal behandelt worden waren (Abb. 46, S. 135). Zum Anderen gab es deutliche Unterschiede in der NF-IL6-I.R. zwischen der von der Injektion betroffenen und der kontralateralen Hemisphäre (Abb. 70, S. 172). Dabei konnte auch eine direkte lokale Assoziation der Signale mit der Implantationsstelle festgestellt werden (Abb. 80, S. 185): Eine Akkumulation NF-IL6-positiver Zellen um den Stichkanal und den betroffenen Ventrikel herum legen eine Rolle dieses Transkriptionsfaktors im Rahmen der Reaktionen auf traumatische Hirnläsionen nahe. Die immunhistochemische Beurteilung einer möglicherweise eingetretenen Hemmung der NF-IL6-Aktivität durch die verwendeten Inhibitionsstrategien in der vorliegenden Arbeit wurde dadurch in den entsprechenden Gehirnaearen erschwert. Dennoch ließen eindeutige Unterschiede in der NF-IL6-I.R. zwischen LPS-stimulierten und Kontrolltieren eine bewertende Analyse zu.

2.1.1. Einflüsse der NF-IL6-Aktivität auf die Entstehung von Hirnschädigungen

Die Funktion von NF-IL6 für die Entwicklung von Hirnschädigungen wird kontrovers diskutiert, so dass sowohl ein neuroprotektives als auch ein neurotoxisches Potential denkbar wären. Für eine schützende Wirkung von NF-IL6 gegenüber Hirnschädigungen sprechen beispielsweise Ergebnisse von Halterman et al. (2008), die in kortikalen Neuronen nach hypoxischer Schädigung bei verminderter NF-IL6-Aktivität eine vermehrte „pathologische“ Transkription feststellten, die letztlich zur Apoptose dieser Neurone führte. Außerdem scheint nach axonalen Verletzungen NF-IL6 maßgeblich an der Expression regenerationsassoziiierter Proteine beteiligt zu sein. Dies wurde anhand einer gehemmten Regeneration in NF-IL6-defizienten Tieren, sowie der Induktion von NF-IL6-mRNA und phosphoryliertem Protein in den Nervensträngen von Wildtyp-Tieren nach einer derartigen Schädigung festgestellt (Nadeau et al., 2005). Im Gegensatz zu diesen Hinweisen auf eine neuroprotektive Bedeutung von NF-IL6, wurde die Induktion der pro-inflammatorischen COX2 im Rahmen neuronaler Verletzungen mit einer vermehrten NF-IL6-Expression in Zusammenhang

gebracht (Cortes-Canteli et al., 2004). Außerdem gibt es Anhaltspunkte für eine positive Regulation des proteolytischen Enzyms TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)-1 durch NF-IL6. TIMP-1 wird nach axonalen Verletzungen von Astrozyten ausgeschüttet und zeigt sich bei neuroinflammatorischen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder HIV-Enzephalitis erhöht (Fields et al., 2011). Kapadia et al. (2006) stellten sogar eine Potenzierung hypoxischer Hirnschäden durch NF-IL6 fest. Die erhöhte NF-IL6-Expression wurde in dieser Studie mit der Infarktgröße, dem Schweregrad postischämischer Entzündungsreaktionen und dem Verlust neuroglialer Zellen in Zusammenhang gebracht, da diese Parameter in NF-IL6-defizienten Tieren in deutlich verringertem Maße auftraten. Auch schienen in diesen Tieren geringere Mengen an Entzündungszellen ins betroffene Gebiet einzuwandern. Excitotoxische Hirnschädigungen durch Glutamat oder Kaininsäure (KA) bedingten in einer anderen Untersuchung ebenfalls eine erhöhte NF-IL6-Expression. Defiziente Tiere wiesen weniger gravierende Zellverluste im Hippocampus auf und die Expression inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β und COX2 waren in primären glialen Kulturen deutlich reduziert (Cortes-Canteli et al., 2008; Oprica et al., 2003). Welche Rolle die beobachtete Induktion der NF-IL6-I.R. im Einstichbereich in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Regeneration des betroffenen Gewebes spielte, konnte aufgrund des Versuchsaufbaus nicht näher untersucht werden. Die lokalen Effekte der Implantation bzw. ihre möglichen lokalen, oder sogar systemischen Auswirkungen werden aber bei der Betrachtung inflammatorischer Reaktionen auf periphere Stimuli im weiteren Verlauf der Diskussion berücksichtigt.

2.1.2. Auswirkungen mechanischer Traumata auf inflammatorische Reaktionen im Gehirn

Dass mechanische Traumata, wie sie durch die Implantation einer Injektionskanüle unweigerlich entstehen, eine lokale inflammatorische Reaktion im umliegenden Hirngewebe verursachen, ist bekannt. Die Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine innerhalb des Gehirns steigen dabei zum Teil deutlich an. Woodrooffe et al. (1991) stellten in den ersten 7 Tagen nach einer Läsion per Mikrodialyse einen frühen Anstieg von IL-6 und IL-1 β im Interstitium fest, was sich auch in einer anderen Läsionsstudie für IL-1 β , TNF α und IL-6 bestätigte (Kyrkanides et al., 2001). Als Quelle dieser Zytokine kommen vor allem Mikrogliazellen und eingewanderte Makrophagen, aber auch Astrozyten und Neuronen in Frage (Dinarello, 1994; Kyrkanides et al., 2001; Spulber & Schulzberg, 2010; Woodrooffe et al., 1991). Für Mikrogliazellen ist eine direkte Aktivierung durch Verletzungen möglich (Giulian et al., 1988), nachfolgende Produktion pro-inflammatorischer Zytokine ist möglicherweise für eine spätere Aktivierung von z.B. Astrozyten verantwortlich. Diese Kaskade belegen z.B. der Anstieg der I.R. aktivierter Mikrogliazellen und des Astrozytenmarkers GFAP nach entsprechenden Läsionen. Ein Übertritt dieser Zytokine in die Cerebrospinalflüssigkeit scheint zumindest in geringen Mengen stattzufinden, so dass auch andere Hirnareale beeinflusst werden könnten (Kyrkanides et al., 2001; Woodrooffe et al., 1991). Eine Folge der lokalen Effekte durch diese Hirntraumata kann unter anderem auch die Erhöhung der Körperkerntemperatur sein. Quan & Blatteis (1989) gehen dabei von einem PGE₂-vermittelten Mechanismus aus. Sie zeigten, dass die vorhergehende Verabreichung eines COX-Hemmers einen Temperaturanstieg, der schon allein durch die intracerebroventrikuläre Applikation von pyrogenfreier Saline in Meerschweinchen auftrat, verhindern konnte. COX1-positive aktivierte Mikrogliazellen traten nach Stichverletzungen des Gehirns innerhalb der ersten Woche im betroffenen Gebiet, verbunden mit einer COX1-Induktion in umgebenden Gefäßen auf (Schwab et al., 2001). Auch Thompson et al. (2005) zeigten eine posttraumatische Hyperthermie für einen Anteil betroffener Tiere, die außerdem vermehrt IL-1 β -exprimierende Makrophagen und aktivierte Mikrogliazellen im PVN aufwiesen. Einwirkungen auf

Entzündungsparameter in der Peripherie (wie C-reaktives Protein) konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit deutlich durch das lokale Trauma der Implantation der Injektionskanüle induzierbare NF-IL6-I.R. weist neben der diskutierten Rolle dieses Transkriptionsfaktors für die Entwicklung von Hirnläsionen (Kap. IV., 2.1.1.) auch zusätzlich auf seine Bedeutung für die daraufhin steigende Expression pro-inflammatorischer Zytokine im betroffenen Bereich (IL-1 β , TNF α und IL-6), sowie die Entstehung der damit assoziierten Krankheitssymptome, vornehmlich Fieber, hin. Somit wird durch diesen zusätzlichen Befund der Arbeit die Hypothese einer essentiellen Rolle von NF-IL6 im Gehirn im Verlauf von Inflammationsreaktionen auch auf lokaler Ebene unterstützt.

2.1.3. Auswirkungen läsionsbedingter Effekte auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Zusammengefasst bieten die Erkenntnisse aus Kap. IV., 2.1.1. & 2.1.2. eine wichtige Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse aus den Teilstudien 2 und 3 der vorliegenden Arbeit. Einige der vorgestellten Ergebnisse sprechen für eine Einflussnahme der beschriebenen, posttraumatischen Reaktionen auf die Expression inflammatorischer Mediatoren im Gehirn einerseits und den Verlauf der LPS-bedingten Krankheitssymptome andererseits (Kap. IV., 2.1.6., 2.1.7., 2.2.). Dabei kommen ursächlich Auswirkungen des zum Versuchszeitpunkt etwa eine Woche zurückliegenden operativen Eingriffs (Kap. II.A., 2.; Abb. 16) und direkte Reaktionen auf das Einbringen des Bolus in den Lateralventrikel in Frage. So zeigte sich z.B. in Gehirnen von Kontrolltieren, die 48 Stunden vor der Untersuchung eine i.c.v. Injektion erhalten hatten, eine geringere NF-IL6-I.R. (Abb. 95, S. 205) als in solchen, bei denen diese Injektion erst 9 Stunden zurücklag (Abb. 66, S. 168). Direkte Auswirkungen der Injektion wurden in diesen Studien auch z.B. anhand der Formveränderung des betroffenen Ventrikels aufgrund der Ausdehnung nach der Injektion erkennbar (Abb. 71, S. 173). Das vermehrte Auftreten von NF-IL6-Signalen im Bereich der Hirnhäute (Abb. 66, 95) weist auf ein mögliches Einwandern von Entzündungszellen in das Gebiet der Läsion hin. Die deutliche basale Induktion der NF-IL6-I.R. vor allem in Mikrogliazellen *in vitro*, welche nicht unmittelbar auf eine LPS-Stimulation zurückzuführen ist (Abb. 76, S. 179), unterstreicht die Bedeutung dieser Zellen als Sensoren mechanischer Beeinflussung im Gehirn, da scheinbar der kontinuierliche Wechsel des Kulturmediums allein zur Aktivierung der Zellen und erhöhten NF-IL6-Aktivität führen kann. Im Hypothalamus i.c.v.-behandelter Tiere trat, im direkten Vergleich zur ersten Teilstudie ohne implantierte Kanüle, eine erhöhte Expression der mPGES-mRNA auf (Daten hier nicht gezeigt) und auch für IL-1 β und IL-6 bestand ein entsprechender Trend. Folglich ist eine erhöhte Bildung dieser pro-inflammatorischen Mediatoren aufgrund der Implantation der Kanüle bzw. der Injektionsmethode anzunehmen. Die fehlende IL-1 β -Induktion in LPS-behandelten Gruppen gegenüber Kontrollgruppen in der zweiten im Gegensatz zur ersten Teilstudie (Abb. 53, S. 148; Abb. 54, S. 149; Abb. 73, S. 176) spricht ebenfalls für eine bereits vor der i.p.-Injektion erhöhte, basale Expression in allen i.c.v.-behandelten Tieren, welche wahrscheinlich den induzierenden Effekt von LPS verschleiert hat. Für TNF α und IL-6 ist dies aufgrund des späten Zeitpunkts von 8 Stunden, zu dem nach alleiniger LPS-Behandlung ebenfalls keine Induktion mehr vorgelegen hatte (Abb. 53, 54), nicht eindeutig festzustellen. Eine Hyperthermie als mögliche direkte Folge der i.c.v. Injektion wurde in der dritten Teilstudie deutlich (Abb. 84, S.189), in der Einzeltiere aus allen Behandlungsgruppen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion z.T. mit einer deutlichen Erhöhung der Körperkerntemperatur reagierten. Ein möglicherweise analog dazu aufgetretener Effekt war nach der i.c.v. Injektion eine Stunde vor der LPS-Behandlung im Rahmen der zweiten Teilstudie

erkennbar (Abb. 57 B, S. 155): Bei diesen Tieren fehlte die initiale Hypothermie, die in der ersten Teilstudie beobachtet worden war (Abb. 37, S. 124), was durch eine mögliche Überlagerung von zwei unabhängigen, aufeinander folgenden Temperaturanstiegen erklärbar wäre. In vorangegangenen Studien hatte entsprechend die intracerebroventrikuläre Injektion von pyrogenfreiem PBS eine etwa einstündige Temperaturerhöhung verursacht, die bei anschließender Injektion von IL-6 direkt in ein charakteristisches Fieber übergegangen war (Hübschle et al., 2001).

Auch systemische Auswirkungen dieser zentralen Effekte der durch die Implantation entstehenden Läsion sind denkbar. So könnten Inflammationssignale, sprich Zytokine, aus dem traumatisch veränderten Gewebe in die Peripherie übertragen werden. Entsprechend lösten Jiang et al. (2008) durch eine Übertragung von Plasma aus Tieren, die eine zentrale Inflammation infolge ZNS-Läsionen aufwiesen, in Empfängertieren Fieber und „sickness-behavior“ aus. Es wurde eine entscheidende Rolle der Leber für die Entwicklung dieser akuten, systemischen Zytokinantwort angenommen. Unterstützt wird diese These durch die Arbeit von Wilcockson et al. (2002), die nach zentraler IL-1 β -Injektion eine Hochregulation von APP aus der Leber beobachteten. Eine Konzentrationserhöhung des Chemokins CINC-1 (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1) in Serum und Leber, aufgrund fokaler Inflammationen im Gehirn, wurde von Campbell et al. (2003) gezeigt, so dass auf dieses Signal hin rekrutierte Neutrophile Granulozyten ebenfalls als Überträger zentraler Inflammationssignale in die Peripherie in Frage kommen. Außerdem konnte ein direkter Übertritt pro-inflammatorischer Zytokine aus den Ventrikeln über die Cerebrospinalflüssigkeit ins Blut nachgewiesen werden (Banks et al., 1991; Chen et al., 1997). Für IL-6 wurde in der vorliegenden Studie keine grundsätzliche Erhöhung der Konzentration im Plasma zum Zeitpunkt 8 Stunden nach den intraperitonealen Injektionen (bzw. 9 Stunden nach den i.c.v. Injektionen) festgestellt (Abb. 64, 165). Eine Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine im Allgemeinen zu früheren Zeitpunkten oder während der Rekonvaleszenzphase im Anschluss an die Implantation der Kanüle, die auf systemische Effekte der LPS-Injektionen Einfluss genommen haben könnte, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

2.1.4. Mögliche Bedeutung JAK2-vermittelter Signalwege für die Entwicklung und Ausprägung charakteristischer Krankheitssymptome

2.1.5. Fördernde sowie hemmende Wirkungen von AG490 auf LPS-induzierte Krankheitssymptome

Die Vorbehandlung mit dem JAK2-Inhibitor AG490 bewirkte in der vorliegenden Arbeit teilweise dissoziierende Veränderungen LPS-induzierter Krankheitssymptome. Dabei zeichnete sich zunächst in AG490-vorbehandelten Tieren nach der LPS-Injektion eine stärkere Fieberreaktion mit früherem Beginn und höherem Temperaturplateau ab (Kap. III.B., 1.1.1.). Auch der Fieberindex, also die Fläche unterhalb der Fieberkurve auf Basis der mittleren Ausgangstemperatur, erreichte in den 10 Stunden im Anschluss an die Injektion signifikant höhere Ausmaße (Abb. 59, S. 157). Während die Anorexie, gemessen an der Futteraufnahme im Versuchszeitraum, durch AG490 nicht beeinflusst wurde, konnte eine verminderte Adipsie festgestellt werden (Abb. 62, S. 162). In der nächtlichen Aktivitätsphase der Tiere glich sich die direkt nach LPS-Injektion in beiden Gruppen deutlich verringerte Wasseraufnahme in der AG490-vorbehandelten Gruppe der Kontrollgruppen an. Folglich wurde die Adipsie nach LPS-Stimulation durch AG490 Vorbehandlung nicht nur verringert, sondern auch zeitlich verkürzt. Innerhalb von 24 Stunden nahmen die Tiere dieser Gruppe außerdem weniger an Körpermasse ab. Mit der Lethargie bzw. verminderten lokomotorischen Aktivität verringerte sich außerdem eine weitere Komponente des „sickness-behavior“ durch

Behandlung mit AG490: LPS-stimulierte Tiere zeigten im Versuchszeitraum von 24 Stunden gegenüber den Kontrollen keine signifikante Aktivitätsminderung mehr (Abb. 60 C, S. 159), wobei dieser Effekt vor allem in der frühen Phase nach der Injektion (3 - 10 Stunden) deutlich wurde (Abb. 60 A).

Es traten also durch die intracerebroventrikuläre Verabreichung des JAK2-Inhibitors Steigerungen (Fieber) sowie Verminderungen (Adipsie, Aktivität) LPS-induzierter, zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome auf – eine zunächst unerwartete Beobachtung. Daraus ergeben sich für den JAK2-vermittelten Signalweg, bzw. die damit verbundenen NF-IL6- und STAT3-Aktivierungen, verschiedene Möglichkeiten ihrer funktionellen Bedeutung.

2.1.6. Dissoziierende Einflüsse inflammatorischer Mediatoren auf Komponenten des „sickness-behavior“

Die Dissoziation verschiedener Komponenten des „sickness-behavior“, wie sie in der vorliegenden Studie auftrat, ist ein schon in der Vergangenheit des Öfteren beobachtetes Phänomen. Dass diese Komponenten über unterschiedliche Signalwege und auf z.T. unterschiedlichen Regelkreisen basierend reguliert werden, wurde bereits auf vielen Ebenen untersucht. Kent et al. (1992) beschrieben die dissoziierende Vermittlung von Fieber, Anorexie und Verhaltensdepression über IL-1-Signalwege anhand von Hemmungsstudien mit dem endogenen IL-1 Rezeptor Antagonisten IL-1ra. Daraus ergab sich, dass zentrale Wirkungen von IL-1 β , die über IL-1-Rezeptoren im Gehirn vermittelt werden, vor allem für die Entstehung von Lethargie und z.T. Anorexie, nicht aber von Fieber von Bedeutung sind, während die Neutralisierung von peripher appliziertem IL-1 β das gesamte Spektrum des „sickness-behavior“ hemmen kann (Dantzer, 2001; Kent et al., 1992). Der Verlust an Körpermasse aufgrund IL-1 β -Einwirkungen kann wiederum ebenfalls über zentrale Hemmung des Zytokins durch IL-1ra unterdrückt werden. Dieser Verlust an Körpermasse scheint grundsätzlich vor allem aufgrund der Anorexie, Adipsie und der vermehrten Thermogenese zu entstehen (Bluthe et al., 1995). Für die IL-1 β -bedingte Fieberentstehung kommen ursächlich vor allem über sekundäre Mediatoren (wie Prostaglandine) vermittelte Mechanismen in Frage, während die verminderte Futteraufnahme z.T. in der Peripherie direkt über Wirkungen von IL-1 β auf den Gastrointestinaltrakt vermittelt werden kann (Robert et al., 1991). Allgemein geht man davon aus, dass das Sozialverhalten hauptsächlich zentral und das Futterverhalten vorwiegend peripher reguliert wird. So zeigen z.B. MyD88-defiziente Tiere, trotz allgemein verminderter Krankheitssymptome, einen unveränderten Verlust an Körpermasse infolge LPS-Stimulation, was darauf zurückzuführen ist, dass die periphere Immunantwort MyD88-unabhängig ist, während zentrale Effekte von LPS und IL-1 β durch eine entsprechende Defizienz gehemmt werden (Ogimoto et al., 2006).

Auch über zentrales IL-6 vermittelte Signalwege sind an dissoziierenden Komponenten des „sickness-behavior“ beteiligt. So konnten nach i.c.v. Verabreichung des Zytokins zwar eine verminderte „freiwillige“ Aktivität (im Sinne eines Laufradtrainings), sowie eine Temperaturerhöhung, nicht aber eine verminderte Futteraufnahme festgestellt werden (Harden et al., 2008; Lenczowski et al., 1999). Kombination von IL-6 mit IL-1 β (i.c.v.), in Dosen, die allein jeweils keine Effekte hervorriefen, bewirkte wiederum Fieber, Lethargie und Anorexie (Harden et al., 2008). Die Neutralisierung von IL-6 in der Peripherie konnte LPS-bedingtes Fieber komplett, die Anorexie aber nur partiell hemmen (Harden et al., 2011), so dass für dieses Symptom wiederum das Zusammenwirken verschiedener Mediatoren deutlich wird. IL-6 scheint potenzierend auf IL-1 β -bedingte Verhaltens-effekte nach LPS-Stimulation zu wirken, was anhand verminderter Reaktionen IL-6-defizienter Tiere

auf LPS- oder IL-1 β -Injektion deutlich wird (Bluthé et al., 2000a; Lenczowski et al., 1999). Vor allem lokomotorische Aktivität und verändertes Sozialverhalten nach systemischer Inflammation werden demnach über einen Synergismus von IL-1 β und IL-6 zentral vermittelt. Somit sind für die dissoziativen Veränderungen charakteristischer Krankheitssymptome, wie sie in der vorliegenden Arbeit nach potentieller Hemmung der JAK2-vermittelten NF-IL6- und STAT3-Aktivierung auftraten, zentral und peripher ablaufende Mechanismen als mögliche Ursachen in Betracht zu ziehen. Die Wichtung der beiden Ebenen kann dabei für die einzelnen Symptome und die verursachenden Mediatoren verschieden ausfallen.

2.1.7. Mögliche Ursachen und Mechanismen veränderter Krankheitssymptome nach Inhibition mit AG490

2.1.7.1. Körperkerntemperatur

Die durch intracerebroventrikuläre Vorbehandlung mit AG490 auffällig verstärkte Fieberreaktion nach peripherer Stimulation mit LPS, könnte direkt mit der Verminderung von zentral wirksamem, bioaktivem IL-10 in Zusammenhang stehen. So fand im Hypothalamus der betroffenen Tiere eine deutlich geringere IL-10-mRNA-Induktion statt als in Tieren, die nur das Lösungsmittel Cremophor® EL erhalten hatten (Abb. 73, S. 176). Dahle et al. (2004) zeigten, dass AG490 in Kupferzellen die IL-10-Induktion nach Stimulation mit Lipoteichonsäure verhindern kann. Eine ausschließlich zentrale Hemmung der IL-10-Synthese durch AG490 erklärt ursächlich die übersteigerte Fieberreaktion bei unveränderten Konzentrationen an aktiven Plasmazytokinen in der vorliegenden Studie. Die Hemmung der IL-10-Synthese durch AG490 könnte unter anderem sekundär durch verminderte TNF α -Konzentrationen in einer früheren Phase als dem untersuchten Zeitpunkt von 8 Stunden vermittelt worden sein. Reduzierte IL-10-Synthese im Zusammenhang mit einer gesteigerten Fieberreaktion wurde von Leon et al. (1998) in TNF α -defizienten Mäusen nachgewiesen.

Generell zeigen IL-10-defiziente Tiere ein stärkeres und verlängertes Fieber nach Stimulation mit moderaten Dosen LPS und eine erhöhte Sterberate bei Verabreichung hoher Dosen (Leon et al., 1999; Nava et al., 1997). Eine Unterdrückung von LPS-bedingtem Fieber durch IL-10 konnte bislang vor allem durch periphere Injektion gezeigt werden, was auf der Reduktion zirkulierender, pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6 beruhen dürfte (de Waal Malefyt et al., 1992; Ledebøer et al., 2000; Ledebøer et al., 2002). Des Weiteren ruft IL-10 die verstärkte Expression von IL-1ra hervor (Bluthé et al., 1999). Tendenziell konnte in der vorliegenden Arbeit eine entsprechende Verminderung der IL-1ra-Expression im Hypothalamus parallel zur Abnahme von IL-10 festgestellt werden (Abb. 73, S. 176). Im Gehirn kann IL-10 zur Unterdrückung zentral verursachter Fieberreaktionen führen und unter anderem die LPS-bedingte IL-1 β -Synthese hemmen (Ledebøer et al., 2002). Intracerebroventrikulär um den Zeitpunkt der peripheren LPS-Stimulation verabreichtes IL-10 erwies sich zudem in einer Studie von Calapai et al., (1997) als fiebersenkend.

Da Makrophagen und dendritische Zellen als Hauptproduzenten und auch Zielzellen von IL-10 gelten (Bogdan et al., 1991; de Waal Malefyt et al., 1991), ist in Bezug auf zentrale IL-10-Wirkungen eine entscheidende Rolle perivaskulärer Makrophagen und aktivierter Mikrogliazellen naheliegend. Mizuno et al. (1994) schrieben Gliazellen im Hypothalamus, als Trägern von IL-10-Rezeptoren, eine wichtige Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit fiel in neuroglialen Zellkulturen eine deutliche NF-IL6-I.R. aktivierter Mikrogliazellen auf (Abb. 51, S. 143; Abb. 77, S. 181). Demnach könnte die Unterdrückung der NF-IL6-Aktivierung in diesen Zellen zur Hemmung der IL-10-Produktion im Gehirn durch AG490 geführt haben. Neben der bekannten IL-10-Induktion

über Wirkungen von NF- κ B (Park et al., 2005; Schottelius et al., 1999; Ward & Lentsch, 2002), können auch andere Transkriptionsfaktoren daran beteiligt sein: Ein über die Aktivierung der ERK ablaufender Weg der IL-10-Induktion (Dillon et al., 2004) weist neben dem Vorhandensein einer entsprechenden Bindungsstelle im IL-10-Promotor (Csóka et al., 2007) auf eine Rolle von NF-IL6 für die IL-10-Produktion hin. In dieser Studie produzierten NF-IL6-defiziente Makrophagen außerdem als Reaktion auf einen Stimulus mit lebenden *E. coli* kein IL-10. So könnte die Inhibition der JAK2 durch AG490 unter anderem über eine verminderte Aktivierung von ERK und NF-IL6 zu den beobachteten erniedrigten IL-10-Konzentrationen und damit der gesteigerten Fieberreaktion geführt haben.

Die Auswirkungen der erniedrigten IL-10-Konzentration im Hypothalamus wurden wahrscheinlich über die Erhöhung der Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine oder aber anderer Mediatoren vermittelt, was letztendlich zur verstärkten Fieberreaktion führte. Eine derartige Reaktion konnte anhand der QRT-PCR für TNF α , IL-1 β und IL-6 zwar nicht bestätigt werden (Abb. 73, S. 176), allerdings ist nicht auszuschließen, dass lokale Effekte im Bereich des Einstichs (Kap. IV., 2.1.3.) diese überdeckt haben könnten. So stellten beispielsweise Konsman et al. (2008) eine vermehrte IL-1 β -Synthese in der Umgebung einer das *Corpus callosum* durchstechenden Kanüle fest, was sich in der vorliegenden Studie entsprechend in allen Tiergruppen manifestiert haben könnte und so potentielle Geninduktionen, wie sie zumindest tendenziell für IL-6 erkennbar sind, verschleiert haben könnte. Für Auswirkungen der erniedrigten IL-10-Produktion im Hypothalamus auf die IL-6-Synthese sprechen außerdem Ergebnisse von Leon et al. (1999), die in IL-10-defizienten Mäusen zum Zeitpunkt 4 Stunden nach inflammatorischer Stimulation eine erhöhte IL-6-Plasmakonzentration feststellten. So ist in der vorliegenden Studie eine vor dem untersuchten Zeitpunkt auftretende IL-6-Induktion denkbar, die für die frühe Induktion der verstärkten Fieberreaktion verantwortlich gewesen sein könnte. Auch eine gesteigerte Produktion von PGE₂, als wichtigem Mediator der Fieberentstehung nach intracerebroventrikulärer Behandlung mit AG490 könnte mit der übersteigerten Fieberreaktion in Zusammenhang stehen. Zum Zeitpunkt der verminderten IL-10-Expression im Hypothalamus AG490-vorbehandelter Tiere, fand sich im Vergleich zu Cremophor-vorbehandelten Tieren eine deutliche und signifikant erhöhte Induktion der mPGES, sowie eine tendenziell erhöhte COX2-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 74, S. 177). Da es sich bei mPGES und COX2 um entscheidende Enzyme der Prostaglandinsynthese handelt (Kap. I., 2.4.5.), kann aufgrund der gesteigerten Expression dieser Zielgene von einer vermehrten PGE₂-Synthese ausgegangen werden. Die Steigerung der PGE₂-Konzentration in Zusammenhang mit der verminderten COX2-mRNA-Expression in IL-10-defizienten Mäusen nach Stimulation mit LPS wurde bereits für Zellen der Milz beschrieben (Berg et al., 2001). Niiro et al. (1995) zeigten, dass IL-10 die COX2-Induktion hemmen kann. Eine Reduktion von IL-10, wie in der vorliegenden Studie beobachtet, sollte also mit einer erhöhten Induktion der Gene beider Enzyme einhergehen, was hier zumindest für mPGES auf signifikantem Niveau auch nachgewiesen werden konnte.

Für das Krankheitssymptom Fieber kann anhand der Ergebnisse dieser zweiten Teilstudie die Hypothese unterstützt werden, dass NF-IL6 durch seine vorwiegend späte Aktivierung im Verlauf des inflammatorischen Geschehens an der Aufhebung dieser Reaktion beteiligt ist. Der zugrundeliegende Mechanismus hängt demnach möglicherweise mit einer NF-IL6-bedingten Förderung der IL-10-Synthese und der damit verbundenen Reduktion pro-inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , TNF α , IL-6 und vor allem PGE₂ im Gehirn zusammen. Dabei ist zumindest anteilig ein Zusammenwirken mit STAT3 anzunehmen, da die Inhibition in dieser Studie sich potentiell auf beide Transkriptionsfaktoren erstreckte. Als Vermittler der entsprechenden Reaktionen im Gehirn

sind vor allem Mikrogliazellen und perivaskuläre Makrophagen von Interesse, deren LPS-bedingte NF-IL6-I.R. in der ersten Teilstudie bereits gezeigt worden war.

2.1.7.2. Lokomotorische Aktivität

Die in dieser Studie aufgetretene, verminderte Lethargie scheint in Bezug zur verminderten IL-10-Menge und der oben erwähnten, möglichen Beteiligung von NF-IL6 an diesem Regelkreis zunächst einen widersprüchlichen Befund darzustellen, da nach einer Verminderung der IL-10-Konzentration mit der Steigerung der Lethargie zu rechnen wäre. So wurde in IL-10-defizienten Mäusen nach peripherer Stimulation mit LPS eine Verlängerung der lethargischen Phase festgestellt (Krzyszton et al., 2008). Des Weiteren bestanden bei diesen Tieren lokomotorische Defizite und ein verschlechtertes lokomotorisches Lernverhalten in Verbindung mit vorhergehender LPS-Stimulation. Verminderte soziale Interaktionen und Immobilität nach systemischer Gabe von LPS wurden durch zentral verabreichtes IL-10 aufgehoben (Bluthe et al., 1999). Dies zeigte sich am deutlichsten, wenn die intracerebroventrikuläre IL-10-Injektion 15 Minuten vor einer intraperitonealen LPS-Stimulation erfolgte (Calapai et al., 1997). In der vorliegenden Studie muss allerdings von einer Reduktion der hypothalamischen IL-10-Menge zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt ausgegangen werden, da nach 8 Stunden (noch) eine signifikante Reduktion der IL-10-mRNA vorlag. Daher stehen die Effekte der AG490-Vorbehandlung auf die LPS-bedingt verringerte lokomotorische Aktivität, die in dieser zweiten Teilstudie vor allem in der frühen Phase nach der Stimulation auftraten, vermutlich nicht in direktem Zusammenhang mit der verminderten IL-10-Konzentration. Genaue Ursachen für diese Diskrepanzen zu vorangegangenen Studien sind nicht klar. Somit sind zukünftige Untersuchungen zur Wirkung von AG490 auf die IL-10-Expression auch auf Protein – zusätzlich zur mRNA-Ebene – sicher sinnvoll.

Generell kommen vor allem für frühe Auswirkungen auf die LPS-bedingte Verhaltensdepression ursächlich auch andere Zytokine in Frage. So beruht die LPS-bedingte Verhaltensdepression zumindest teilweise auf einer synergistischen Wirkung von TNF α und IL-1 β (Bluthé et al., 2000): Mikroinjektionen von IL-1 β in den anterioren Hypothalamus können direkt Verhaltensdepressionen auslösen (Anforth et al., 1998; Roth et al., 1998), was durch periphere Neutralisierungsstrategien von TNF α (Jiang et al., 2008) oder zentrale Inhibition von IL-1 β durch IL-1ra (Dantzer, 2001) gehemmt werden kann. Direkte Aktivierung von Neuronen durch IL-1 β findet unter anderem in der basolateralen *Amygdala* bzw. dem BST statt, was für die depressiven Wirkungen von IL-1 β auf Aktivität und Verhalten verantwortlich gemacht wird (Dantzer, 2001; Konsman et al., 2008). Eine geringere IL-1 β -Konzentration im Gehirn könnte somit für die beobachtete, verminderte Lethargie von Bedeutung sein, was Burgess et al. (1998) für LPS-Effekte durch zentrale, nicht aber periphere Verabreichung zeigten. Eine weitreichende Distribution der Inhibitorlösung im Gehirn könnte in der vorliegenden Arbeit die direkte neuronale Aktivierung durch IL-1 β in den entsprechenden Regionen verhindert haben. Vereker et al. (2000) betonten die Bedeutung MAPK-vermittelter Wege für die Vermittlung IL-1 β -bedingter neuronaler Effekte, wie beispielsweise die gestörte Entwicklung des Langzeitgedächtnisses, was indirekt auf eine Bedeutung von NF-IL6 als „downstream“ Effektor von MAPK hinweist.

Auch TNF α kann direkt verminderte soziale Interaktion und Immobilität induzieren (Palin et al. 2008). Neben TNF α spielt IL-6 in Zusammenarbeit mit IL-1 β eine zentrale Rolle für die Beeinflussung der Aktivität während systemischer Inflammationen. Harden et al. (2011) stellten dabei die Bedeutung des Zusammenspiels von zentral wirksamem IL-1 β und peripher gebildetem IL-6 fest, die in Bezug auf die Regulation der Lethargie aber auch der Anorexie nach LPS-Stimulation

besteht. In der hier vorliegenden Studie konnte allerdings keine durch AG490 verursachte, signifikant erniedrigte Expression der genannten pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 β , TNF α und IL-6) im Hypothalamus gezeigt werden, die eine verringerte Lethargie hätte erklären können. Die hohe Variabilität dieser mRNA-Konzentrationen, die mit lokalen Effekten möglicherweise in Zusammenhang stehen (S. 225), machen Aussagen über die potentielle Wirkung der Zytokine auf die lokomotorische Aktivität allerdings schwierig. Ebenso wie für IL-10 könnte daher die Konzentrationsbestimmung von IL-1 β , TNF α und IL-6 auf Proteinebene in kommenden Studien zu AG490 hilfreich sein.

Als sekundärer Mediator für die Induktion von Verhaltensdepression kommt außerdem PGE₂ eine Rolle zu. So können sowohl unspezifische als auch selektive COX2-Inhibitoren soziale Verhaltensdepressionen nach systemischer LPS-Stimulation unterdrücken (de Paiva et al., 2010). Das Bild einer erhöhten PGE₂-Expression in Hypothalami AG490-vorbehandelter Ratten in der vorliegenden Arbeit stellt damit ebenfalls einen Widerspruch zu deren verminderter Lethargie dar. Eine veränderte Betrachtungsweise birgt hier einiges Erklärungspotential: Die vor allem im frühen Stadium der LPS-bedingten Reaktionen verstärkte, lokomotorische Aktivität dieser Tiere muss nicht unbedingt als Zeichen einer Unterdrückung von Krankheitssymptomen durch die Hemmung der JAK2 angesehen werden. Dieses Ergebnis könnte auch im Einklang mit der übersteigerten Fieberreaktion stehen und ein allgemein verstärktes „sickness-behavior“ zu Beginn der Reaktion anzeigen. Für diese Hypothese sprechen Untersuchungen zum sogenannten „early sickness syndrome“ (Romanovsky, 2004; Romanovsky et al., 1996). Diese ergaben während der frühen Phase LPS-bedingter Krankheitssymptome neben einer Hyperalgesie auch eine Hypererregbarkeit und erhöhte Aufmerksamkeit betroffener Tiere, so dass die vermehrte Aktivität AG490-vorbehandelter Tiere in den ersten Stunden auf eine Verstärkung dieses Phänomens hindeuten könnte. Ein „rebound“-Effekt, also eine reaktive Erhöhung von IL-10 und IL-1ra im Hypothalamus in den letzten Stunden des untersuchten Zeitraums (von 24 Stunden), ist außerdem denkbar und anhand eines entsprechenden Trends auf mRNA-Ebene für diese beiden Zytokine nicht auszuschließen. Dadurch könnte eine verspätete Umkehr der zunächst auftretenden Verstärkung von Krankheitssymptomen bedingt sein, wodurch die weiterhin gesteigerte Aktivität der Tiere zu späteren Zeitpunkten erklärt würde.

Somit ist die potentielle Rolle des JAK2-Signalweges, bzw. die Beteiligung von NF-IL6 für das Symptom Lethargie, weniger eindeutig ersichtlich als es für die Fieberentwicklung der Fall ist. Einerseits ist in der Hemmung der Lethargie nach Behandlung mit AG490 ein Hinweis auf eine proinflammatorische Rolle von NF-IL6 zu sehen, dessen Aktivierung zur Ausprägung von Verhaltenswirkungen zentral, z.B. in der Amygdala, beitragen kann. Andererseits gibt es auch hier Anhaltspunkte für eine generell anti-inflammatorische Bedeutung von NF-IL6, möglicherweise in Verbindung mit STAT3, auch schon in frühen Phasen der Entzündungsreaktion, die sich im Rahmen des „early-sickness syndromes“ manifestiert.

2.1.7.3. Anorexie und Adipsie

Die unveränderte, LPS-bedingte Anorexie und die verminderte Adipsie scheinen den Eindruck einer übersteigerten Inflammationsreaktion durch Hemmung von JAK2-Signalwegen zunächst nicht zu unterstützen. Die Verminderung von zentralem IL-10 und die vermutlich parallel dazu auftretende Erhöhung der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine scheinen auf diese Symptome keinen wesentlichen Einfluss zu haben. Ob generell ein hemmender Effekt von IL-10 auf LPS-vermittelte Anorexie und Verlust an Körpermasse besteht, kann nicht eindeutig beant-

wortet werden. So konnte exogene Verabreichung des Zytokins diese Symptome nicht lindern (Harvey et al., 2006). Hollis et al. (2010) wiederum, wiesen einen derartigen Effekt für zentral wirksames IL-10 nach, welchen sie auf eine verminderte Induktion anorexigener Neuropeptide im ARC infolge IL-10-Wirkungen zurückführten. Allerdings sind wie bereits beschrieben (Kap. 2.1.6.) vor allem an der verminderten Futteraufnahme im Verlauf LPS-bedingter Krankheitsreaktionen periphere Regulationsmechanismen von höherer Bedeutung als zentralnervös vermittelte.

Ein Auseinanderweichen der gemeinhin als gekoppelt angesehenen Nahrungs- und Wasseraufnahme (Langhans et al., 2010) bei Anorexie und Adipsie, wie in der vorliegenden Studie durch AG490 induziert, wurde zumindest für IL-1 β -vermittelte Effekte bereits beschrieben (Sonti et al., 1997). Über eine Rezeptorblockade im Gehirn konnte diese Gruppe allein die IL-1 β -vermittelte verminderte Futteraufnahme, nicht aber die Adipsie stoppen. In der vorliegenden Studie könnten bei unveränderter IL-1 β -Wirkung über andere, von AG490 beeinflusste Signalwege die LPS-induzierte Adipsie, nicht aber die Anorexie verringert worden sein.

In Bezug auf diese verringerte Adipsie scheint die Hemmung der zentralen IL-10-Induktion durch AG490 ebenfalls nicht ursächlich gewesen zu sein. Interessanterweise zeigte sich in einer Studie von Nava et al. (1997), dass zentral verabreichtes IL-10 zwar die verringerte lokomotorische Aktivität und das Fieber betroffener Tiere nach LPS-Stimulation hemmen konnte, nicht aber die Adipsie. Diese Gruppe vermutete als Verursacher der Adipsie eine LPS-induzierte Überexpression des sekundären Mediators NO (Stickstoffmonoxid). Entsprechend konnte die Inhibition NO-vermittelter Effekte, die auf der Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration basieren, durch L-NAME (N⁶-Nitro-L-Arginin-methylester, einen Hemmer der Guanylatzyklaseaktivierung) diese Adipsie unterdrücken (Calapai et al., 1997). Dies war unter anderem auf eine direkte Hemmung von NO-Wirkungen in der POA zurückzuführen (Nava et al., 1997). Ein Zusammenhang zwischen NO-Wirkungen und Adipsie wurde z.B. auch schon von Calapai et al. (1992; 1994) festgestellt, indem unter anderem die dipsogene Wirkung zentraler Angiotensin-II-Injektionen durch L-NAME unterdrückt werden konnte. Demnach hemmt NO die Durstinduktion, nicht aber das normale Trinkverhalten, was vor allem in der präoptischen Region stattfindet. Die Verringerung der NO-Produktion durch die Hemmung der JAK2 und der damit verbundenen verminderten Aktivierung von STAT3 und NF-IL6 könnte also in der vorliegenden Studie eine Erklärung der verringerten Adipsie darstellen. Für inflammatorische Reaktionen ist in Bezug auf die Synthese von NO vor allem die induzierbare NOS (iNOS) von Bedeutung, die durch verschiedene Stimuli, oft in synergistischer Weise, aktiviert und induziert werden kann (z.B. durch LPS zusammen mit IFN γ oder TNF α bzw. IL-1 β ; Nussler & Billiar, 1993). Das mögliche Einwirken von STAT3 und NF-IL6 auf die LPS-bedingte Induktion der iNOS wurde unter anderem kürzlich von Lai et al. (2009) postuliert. Außerdem zählt dieses Enzym zu den potentiellen Zielgenen unter anderem von NF-IL6 (Löwenstein et al., 1993). NO ist außerdem als Regulator der Körpertemperatur (Gerstberger, 1999; Schmid et al., 1998) auch in Bezug auf die Vermittlung der Fieberreaktion interessant (Roth, 2006). Dabei scheint dieser Mediator die Rolle eines endogenen zentralen Antipyretikums – allerdings mit großen Unterschieden zwischen einzelnen Spezies – inne zu haben. So kann die Verabreichung von NO-Donoren Fieber hemmen, Inhibition der NO-Synthase verstärkt hingegen die Reaktion (De Paula et al., 2000; Steiner et al., 2002). Der zugrundeliegende Mechanismus könnte auf einer neuronalen Aktivierung von Wärmeabgabemechanismen durch NO beruhen. Die antipyretischen NO-Wirkungen beschränken sich allerdings allein auf das Gehirn, in der Peripherie ist die Funktion nicht vollkommen klar (Roth, 2006). In der vorliegenden Studie könnte eine verminderte NO-Konzentration im Gehirn die verminderte Adipsie einerseits und die übersteigerte Fieberreaktion anderer-

seits, zumindest anteilig bedingen. Dabei stehen induzierende Effekte auf iNOS durch IL-1 β und TNF α einer Inhibition des Enzyms durch IL-10 gegenüber (Nussler & Billiar, 1993). Die Bedeutung der iNOS für tatsächliche NO-Wirkungen in der POA sind bislang allerdings nicht eindeutig geklärt worden.

Die Bestimmung der Aktivität des Enzyms bzw. die Detektion der NO-Aktivität im Gehirn könnte sich in zukünftigen Studien als äußerst interessant erweisen, da NF-IL6 zumindest anteilig an deren Regulation im Rahmen LPS-bedingter Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein scheint und möglicherweise über NO einige seiner Wirkungen übermittelt. Die in dieser zweiten Teilstudie verringerte Adipsie nach potentieller Hemmung eines NF-IL6-Aktivierungsweges weist möglicherweise in Verbindung mit der verringerten Lethargie auf eine Doppelrolle von NF-IL6 für die Entwicklung von „sickness-behavior“ hin: Eine langfristig antipyrogene Bedeutung könnte dabei einer Steigerung von Lethargie und Adipsie durch NF-IL6 gegenüberstehen. Dabei kommt NO als wichtiger Mediator in Frage.

Im Hinblick auf das mögliche therapeutische Potential von AG490 ist die Abschwächung von für die klinische Anwendung unerwünschten Symptomen wie Abgeschlagenheit und Lethargie gegenüber einer verstärkten Fieberreaktion, die als wichtiger Abwehrmechanismus des Körpers gegen Infektionen angesehen wird, besonders interessant. Für diese Symptome kommen jeweils verschiedene Regulationsmechanismen und -ebenen vor, die in verschiedenem Maße durch die Inhibition beeinflusst worden sein könnten. Das im Rahmen dieser Arbeit entstandene Gesamtbild der erhobenen physiologischen Parameter ergibt sich aus einem Zusammenspiel dieser Mechanismen, so dass einzelne mögliche Ursachen wie die Inhibition der IL-10-Induktion oder die mögliche Hemmung der NO-Synthese immer nur anteilig für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht werden können. Ihre Bedeutung kann im zeitlichen Verlauf und in Bezug auf einzelne Symptome variieren. Die spezifischere Inhibition einzelner Signalwege, beispielsweise durch die Hemmung der NF-IL6-Aktivität durch siRNA, wie sie im Rahmen der dritten Teilstudie der vorliegenden Arbeit angestrebt wurde, kann Ursachen und Wirkungsprinzipien näher eingrenzen.

2.2. Auswirkungen auf Expression und Zusammenspiel inflammatorischer Marker im Gehirn

Letztendlich stellen Veränderungen der Expression inflammatorischer Marker im Gehirn die Grundlage der beobachteten AG490-vermittelten Effekte dar. Um die möglichen Ursachen und Zusammenhänge veränderter Expressionen in der vorliegenden Studie bewerten zu können, müssen zunächst einige Überlegungen zu den grundsätzlichen Möglichkeiten und Grenzen der Inhibition durch AG490 angestellt werden. Die Blockade der JAK-2 Aktivierung kann an gp130-Rezeptoren die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 unterdrücken (Lau et al., 2011; Liao et al., 2009; Sriram et al., 2004; Xuan et al., 2001). Unter anderem wurde neben der verminderten Phosphorylierung von JAK2 (Zhao et al., 2011) die Hemmung der Induktion von p-STAT3, sowie der nukleären Translokation und Bindungsaktivität von STAT3 durch AG490 gezeigt (Xu et al., 2011, Xuan et al., 2001). Somit könnten LPS-aktivierte STAT3-Signalwege, die vor allem über Wirkungen von IL-6 vermittelt werden (vgl. Kap. I., 2.5.1.2. & 2.5.2.4.), im Gehirn durch intracerebroventrikuläre Vorbehandlung mit dem JAK2-Inhibitor AG490 unterbrochen und bestenfalls sogar vollständig unterdrückt werden. Da einige der diskutierten Aktivierungswegen von NF-IL6 (vor allem „downstream“ des IL-6R) ebenfalls die Phosphorylierung der JAK2 involvieren (vgl. Kap. I., 3.2.2.), war außerdem von einer zumindest partiellen Inhibition der NF-IL6-Aktivierung in der vorliegenden Studie auszugehen. Die Detektion einer möglichen Hemmung der NF-IL6-Aktivität stellt sich allerdings schwie-

riger dar, als das für STAT3 der Fall ist. Zum Einen kann die nukleäre Translokation von NF-IL6 hier nicht als ultimativer Maßstab seiner Aktivierung herangezogen werden, da die Bedeutung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors (z.B. über JAK2) für diese Translokation nicht eindeutig geklärt werden konnte (vgl. Kap. I., 3.2.2.3.), und die Möglichkeit eines Übertritts von NF-IL6 in den Nukleus auch ohne vorherige Phosphorylierung besteht. Zum Anderen wurden in der Vergangenheit auch JAK2-unabhängige Wege mit einer möglicherweise durch Phosphorylierung bedingten nukleären Translokation von NF-IL6 in Zusammenhang gebracht (Vermittlung über PKA, PKC; Kap. I., 3.2.2.3.). Zusätzlich bestehen Synergismen der verschiedenen Proteinkinasen, die Funktionsverluste einer Kinase möglicherweise durch andere kompensieren könnten. Folglich könnte die Phosphorylierung an Ser-105, die über die JAK2-Hemmung durch AG490 unterdrückt werden sollte, über andere Kinasen trotzdem katalysiert worden sein. Daher könnte eine partiell verringerte Phosphorylierung und Aktivierungshemmung von NF-IL6 durch die Hemmung der JAK2-Aktivität in der vorliegenden Studie stattgefunden haben, ohne dass die Dichte nukleärer NF-IL6 oder p-NF-IL6-Signale sichtbar abgesunken wäre. Daher wäre der Nachweis einer gesenkten DNA-Bindungsaktivität an Zielgenpromotoren durch die Wirkung von AG490 ein wertvoller, zusätzlicher Hinweis auf eine erfolgreiche Inhibition gewesen. Leider scheiterten solche Untersuchungen für die vorliegende Arbeit in einer Kooperation an unvorhergesehenen technischen Schwierigkeiten.

Für die Interpretation der Ergebnisse der zweiten Teilstudie sind außerdem noch folgende Sachverhalte zu berücksichtigen: Obwohl in vielen Studien AG490 als spezifisch wirksamer JAK2-STAT3 Inhibitor erfolgreich verwendet wurde (s.o.), gibt es auch Hinweise darauf, dass zusätzlich die Aktivität und DNA-Bindung von STAT1, -5a und -5b durch AG490 an Rezeptoren ohne JAK2-Aktivität gehemmt werden können (Satriotomo et al., 2006; Thomis & Berg, 1997). Dies scheint mit der Eigenschaft des Inhibitors zusammenzuhängen, auch die Aktivität anderer Tyrosinkinase (JAK1; Zhang et al., 2000 bzw JAK3; Wang et al., 1999) zu unterdrücken. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie kann daher die Hemmung IL-10-vermittelter Signalwege (an IL-10-Rezeptoren) durch Vorbehandlung mit AG490 nicht ausgeschlossen werden (Kotenko & Pestka, 2000; vgl. Abb. 97, 98, 99), auch wenn zumindest eine Hemmung der IL-10-vermittelten STAT3-Phosphorylierung durch AG490 in Astrozyten von Gorina et al. (2005) nicht nachgewiesen werden konnte. Schließlich soll an dieser Stelle noch auf eine erst kürzlich beschriebene, mögliche Eigenschaft von AG490 hingewiesen werden, die bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse von Interesse sein könnte: Seo et al (2009) zeigten eine durch AG490 vermittelte „downregulation“ der Rezeptoreinheit gp130 in Schwannom-Zellen, welche auf einer Hemmung der Translation des Glykoproteins beruht. Aufgrund der kurzen Lebensdauer von gp130 verminderte sich die Zahl intakter Rezeptoreinheiten nach Behandlung mit AG490 rapide und führte damit zusätzlich zu einer stark verminderten STAT3-Antwort auf Stimulationen mit IL-6. Für die zweite Teilstudie der vorliegenden Arbeit bedeutet dies, dass aufgrund dieses Mechanismus eine Potenzierung des hemmenden Einflusses von AG490 auf die IL-6-vermittelte STAT3- und potentiell auch auf die NF-IL6-Aktivierung stattgefunden haben könnte. Diese wäre mit den durchgeführten Untersuchungen nicht detektierbar gewesen.

2.2.1. Expression von Aktivierungsmarkern im Hypothalamus

2.2.1.1. STAT3

Die STAT3-Expression konnte anhand der Immunhistochemie in den untersuchten Versuchsgruppen im quantitativen Vergleich nicht abschließend beurteilt werden, da aufgrund des Fokus dieser Studie auf NF-IL6 der relativ späte Zeitpunkt von 8 Stunden ausgewählt worden war, zu dem die STAT3-I.R. gemeinhin kaum noch detektierbar ist (Harre et al., 2002; Rummel et al., 2004). Demnach konnten in AG490-vorbehandelten, sowie in Kontrollgruppen, kaum STAT3- oder p-STAT3-Signale dargestellt werden, wobei letztere tendenziell nach Behandlung mit dem Inhibitor vermehrt auftraten (Abb. 68, 171). Einen Hinweis auf eine dennoch erfolgreiche Hemmung der STAT3-Aktivität liefert aber die übersteigerte Fieberreaktion AG490-vorbehandelter Tiere, da der frühen STAT3-Aktivierung in Endothelzellen eine entscheidende Bedeutung für die Eindämmung LPS-bedingter Krankheitssymptome z.B. im Modell des Endotoxinschocks beigemessen wird (Kano et al., 2003).

Interessant ist die deutliche Induktion des negativen Regulators der STAT3-Aktivierung SOCS3 auf mRNA-Ebene im Hypothalamus 24 Stunden nach der LPS-Stimulation (Abb. 72, S. 175). Dies könnte zusammen mit der tendenziell ansteigenden p-STAT3-I.R. auf eine verspätet induzierte STAT3-Aktivität hinweisen, die aufgrund einer langfristigen Erhöhung der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine („rebound“ Effekt) zustande gekommen sein könnte. Eine derartige, verspätete Zytokininduktion deutete sich im Gehirn nach 24 Stunden in der vorliegenden Arbeit zumindest an (Abb. 73, S. 176; siehe auch Abb. 97, S. 232). Die mögliche Ursache dafür liegt zum Einen in der anfänglichen Hemmung von anti-inflammatorischen IL-10-Wirkungen. Es ist aber auch eine verminderte Aktivierung der HPA-Achse als Ursache denkbar. Demnach könnte eine frühe Hemmung der Weiterleitung pro-inflammatorischer Signale durch AG490 über STAT3 oder NF-IL6 letztendlich die Produktion von Glucocorticoiden und damit deren anti-inflammatorische Wirkung unterdrückt haben. Damit hätten im Anschluss an diese frühen Effekte wiederum erhöhte Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine im Blutkreislauf vorgelegen, welche dann verspätete Aktivierungen inflammatorischer Marker verursacht haben könnten (Überblick: Turnbull & Rivier, 1999). Aber auch IL-10 selbst ist möglicherweise an der Regulation der HPA-Achse beteiligt, so dass auch ein Zusammenwirken der beiden vorgenannten Ursachen denkbar ist. Eine Verminderung von IL-10 könnte zur Hemmung der Glucocorticoid-Sekretion mit der Folge der verspäteten Konzentrationserhöhung pro-inflammatorischer Zytokine führen (Überblick: Smith et al., 1999). Im umgekehrten Sinn ist aber auch die verminderte Glucocorticoid-Ausschüttung als Ursache verminderter IL-10-Konzentrationen möglich. Insgesamt ist die potentielle Rolle von IL-10 für die Regulation der HPA-Achse vielschichtig, so steht seine Funktion als „releasing factor“ für ACTH seinem hemmenden Einfluss auf die IL-1 β - oder TNF α -vermittelte ACTH-Produktion gegenüber (Überblick: Smith et al., 1999). Andererseits kann die angedeutete, späte Induktion des anti-inflammatorischen IL-10 nach 24 Stunden eine Rolle für die SOCS3-Induktion zu diesem Zeitpunkt gespielt haben, da IL-10-Signalwege eine verlängerte Induktion von STAT3 verursachen (Übersicht: Murray, 2006) und eine direkte Induktion von SOCS3 über IL-10 stattfindet (Lang et al., 2002).

Die hier nicht mehr (8 bzw. 24 Stunden) eindeutig feststellbare Hemmung der STAT3-Aktivität nach systemischer LPS-Stimulation durch AG490 steht demnach in der vorliegenden Arbeit vermutlich vor allem im Zusammenhang mit der kurzfristigen Senkung der IL-10-Konzentration im Hypothalamus und dem daraus resultierenden, auffälligsten Symptom des verstärkten Fiebers in entspre-

chend vorbehandelten Tieren. Außerdem wird die Bedeutung von STAT3 für die Aktivierung der HPA-Achse durch einen „rebound“ Effekt angedeutet.

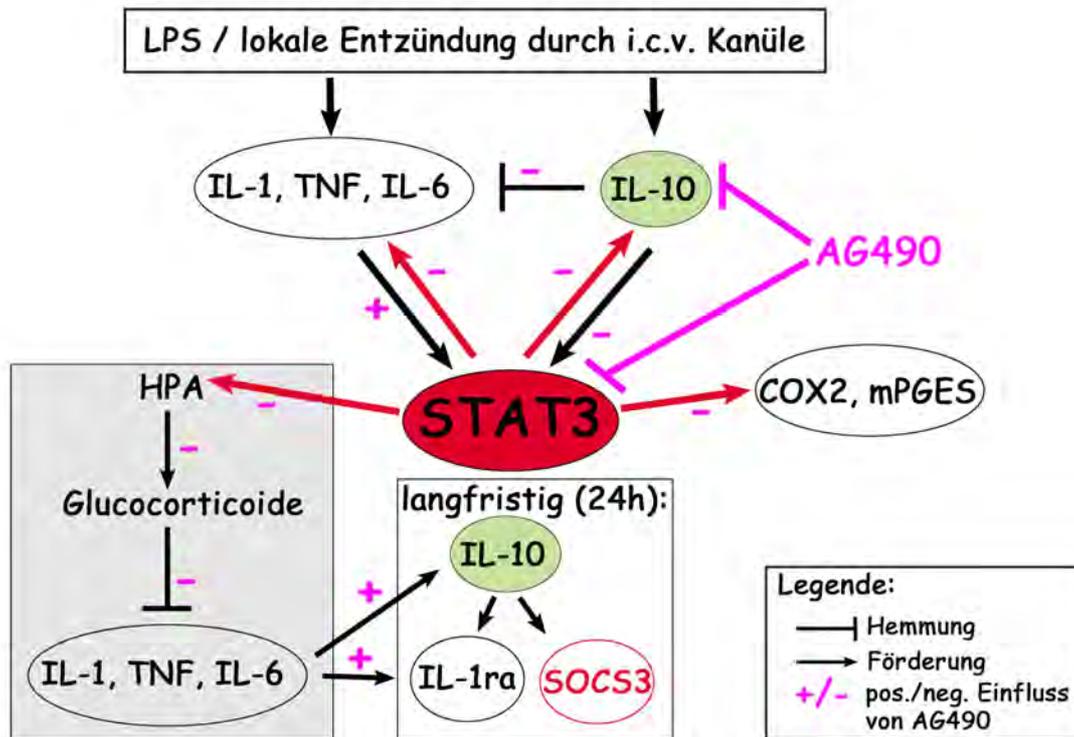


Abb. 97: Mögliche Beeinflussungen von STAT3-vermittelten Signalwegen im Hypothalamus durch AG490

Die potentiellen Zusammenhänge der intracerebroventrikulären Verabreichung des JAK2-Inhibitors AG490 mit beobachteten Veränderungen der Expression inflammatorischer Marker im Gehirn sind schematisch dargestellt. Dabei wurden lediglich die wichtigsten, für diese Studie relevanten Fakten einbezogen. Pfeile drücken generell einen fördernden, Striche einen hemmenden Einfluss aus. Mögliche Beeinflussungen der komplexen, z.T. hypothetischen Mechanismen durch AG490 sind anhand von + oder – angegeben. HPA = Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.

2.2.1.2. NF-IL6

Auf Proteinebene stellte sich in immunhistochemischen Untersuchungen die nukleäre NF-IL6-Konzentration ebenfalls unverändert dar (Abb. 66, S. 168). Zum Einen ist hierbei die bereits erläuterte Bedeutung von NF-IL6 im Rahmen traumatischer Hirnläsionen zu bedenken (Kap. IV., 2.1.). So ist es möglich, dass lokale Reaktionen, verbunden mit der LPS-bedingten NF-IL6-Aktivierung einen zu starken Stimulus bildeten, um einen hemmenden Effekt von AG490 auf NF-IL6 darstellen zu können. Andererseits deutet die augenscheinlich unveränderte Anzahl und Intensität nukleärer NF-IL6- und p-NF-IL6-Signale nicht zwingend auf eine Unwirksamkeit von AG490 in Bezug auf eine Inhibition der JAK2-vermittelten NF-IL6-Phosphorylierung hin. Diese Hemmung könnte „maskiert“ durchaus aufgetreten sein (siehe Kap. IV., 2.2, S. 230). Alternativ könnte die im Kern detektierte NF-IL6-I.R. auf einer Neusynthese von NF-IL6 aufgrund des inflammatorischen Stimulus beruhen, der dabei über JAK2-unabhängige Wege gewirkt haben könnte. In der ersten Teilstudie hatte die Hypothese, dass NF-IL6-Wirkungen während LPS-induzierten Inflamationsreaktionen vor allem auf einer *de novo* Synthese des Transkriptionsfaktors beruhen, entsprechend unterstützt werden können (Kap. IV., 1.1.5). Das bedeutet ebenfalls, dass der potentiell hemmende Einfluss der JAK2-Inhibition auf die NF-IL6-Aktivierung anhand der immunhistochemischen Ergeb-

nisse dieser zweiten Teilstudie nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Der Eindruck einer leichten Verstärkung der p-NF-IL6-Signaldichte nach Behandlung mit dem Inhibitor könnte aber als Hinweis auf kompensatorische Mechanismen (z.B. Ser-Phosphorylierung durch andere Proteinkinasen) gedeutet werden.

Um die mögliche Hemmung der NF-IL6-Aktivität und damit zusammenhängende Entwicklungen in Bezug auf andere inflammatorische Marker beurteilen zu können, müssen hier aus genannten Gründen indirekte Hinweise darauf herangezogen werden. Die Induktion von NF-IL6 auf mRNA-Ebene nach 24 Stunden in AG490-vorbehandelten Tieren ist ursächlich ebenso wie die SOCS3-Induktion zu diesem Zeitpunkt möglicherweise auf eine Hemmung der Aktivierung der HPA-Achse (analog oder synergistisch mit STAT3) und damit verbundener Erhöhung der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine zurückzuführen (vgl. S. 231, siehe auch Abb. 98, S. 235). Auch hier ist wiederum ein Einfluss der gesenkten hypothalamischen IL-10-Menge denkbar.

Mögliche Interaktionen zwischen NF-IL6 und IL-10 existieren in zwei Richtungen. So ist zum Einen IL-10 ein wichtiges Zielgen von NF-IL6 (Kap. I., 3.3.3.1., S. 225), so dass die Verringerung der IL-10-mRNA die mögliche Folge einer potenziellen Unterdrückung der NF-IL6-Aktivierung durch AG490 darstellt (Abb. 98, 235). Unter anderem wurde eine NF-IL6-Abhängigkeit der induzierten IL-10-Produktion in Makrophagen festgestellt (Csóka et al., 2007). In Neutrophilen Granulozyten von NF-IL6-defizienten Mäusen ist beispielsweise die Expression von IL-10 nach LPS-Stimulation stark vermindert (Akagi et al., 2008). Es finden sich auch andere Hinweise auf eine mögliche Bedeutung NF-IL6-vermittelter Wege auf die IL-10-Expression. So wurde im Rahmen neurodegenerativer Prozesse eine vermehrte IL-10-Expression vor allem in Mikrogliazellen beobachtet (Park et al., 2007). Der späte Aktivierungszeitpunkt von 8 Stunden nach LPS-Injektion, verbunden mit der mutmaßlichen Bedeutung von NF-IL6 als Aktivierungsmarker vor allem von Mikrogliazellen, legt einen entsprechenden Zusammenhang nahe. Dieser mikroglialen IL-10-Expression wurde in der Studie von Park et al. eine neuroprotektive Bedeutung beigemessen, was wiederum mit der Hypothese einer neuroprotektiven Rolle von NF-IL6 übereinstimmt (Kap. 2.1.1). Auch in humanen Monozyten wurde eine späte IL-10-Induktion durch LPS festgestellt (Wanidworanun & Strober, 1993), was mit Effekten von TNF α und nachfolgender Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang gebracht werden kann. Somit besteht für die vorliegende Studie die Möglichkeit einer Hemmung der IL-10-Synthese im Hypothalamus über die Aktivitätshemmung von NF-IL6 durch AG490, welche zum Beispiel über früh verringerte TNF α -Konzentrationen vermittelt sein könnte (Kap. I., 3.3.3.). Eine Beeinflussung von NF-IL6 durch veränderte IL-10-Konzentrationen ist ebenso möglich (Abb. 98, S. 235), so dass NF-IL6, neben der bekannten Rolle von STAT3, als Übermittler von IL-10-Wirkungen in Frage kommt. Insgesamt kann damit dem Befund einer gesenkten IL-10-Konzentration im Gehirn 8 Stunden nach Stimulation mit LPS eine zentrale Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse dieser Teilstudie beigemessen werden: Die geschilderten, vielschichtigen Wechselwirkungen zwischen NF-IL6 und IL-10 lassen einerseits auf die erfolgreiche Hemmung der NF-IL6-Aktivität durch AG490 schließen und unterstreichen andererseits die schon in der ersten Teilstudie vermutete Rolle von NF-IL6 für die Expression von IL-10, möglicherweise im Zusammenwirken mit STAT3, als potentiell Zielgen.

Ein besonders interessanter Einfluss von IL-10 auf die NF-IL6-Expression wurde von Tanaka et al. (2005) im Zusammenhang mit der viralen Replikation von HIV in Makrophagen offengelegt: Hier kam es zur Verschiebung der Ratio zwischen der aktiven NF-IL6-Isoform LAP und dem dominant negativen Inhibitor LIP zugunsten des letzteren durch IL-10-Einwirkungen. Hierbei schien

wiederum STAT3 essentiell zu sein, da STAT3-defiziente Tiere kein inhibitorisches NF-IL6 auf einen IL-10-Stimulus hin bildeten. Die Synthese der inhibitorischen Form basiert auf posttranslationalen Prozessen, zunächst aber steigt durch IL-10 die Aktivität am NF-IL6-Promotor an. Somit könnte IL-10 eine „Schaltfunktion“ in Bezug auf NF-IL6-Aktionen zukommen, die die Vermittlung sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokinwirkungen bedingen könnten. In der vorliegenden Studie würde damit die verringerte IL-10-Menge eine zunehmende Produktion der aktiven Isoform bzw. eine Abnahme von LIP bewirken, wodurch zum Einen die nicht detektierbaren Unterschiede in immunhistochemischen Untersuchungen und zum Anderen die z.T. verstärkenden Einflüsse von AG490 auf LPS-bedingte Krankheitssymptome erklärbar wären, da anti-inflammatorische NF-IL6-Effekte (über LIP) von pro-inflammatorischen (über LAP) abgelöst würden. Der scheinbar makrophagenspezifische Mechanismus (Tanaka et al., 2005) rückt wiederum Mikrogliazellen in den Fokus des Interesses. Letztendlich könnten Interaktionen zwischen NF-IL6 und IL-10 in AG490-vorbehandelten Tieren sich gegenseitig bedingt haben, so dass eine frühe Unterdrückung der NF-IL6-Aktivität zur Verminderung der IL-10-Konzentration geführt und dadurch wiederum eine gesteigerte LAP-Synthese verursacht haben könnte. Um diese möglichen Zusammenhänge zu klären, wäre eine Gegenüberstellung der LAP/LIP-Ratio der untersuchten Versuchsgruppen hilfreich. Leider konnte solch eine Untersuchung nicht durchgeführt werden, da kein weiteres Gehirngewebe nach der missglückten, in Kooperation durchgeführten DNA-Bindungsstudie mehr für solche Analysen zur Verfügung stand.

Einen weiteren Hinweis auf veränderte NF-IL6-Aktivität im Gehirn liefern wiederum die veränderten Expressionsmuster von COX2 und mPGES, die in der vorliegenden Arbeit auffielen. Die mRNA-Expression beider Enzyme zeigt sich in AG490-vorbehandelten Tieren 8 Stunden nach dem LPS-Stimulus stärker induziert als in der Kontrollgruppe (Abb. 74, S. 177). Yamamoto et al. (2007) wiesen Auswirkungen einer NF-IL6-Inhibition auf die Expression von mPGES nach. Da in der vorliegenden Studie, entgegen dieser Ergebnisse, eine potentielle Hemmung der NF-IL6-Aktivität eine Steigerung der mPGES-Expression hervorrief, ist wiederum eine Bedeutung des LAP/LIP-Verhältnisses anzunehmen. Außerdem liegt möglicherweise eine Überlagerung von Effekten vor, die durch NF-IL6- bzw. STAT3-Hemmung ausgelöst wurden, da beiden Transkriptionsfaktoren im Hinblick auf die Induktion von COX2 und mPGES eine bedeutsame Rolle zukommt (vgl. Kap. IV, 2.2.1.1.).

Die verstärkte Induktion des negativen Regulators von NF-IL6, Trib1, nach 8 Stunden in AG490-vorbehandelten Tieren (Abb. 72, S. 175) könnte ebenfalls auf eine möglicherweise vermehrte NF-IL6-Aktivität hindeuten, wenn man davon ausgeht, dass NF-IL6 im Rahmen eines autoregulatorischen Prozesses zu einer Induktion des eigenen Inhibitors führt. Da die gesteigerte Expression von Trib1 durch Einwirken inflammatorischer Stimuli wie IL-1 β und TNF α nachgewiesen wurde (Kiss-Toth et al., 2004; Sung et al., 2006), liefert dieses Ergebnis einen zusätzlichen Hinweis auf eine Übersteigerung der inflammatorischen Antwort durch die Behandlung mit AG490. Die Beteiligung von Trib1 an der Degradation allgemein von C/EBP und damit auch von NF-IL6 (Yokoyama & Nakamura, 2011) lässt dessen vermehrte Expression bei einem möglicherweise verschobenen LAP/LIP-Verhältnis sinnvoll erscheinen und könnte einen Regulationsmechanismus darstellen, der einer überschießenden LAP-Aktivität entgegenwirkt. Hierbei wäre auch die Eigenschaft von Trib1, an NF-IL6 zu binden und so dessen DNA-Bindungsaktivität zu unterdrücken (Yamamoto et al., 2007) von Bedeutung. Eine negative Regulation der NF-IL6-Expression durch Trib1 konnte zwar anhand einer Überexpression des Regulatorproteins gezeigt werden (Yamamoto et al., 2007), tritt jedoch *in vivo* nicht gezwungenermaßen ein, da die dazu erforderliche Trib1-Konzentration vermut-

lich nicht erreicht wird. Im Vergleich zur ersten Teilstudie fand die Induktion von Trib1 hier früher statt (Abb. 53, S. 148 bzw. Abb. 72, S. 175), was wiederum die inflammatorische Reaktion auf die i.c.v. Verabreichung des Bolus bzw. der Implantation der Kanüle widerspiegeln könnte, welche sich mit LPS-bedingten Reaktionen überlagerte.

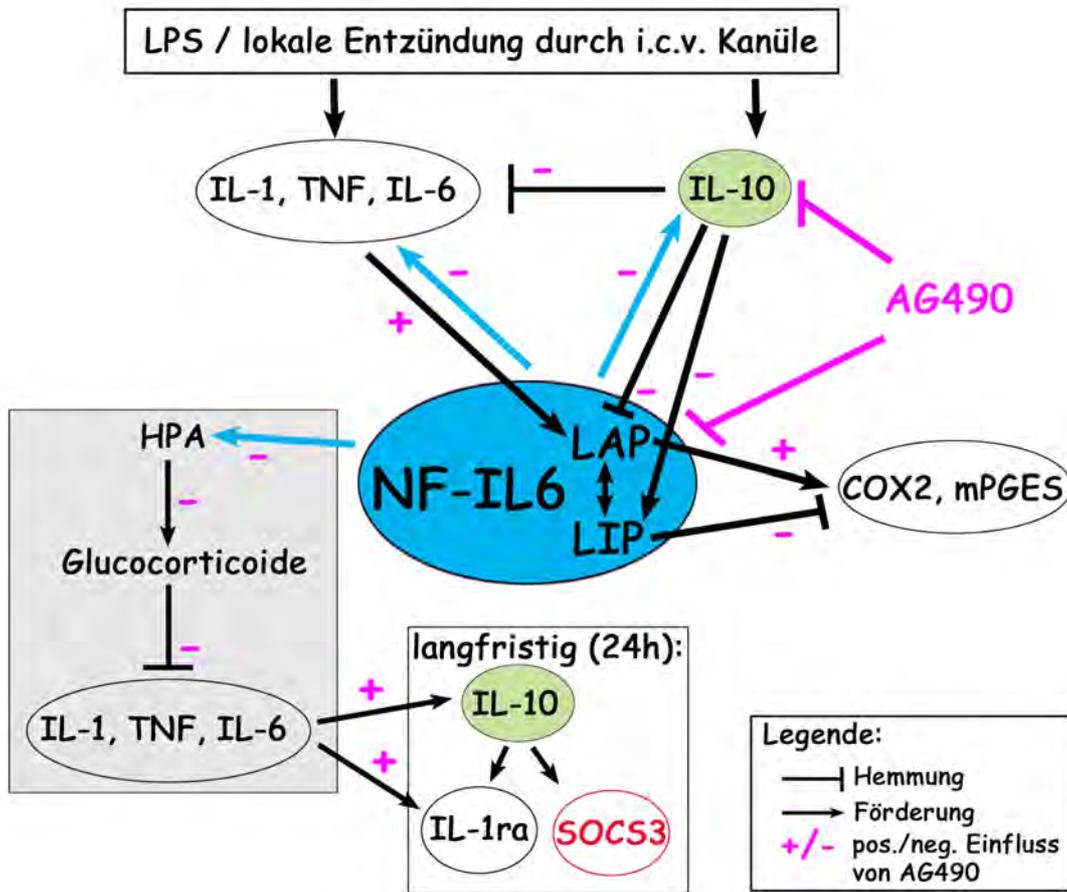


Abb. 98: Mögliche Beeinflussungen von NF-IL6-vermittelten Signalwegen im Hypothalamus durch AG490

Es wird nur auf die wichtigsten, für diese Studie relevanten Gegebenheiten und Beobachtungen eingegangen. Denkbare Verknüpfungen der intracerebroventrikulären Verabreichung des JAK2-Inhibitors AG490 mit beobachteten Veränderungen der Expression inflammatorischer Marker im Gehirn sind schematisch dargestellt. Besondere Bedeutung kommt dem möglicherweise beeinflussten Verhältnis von LAP als aktivierender und LIP als inhibierender Isoform von NF-IL6 zu. Pfeile drücken generell einen fördernden, Striche einen hemmenden Einfluss aus. Mögliche Beeinflussungen der komplexen, z.T. hypothetischen Mechanismen durch AG490 sind anhand von + oder - angegeben. HPA = Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.

Zusammengefasst finden sich also zahlreiche Hinweise auf eine zumindest anteilige Hemmung der NF-IL6-Aktivierung durch AG490 in der vorliegenden Studie, die wiederum den Fokus auf die detektierte Senkung der IL-10-Konzentration im Hypothalamus legen. Neben der Untermauerung der Hypothese, dass NF-IL6 für die IL-10-Synthese von Bedeutung ist, ergibt sich mit der möglichen Verschiebung der LAP/LIP-Ratio eine neue mögliche Regulationsebene der NF-IL6-Aktivität. Dadurch wird die Annahme aus der ersten Teilstudie unterstützt, dass NF-IL6 im Rahmen der Aufrechterhaltung (entspricht pro-inflammatorischer Wirkung) und / oder Beendigung (entspricht anti-inflammatorischer Wirkung) von Krankheitssymptomen im Hypothalamus eine Rolle zukommen könnte.

2.2.1.3. NF- κ B

Da die Effekte einzelner Transkriptionsfaktoren immer im Zusammenhang mit der Gesamtheit aktivierter Signalkoppler betrachtet werden müssen, ist für die Beeinflussung der Expression pro-inflammatorischer Zielgene nach LPS-Stimulation über STAT3 und NF-IL6 auch die Rolle des für diese Reaktion bedeutsamen Transkriptionsfaktors NF- κ B zu berücksichtigen. Negative Effekte von AG490 auf die Aktivierung von NF- κ B wurden außerdem nachgewiesen (Peña et al., 2010), ebenso wie die Beeinflussung der I κ B α -Phosphorylierung über JAK2 (Digicaylioglu & Lipton, 2001), auch wenn NF- κ B kein direktes Ziel der JAK2-Phosphorylierung im Rahmen von Rezeptorbindungen darstellt.

Wie erwartet, war auf Proteinebene 8 Stunden nach dem LPS-Stimulus keine Induktion von NF- κ B mehr zu beobachten (Abb. 69, S. 171). Damit bestätigten sich frühere Beobachtungen, dass NF- κ B vor allem in der frühen Phase LPS-vermittelter Reaktionen von Bedeutung ist (Nadjar et al., 2003). Der negative Regulator I κ B α war allerdings auf mRNA-Ebene in beiden LPS-stimulierten Gruppen zu diesem Zeitpunkt erhöht (Abb. 72, S. 175), was nach alleiniger LPS-Injektion in der ersten Teilstudie nicht der Fall gewesen war (Abb. 53–54, S. 148/149). In AG490-vorbehandelten Tieren fiel diese Induktion noch deutlicher aus. Dieses Ergebnis könnte mit lokalen Reaktionen am Injektionsort zusammenhängen, da mit einer gesteigerten IL-1 β -Konzentration auch NF- κ B-Signalwege verstärkt aktiviert werden können, die sich anhand der I κ B α -Induktion manifestieren (Abb. 96, S. 218). Die vermutete Konzentrationserhöhung pro-inflammatorischer Zytokine aufgrund verminderter IL-10-Wirkungen oder gehemmter Aktivierung der HPA-Achse (Kap. IV., 2.2.1.1., S. 231) könnte die Ursache für verlängerte NF- κ B-Aktivierung und I κ B α -Induktion in der AG490-vorbehandelten Gruppe sein. Ebenso wie für NF-IL6 (Kap. IV., 2.2.1.2.; S. 233) besteht auch für NF- κ B eine Wechselwirkung mit IL-10: So wird einer der Hauptwege der IL-10-Induktion durch LPS über NF- κ B vermittelt (Park et al., 2005). Des Weiteren liegt auch ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von AG490 und der NF- κ B-Aktivierung vor: Sowohl ein hemmender Effekt des Inhibitors auf die LPS-bedingte NF- κ B-Aktivierung (Peña et al., 2010; vgl. Abb. 99, S. 237) als auch dessen Einfluss auf die I κ B α -Phosphorylierung wurden nachgewiesen (Digicaylioglu & Lipton, 2001), die im Gegensatz dazu zu einer verstärkten Translokation von NF- κ B führen kann.

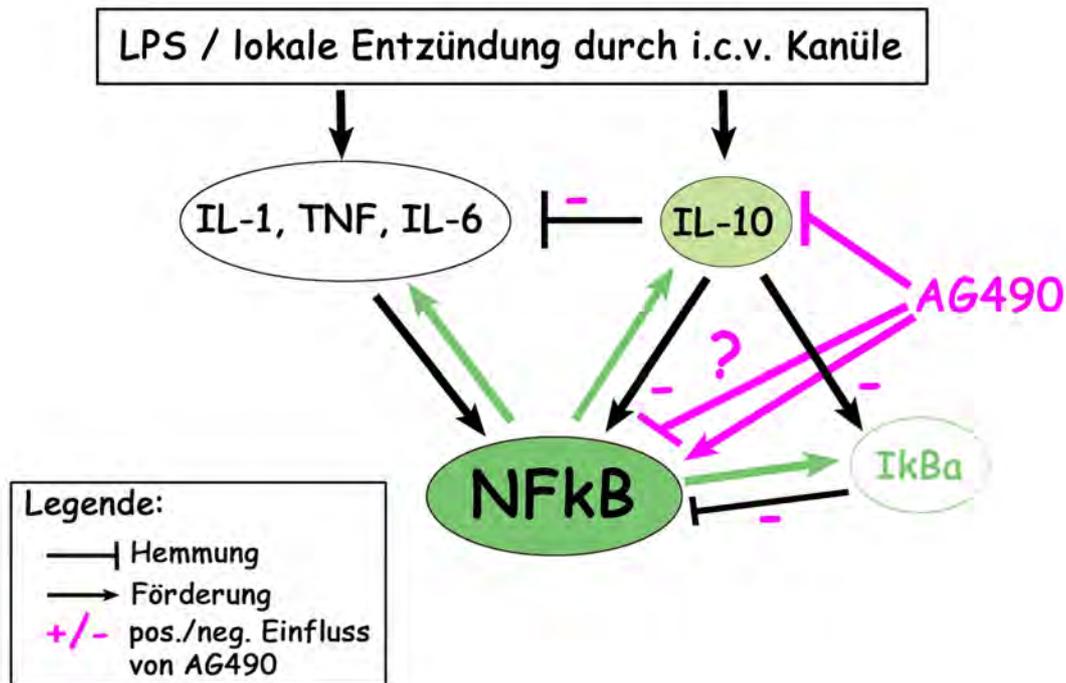


Abb. 99: Mögliche Beeinflussungen von NF-κB-vermittelten Signalwegen im Hypothalamus durch AG490

Die direkte Beeinflussung von NF-κB durch AG490 ist unklar, einige der beobachteten Expressionsänderungen können aber auch mit Wirkungen auf die NF-κB-Aktivierung zusammenhängen. Nur diese sind schematisch dargestellt. Pfeile drücken generell einen fördernden, Striche einen hemmenden Einfluss aus. Mögliche Beeinflussungen der komplexen, z.T. hypothetischen Mechanismen durch AG490 sind anhand von + oder - angegeben.

Schließlich sind noch die Interaktionen zwischen den hier untersuchten Transkriptionsfaktoren untereinander zu berücksichtigen. In diesem komplizierten Netzwerk findet zum Einen eine Regulation der Menge und Aktivität einzelner Vertreter durch die jeweils anderen statt, zum Anderen können Transkriptionsfaktoren aber auch synergistisch in Bezug auf Geninduktionen wirken und je nach Zusammensetzung situationsspezifisch Veränderungen der Aktivität einzelner kompensieren. Beispielsweise wurde der Einfluss der NF-IL6-Aktivität auf die NF-κB-Aktivität für Makrophagen nachgewiesen (Cappello et al., 2009), wonach NF-IL6 die verfügbare Menge an IκBa senken und so NF-κB-Wirkungen verstärken kann. Nakajima et al. (2011) stellten kürzlich eine Hemmung von NF-κB über die Aktivierung von NF-IL6 fest, wobei scheinbar beide Isoformen (LAP und LIP) diesen Effekt ausübten. Die Interaktion dieser beiden Transkriptionsfaktoren, z.B. am IL-6-Promotor (Matusaka et al., 1993), macht deutlich, dass die Inhibition oder Förderung eines der beiden durch AG490 sowohl zur Steigerung, als auch zur unveränderten Expression dieses Zytokins geführt haben könnte. Für STAT-Vertreter ist in diesem Zusammenhang, neben direkten Einflüssen am NF-IL6-Promotor (Foka et al., 2001), die Bedeutung von STAT3 für die NF-IL6-Synthese im Rahmen des „tethering“ interessant. Dabei wird die NF-IL6-Induktion ohne eigenständige Promotorbindung von STAT3 ermöglicht (Niehof et al., 2001). Für die dargestellten veränderten Expressionen von Transkriptionsfaktoren selbst, sowie für die damit verbundene Induktion potentieller Mediatoren, ist daher in der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich zusätzlich zu den erläuterten, möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismen, eine Bedeutung von Interaktionen zwischen diesen Transkriptionsfaktoren anzunehmen.

2.2.2. Expression potentieller Mediatoren im Hypothalamus

In der vorliegenden Studie war nach AG490 Behandlung lediglich die LPS-induzierte IL-10 Expression zum Zeitpunkt 8 Stunden signifikant verringert (Abb. 73, S. 176), was mit der übersteigerten Fieberreaktion dieser Tiere im Einklang steht (vgl. I., 2.1.7.1., S. 224). Die relativ erhöhten basalen Konzentrationen von IL-1 β , TNF α und IL-6 im Hypothalamus weisen auf starke Effekte der lokalen Inflammationsreaktion im Injektionsbereich hin (siehe auch Kap. 2.1.): In diesem Gewebe konnte, anders als in der ersten Teilstudie, keine Induktion von IL-1 β durch LPS-Einwirkungen zum Zeitpunkt 8 Stunden gezeigt werden (Abb. 54, S. 149 bzw. Abb. 73, S. 176). Vermutlich wurde dieser Effekt durch lokale Zytokinsynthese überdeckt.

Bezüglich TNF α zeigten Peña et al. (2010), dass AG490 direkt zur Senkung der TNF α -Konzentration führen kann. Falls eine entsprechende Hemmung auch in der vorliegenden Studie stattfand, so war dies vermutlich zu früheren Zeitpunkten der Fall, so dass die Reaktion nach 8 Stunden nicht mehr nachweisbar war. Für solch ein Szenario spricht wiederum die verstärkte Fieberreaktion nach Vorbehandlung mit AG490, da TNF α nachgewiesenermaßen auch ein anti-inflammatorisches Potential besitzt, das für Krankheitsverläufe sowohl nach Verabreichung hoher (Roth, 2006; Töllner et al., 2000) als auch moderater LPS-Dosen (Goldbach et al., 1997; Klir et al., 1995; Long et al., 1990; Roth et al., 1998a) besteht. Somit ist TNF α ein weiterer Mediator (neben IL-10), dessen Induktionshemmung durch AG490 zu dem erhöhten Fieber beigetragen haben könnte. Des Weiteren besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der nachgewiesenermaßen gehemmten IL-10-Induktion und der vermuteten, zeitgleichen oder vorhergehenden Reduktion von TNF α , da TNF α einen wichtigen Induktor von IL-10 darstellt (Wanidworanun & Strober, 1993; siehe auch S. 233). Somit bietet eine nicht-detektierbare Verringerung von TNF α einen weiteren ursächlichen Erklärungsansatz für die beobachtete Hemmung der IL-10-Induktion.

Eine erhöhte IL-6-Induktion durch das Fehlen von IL-10 wurde von Leon et al. (1999) gezeigt, was allerdings vor allem in frühen Phasen der Fieberreaktion stattfand. Unter Berücksichtigung der möglichen Einwirkungen lokaler Effekte auf die LPS-bedingte IL-6-Expression, konnte in der vorliegenden Studie in AG490-vorbehandelten Tieren ein ähnlicher Trend festgestellt werden.

Tendenziell nach 24 Stunden steigende Mengen an IL-1 β und IL-6 stehen wiederum im Einklang mit der beobachteten übersteigerten Entzündungsreaktion und damit auch mit der zunächst absinkenden IL-10-Konzentration.

Für IL-1ra, den endogenen Antagonisten IL-1 β -vermittelter Signalwege, stellte sich die mRNA-Expression nach 8 Stunden ebenso wie für IL-1 β selbst uneinheitlich dar (Abb. 73, S. 176), was sich ebenfalls auf lokale Effekte der Injektion zurückführen lässt. Tendenziell war jedoch analog zu IL-10 eine Verringerung der IL-1ra-mRNA-Menge zu erkennen. Da IL-10 einen starken Stimulus der IL-1ra-Expression darstellt (Bluthe et al., 1999), ist die Hemmung der IL-1ra-Induktion parallel zum Absinken von IL-10 eine logische Konsequenz. Außerdem ist anzunehmen, dass verringerte Konzentrationen beider Zytokine gemeinsam an der verstärkten Fieberreaktion nach LPS im Anschluss an die Behandlung mit AG490 beteiligt sind. Eine erfolgreiche Inhibition der STAT3-Aktivierung könnte ebenso zu verminderten Konzentrationen von IL-1ra führen, da dessen Promotor eine entsprechende Konsensussequenz enthält. Außerdem erwies sich die synergistisch durch LPS und IL-10-bedingte IL-1ra-Induktion als STAT3-abhängig (Carl et al., 2004). Ebenso wie für IL-10 bestand in der vorliegenden Studie für IL-1ra, gegenüber der Cremophor-vorbehandelten Kontrollgruppe, 24 Stunden nach LPS-Stimulation ein Trend zur vermehrten mRNA-Expression.

Dies kann als kompensatorischer Mechanismus der zunächst verstärkten Inflammationsreaktion interpretiert werden.

Mit COX2 und mPGES wurden die entscheidenden Enzyme der PGE₂-Synthese nach LPS-Stimulation in beiden Gruppen induziert (Abb. 74, S. 177). Die für COX ange deutete und für mPGES signifikante Verstärkung dieser Induktion durch AG490-Vorbehandlung steht vermutlich mit der verringerten IL-10-Expression im Zusammenhang. Berg et al. (2001) deuteten die gesteigerte PGE₂-Produktion in IL-10-defizienten Mäusen als Folge einer vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine nach inflammatorischer Stimulation in diesen Tieren (siehe auch S. 225). Eine direkte Beeinflussung der COX2-Expression über IL-10 ist außerdem möglich, was über NF-κB (Berg et al., 2001), aber auch anteilig über NF-IL6 vermittelt sein könnte (Chen et al., 2003; Gorgoni et al., 2001; Uematsu et al., 2002). Eine unabhängige Regulation der COX2- und mPGES-Expression wurde in Mikrogliazellen gezeigt (de Oliveira et al., 2008), womit sich die deutlichere Induktion von mPGES erklären lässt.

Insgesamt sind die Ergebnisse auf molekularer Ebene im Hypothalamus in Bezug auf die beobachteten Beeinträchtigungen der erhobenen physiologischen Parameter (vgl. Kap. IV., 2.1.7.) größtenteils schlüssig. Im Zusammenhang mit den diskutierten, hypothetischen Einflüssen der Inhibition der JAK2 auf die bedeutenden Transkriptionsfaktoren STAT3, NF-IL6 und NF-κB (Kap. IV., 2.2.1.) erschließt sich damit ein in sich geschlossenes Bild. Demnach hätte sich die Inhibition der Aktivierung von STAT3 und NF-IL6 vor allem auf die frühe Expression von IL-10 im Hypothalamus ausgewirkt, was insgesamt eine verstärkte inflammatorische Antwort dort ausgelöst haben könnte. Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren und Mediatoren untereinander, langfristige Effekte der Inhibition und zusätzliche Signalwege, wie die Aktivierung der HPA-Achse, lassen die einzelnen Beobachtungen zu einem komplexen Gesamtbild verschmelzen, welches nur einen Einblick in die Bedeutung JAK2-vermittelter Wege und der Beteiligung insbesondere von NF-IL6 im Gehirn im hier dargestellten Kontext erlaubt. Eine detaillierte Aufklärung einzelner mechanistischer Zusammenhänge ist im Rahmen einer *in vivo* Studie nicht möglich. Es konnten hier jedoch zahlreiche interessante Hinweise auf mögliche Zusammenhänge aufgezeigt werden, welche durch die isolierte Betrachtung von Einzelaktionen *in vitro* nicht darstellbar sind. Diese liefern in Bezug auf den medizinischen Einsatz von Inhibitionsstrategien wertvolle Informationen über mögliche Probleme und Limitationen für die Verwendung entsprechender, möglicherweise therapeutisch zu nutzender Substanzen.

2.3. Systemische Auswirkungen der Injektion

Trotz der lokalen Verabreichung von AG490 in den Lateralventrikel, ist nicht auszuschließen, dass der Inhibitor selbst oder durch seine Verabreichung induzierte Mediatoren über die Cerebrospinalflüssigkeit auch den Blutkreislauf erreicht haben und dort Wirkungen entfaltet haben könnten. Dagegen spricht, dass sich die Plasmakonzentrationen von IL-6 nach 8 Stunden für die beiden LPS-stimulierten Gruppen (vorbehandelt mit AG490 oder Cremophor® EL) nicht unterschieden (Abb. 64, S. 165). Nach 24 Stunden fiel allerdings eine anhaltende Erhöhung der IL-6-Plasmakonzentration in Cremophor-vorbehandelten Kontrolltieren auf. Ursächlich könnte einerseits die Inflammation im ZNS sein, die nachgewiesenermaßen auch Zytokinfreisetzung ins Plasma bewirken kann (vgl. Kap. IV., 2.1.3.; S. 222.). Langfristig könnte hierbei AG490 diesen Effekt in Bezug auf IL-6 unterdrückt haben. Der zugrundeliegende Mechanismus kann anhand der Zytokin-mRNA-Konzentrationen im Gehirn und den Plasmazytokinwerten zu den gegebenen Zeitpunkten nicht

eindeutig geklärt werden. Eventuell könnte die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der IL-6-Konzentration im Plasma zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen.

2.4. Zukünftige weiterführende Untersuchungen basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen der eigenen Studie

Im Hinblick auf zusätzliche Studien, die für die Prüfung einiger hier aufgestellter Hypothesen sinnvoll sind und zur näheren Aufklärung mechanistischer Zusammenhänge beitragen können, ist zunächst auf das Lösungsmittel Cremophor® EL als möglicher Faktor der Beeinflussung auftretender Veränderungen einzugehen. So ergaben Studien zur chronischen Verabreichung von Cremophor® EL eine Veränderung der Leberenzyme AST (Aspartat-Aminotransferase) und ALT (Alanin-Aminotransferase; Gutierrez et al., 2006). Ein dosisabhängiges, anti-nociceptives Potential der Substanz (Tabarelli et al., 2003) könnte außerdem zumindest auf anti-inflammatorische Eigenschaften hindeuten. Andererseits wurde die Aktivierung von Komponenten des Komplementsystems durch Cremophor® EL nachgewiesen (Szebeni et al., 1998), was wiederum dessen fördernde Einflussnahme auf inflammatorische Prozesse wahrscheinlich macht. Eine Aktivierung von NF- κ B, sowie die Induktion von iNOS durch Cremophor® EL, konnten zwar ausgeschlossen werden (Gutierrez et al., 2006), jedoch liegen noch keine Daten zu anderen relevanten und im Rahmen der hier bearbeiteten Fragestellung untersuchten inflammatorischen Markern und Akteuren vor, so dass deren Beeinflussung nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings keine offensichtlichen Effekte in Kontrollgruppen (Crem & PBS) nach Verabreichung von Cremophor® EL auftraten und insgesamt nur sehr geringe Mengen einmalig verabreicht wurden, ist ein signifikanter Einfluss des Lösungsmittels für die spezielle Sachlage dieser Studie äußerst unwahrscheinlich. Einsätze von Cremophor® EL in anderen Kontexten, die der Untersuchung inflammatorischer Prozesse dienen, sollten allerdings im Hinblick auf die möglichen Eigenwirkungen des Lösungsmittels kritisch überprüft und durch geeignete Kontrollen abgesichert werden. Gerade weil Cremophor® EL ein wichtiges Lösungsmittel zum Beispiel in der Krebstherapie (Taxotere®) darstellt sind solche Untersuchungen auch von klinischem Interesse.

Da bei der Betrachtung der physiologischen Parameter in dieser Teilstudie die Diskrepanz zwischen verstärkter Fieberreaktion und verminderter Lethargie den auffälligsten Befund darstellt, sollte dies durch zusätzliche Untersuchungen verifiziert werden. Zum Einen kommt dabei ein Versuchsaufbau im sog. „reversed cycle“ in Frage, bei dem die Injektionen nicht zu Beginn der Hell- sondern der Dunkelphase erfolgen. Da Ratten als nachtaktiv gelten, würden die Hemmung der lokomotorischen Aktivität durch LPS, sowie eine mögliche Unterdrückung dieses Effekts durch AG490, dadurch deutlicher erkennbar. Zusätzlich könnte sich die Untersuchung der „freiwilligen Aktivität“ im Sinne einer zusätzlichen körperlichen Betätigung der Tiere als sinnvoll erweisen. Skinner et al. (2009) stellten fest, dass die Bereitschaft von Ratten, sich in einem Laufrad zu bewegen, nach systemischer Injektion verschiedener LPS-Dosen ein sensitiverer Marker für „sickness-behavior“ sein kann als die reine Grundaktivität der Tiere im Käfig. Der Parameter der „freiwilligen Aktivität“ zeigte dabei schon für subfebrile Dosen LPS-vermittelte Veränderungen und korrelierte am Deutlichsten mit der jeweils verabreichten Dosis. Auch für zentral injizierte Zytokine (IL-1 β , IL-6) erwies sich die Erhebung der Aktivität im Laufrad als sensibles Messinstrument (Harden et al., 2008).

Um Mechanismen und Zusammenhänge auf molekularer Ebene überprüfen zu können bzw. klarer erkennbar zu machen, ist die Betrachtung der Parameter zu einem oder mehreren zusätzlichen Zeitpunkten erforderlich. Neben dem Zeitpunkt 8 Stunden nach LPS-Injektion, der als Maximum

der NF-IL6-Proteininduktion festgestellt wurde (Abb. 47, S. 137 & Abb. 48, S. 139), könnten Ergebnisse 2 oder 4 Stunden im Anschluss an die Verabreichung Aufschlüsse auf Zielgeninduktionen ermöglichen, welche ihre Maxima in der ersten Teilstudie nach 4 Stunden aufwiesen (Abb. 53, S. 148). Zusätzlich wären Veränderungen der Aktivitäten von NF- κ B und insbesondere STAT3 durch den Inhibitor AG490 in dieser früheren Phase der inflammatorischen Reaktion besser beurteilbar. Die Betrachtung der Zytokinkonzentrationen im Bereich kurz vor und nach dem Zeitpunkt 24 Stunden könnte die Möglichkeit gegenregulatorischer Effekte näher beleuchten und die angedeutete Induktion anti-inflammatorischer Zytokine in dieser späten Phase bestätigen.

Proteindetektion im Western Blot würde sehr geringe Effekte von AG490 sichtbar machen, indem beispielsweise die STAT3/p-STAT3-Ratio bestimmt und damit eine evtl. nur geringfügig ausfallende Hemmung der Phosphorylierung aufgedeckt werden könnte. Ebenso wäre für NF-IL6 zu verfahren, wobei hier das Verhältnis der aktiven Form LAP zur inhibierenden Form LIP von zentraler Bedeutung ist, da Veränderungen dieser Ratio vermutlich als Ursache für einige der beobachteten Effekte in Frage kommen. Eine weitere Möglichkeit, Veränderungen der transaktivierenden Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren darzustellen, sind Bindungsstudien an ausgewählten Promotoren, die im Rahmen der vorliegenden Studie bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten. Dadurch könnten allerdings auch Einflüsse von Interaktionen verschiedener Transkriptionsfaktoren genspezifisch dargestellt werden.

Als zusätzliche Parameter könnten IL-10-Konzentrationen im Plasma und im Hypothalamus auf Proteinebene von Interesse sein, um die wahrscheinlich zentrale Bedeutung dieses Zytokins für die beobachteten Effekte genauer eingrenzen zu können. Als weiterer Mediator könnte NO eine entscheidende Rolle spielen, so dass eine Untersuchung der iNOS-Aktivität bzw. der Aktivität des Mediators selbst im Hypothalamus interessante neue Erkenntnisse liefern könnte, da neben den möglichen Einflüssen von NO auf die Adipsie (Kap. IV., 2.1.7.3.) auch sein antipyrogenes Potential vor allem im OVLT (Lin & Lin, 1996, 1996 a) von Interesse ist.

2.5. Anwendung des Mechanismus der RNAi

Nach Verwendung des relativ unspezifischen Inhibitors AG490 sollte in einer dritten Teilstudie nun spezifisch die Rolle von NF-IL6 für die Entstehung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome im Verlauf LPS-induzierter systemischer Entzündungsreaktionen untersucht werden. Ein Vergleich dieser neuen Erkenntnisse mit den Ergebnissen aus der ersten und zweiten Teilstudie sollten hierdurch ebenfalls weitere Erkenntnisse über die anderen untersuchten Signalwege (STAT3, NF- κ B) ermöglichen.

Die spezifische Inhibition NF-IL6-vermittelter Effekte im Rahmen der inflammatorischen Reaktion durch siRNA kann grundsätzlich über zwei verschiedene Wege erreicht werden. Die Degradation der NF-IL6-mRNA durch den Mechanismus der RNAi hemmt die Neusynthese des Transkriptionsfaktors, was zum Einen zu einer langfristigen Erniedrigung an verfügbarem NF-IL6 führt. So sollten Geninduktionen, die auf einer Aktivierung und nukleären Translokation vorhandener NF-IL6 beruhen, verringert werden, vorausgesetzt, dass die siRNA länger wirksam ist als die „turnover-Rate“ des Proteins beträgt. Im Falle einer zentralen Bedeutung der induzierten *de novo* Synthese von NF-IL6, wie sie die erste Teilstudie vermuten ließ (Kap. IV., 1.1.5.), müsste die Wirksamkeit der siRNA auch für den Zeitpunkt der inflammatorischen Stimulation gewährleistet sein, um die induzierte Produktion des Proteins, und damit seine Wirkung vor Ort, zu verhindern. Grundsätzlich wird von einem „knockdown“ ab 48 Stunden nach Applikation und einer Wirkdauer von 5 - 7 Tagen

ausgegangen (Akhtar & Benter, 2007b; Christoph et al., 2006; Kurreck, 2009). Dabei sind allerdings auch gewebsspezifische Unterschiede und die jeweilige Distribution der siRNA zu berücksichtigen.

2.5.1. Kritische Betrachtung der Ergebnisse nach Verwendung von anti-NF-IL6-siRNA

Anders als erwartet, konnte eine Hemmung der NF-IL6-Expression in der dritten Teilstudie dieser Arbeit weder auf mRNA Ebene noch Immunhistologisch eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 92, S. 201 & Abb. 94/95 S. 204/205). 28 oder 48 Stunden nach i.c.v. Verabreichung der siRNA wurde weder die basale noch die induzierte NF-IL6-Expression verringert. Möglicherweise war zu diesem Zeitpunkt der „pool“ an potentiell aktivierbaren NF-IL6 noch zu groß, als dass eine Verringerung sichtbar geworden wäre. Andererseits ist aber nach LPS-Stimulation weiterhin eine tendenzielle Induktion der NF-IL6-mRNA erkennbar, die darauf hindeutet, dass zum Zeitpunkt der Stimulation keine ausreichende Konzentration an wirksamer siRNA im Hypothalamus vorgelegen haben könnte. Grundsätzlich konnte allerdings mit Hilfe der FITC-markierten siRNA eine gute Verteilung und Aufnahme des i.c.v.-applizierten Bolus in das Gehirnparenchym 24 Stunden nach Injektion eindeutig gezeigt werden (Abb. 82, S. 187). Dieses Ergebnis entsprach der dokumentierten Distribution in einer vorangegangenen Studie (Niizuma et al., 2008), in der sich die siRNA-Applikation (die analog zur dritten Teilstudie der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden war) als erfolgreich erwies. Dass der gewünschte Effekt auf die NF-IL6-mRNA-Expression in der vorliegenden Studie nicht erzielt wurde, könnte durch eine unzureichende Wirksamkeit erklärt werden. Andererseits ist es denkbar, dass die verabreichte siRNA zu stark verdünnt oder aber in zu großem Maße abgebaut wurde. Eine zusätzliche NF-IL6-Induktion durch die lokale Inflammation (Kap. IV., 2.1.) könnte darüber hinaus hemmende Effekte verringert haben.

Entsprechend den Ergebnissen auf mRNA-Ebene war auch immunhistochemisch keine Verringerung von NF-IL6 auf Proteinebene erkennbar (Abb. 94/95 S. 204/205). Anhand der Ergebnisse aus der ersten Teilstudie war generell mit einer schwachen NF-IL6-I.R. in Tieren 24 Stunden nach LPS-Stimulation zu rechnen. Dies bestätigte sich durch die semiquantitative Auswertung exemplarisch im OVLT (Tab. 45, S. 206). Eine basale NF-IL6-I.R. in i.c.v.-vorbehandelten PBS-Kontrolltieren lag zwar in geringem Maße vor, fiel aber deutlich schwächer aus als in der zweiten Teilstudie. Dies ist wahrscheinlich auf das längere Zurückliegen der i.c.v. Behandlung zurückzuführen, so dass daraufhin auftretende Reaktionen schon wieder im Abklingen begriffen gewesen sein dürften. Interessant war hier eine fehlende Grundinduktion von NF-IL6 in anti-NF-IL6-siRNA-behandelten Kontrollgruppen, was wiederum auf die Möglichkeit einer frühen Unterdrückung der NF-IL6-Aktivität durch die siRNA hindeutet.

Eine generelle Limitation für den Einsatz der RNAi sind unspezifische Nebeneffekte (Kap. I., 5.3.). Da die Aktivierung des Interferonsystems durch Einschleusung künstlicher Oligopeptide ein häufiges Problem in der Anwendung von siRNA darstellt, wurde in dieser Teilstudie die Induktion von IFN α im Hypothalamus exemplarisch überprüft. Eine entsprechende Induktion durch die anti-NF-IL6-siRNA wurde zu keinem der untersuchten Zeitpunkte festgestellt (Abb. 93, S. 202). „Off-target“ Effekte (Kap. I., 5.3.) auf andere Gene als NF-IL6 durch die siRNA, waren in der vorliegenden Studie anhand von Veränderungen inflammatorischer Parameter ebenfalls nicht detektierbar.

Neben den Ergebnissen nach Injektion von FITC-markierter RNA sprechen einige der erhobenen Daten zumindest für eine erfolgreiche Transfektion in dieser Studie, auch wenn offensichtlich die erwünschte Inhibitionswirkung zum geplanten Zeitpunkt nicht erzielt werden konnte. So zeigte sich

in den verschiedenen Gruppen eine unterschiedliche Reaktion auf die Injektion an sich: anti-NF-IL6-siRNA-behandelte Tiere zeigten am häufigsten eine direkte Fieberreaktion, die dann auch stärker ausfiel als in den anderen Gruppen (Abb. 84, S. 189). Dies könnte auf relativ kurzfristige Effekte der siRNA im Gehirn, wie beispielsweise die Aktivierung von TLR7 als wichtiger Vermittler z.B. durch virale RNA ausgelöster Mechanismen hinweisen (Akira & Takeda, 2004; Damm et al., 2012), die sequenzspezifisch für die anti-NF-IL6-siRNA und die Kontroll-RNA unterschiedlich stark ausfielen. *In vitro* war allerdings das inflammatorische Potential der ausgewählten siRNA anhand der im Überstand induzierten Zytokinkonzentrationen bereits getestet und kein nennenswerter Effekt nachgewiesen worden (Abb. 78 & Abb. 79, S. 183). Eine potente Stimulation von TLR7 war demnach bereits für Neurone und Gliazellen im Vorhinein ausgeschlossen worden. Generell ist, wie schon in der zweiten Teilstudie, aber auch von volumenbedingten Effekten der Injektion in den Ventrikel auszugehen. In Einzelfällen zeigten Tiere, die nur das Lösungsmittel erhalten hatten, auch eine geringgradige Fieberreaktion (vgl. Kap. IV., 2.1.3.). Dass in einigen Tieren aller Gruppen kein Fieber auftrat, ist möglicherweise auf die verschiedenen Gegebenheiten am Injektionsort zurückzuführen: So ist die Anzahl und Lokalisation reaktiver Mikrogliazellen um den Injektionsort, welche die mechanische Beeinflussung durch die Injektion wahrnehmen (vgl. Kap. IV., 2.1.3.) und die Fieberreaktion vermitteln können, aller Wahrscheinlichkeit nach für jedes Tier nach Implantation der Kanüle individuell etwas unterschiedlich. Die mit anti-NF-IL6-siRNA behandelten Tiere zeigten auch im Anschluss an die i.c.v. Injektion in mehr Fällen eine deutliche Abnahme der Futter- und Wasseraufnahme, eine stärkere Abnahme der Körpermasse sowie der lokomotorischen Aktivität (Abb. 87-89, S. 194-198). Außer einer sequenzspezifischen Aktivierung antiviraler Strategien und folgender Auslösung von „sickness-behavior“ durch die siRNA ist auch eine frühe und kurzfristige Hemmung durch die anti-NF-IL6-siRNA denkbar, die sich nur auf die durch die Injektionen verursachten inflammatorischen Reaktionen auswirkte und zur Zeit der LPS-Injektion 24 Stunden später nicht mehr wirksam war. Demnach könnte über eine normalerweise vorwiegend anti-inflammatorische Rolle von NF-IL6 im Rahmen der durch Mikrogliazellen vermittelten Reaktionen auf lokale Irritationen spekuliert werden, die eine übertriebene inflammatorische Antwort unter physiologischen Bedingungen verhindert. Dies würde sich mit der im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Bedeutung von Mikrogliazellen als NF-IL6-reaktive Zellpopulation und Studien zum neuroprotektiven Potential von NF-IL6 im Verlauf zentraler Inflamationsprozesse (Kap. IV., 2.1.1.) decken. Allerdings würde dies voraussetzen, dass die „turnover Rate“ von NF-IL6 extrem kurz ist und so schon wenige Stunden nach der Transfektion seine Menge signifikant reduziert wurde. *In vitro* wurde das grundsätzliche Potential der siRNA-Sequenz nachgewiesen, die NF-IL6-Synthese zu verringern (Abb. 76 bzw. Abb. 77, S. 179 bzw. 181). Dabei fiel vor allem auf, dass die am stärksten beeinflussten Zellen Astrozyten waren, während Mikrogliazellen und Neurone keine so deutlich sichtbar verminderte NF-IL6-Expression aufwiesen (Abb. 77). Derartige zellspezifische Unterschiede der Effizienz von siRNA können z.B. durch das jeweils verwendete Transfektionsmedium entstehen, welches speziell für die Einschleusung in bestimmte Zelltypen zusammengesetzt ist. Wenn man von ähnlichen Verhältnissen *in vivo* ausgeht, ist ebenfalls eine zellspezifische Wirkung zu berücksichtigen, obwohl aus technischen Gründen ein anderes Transfektionsmedium verwendet wurde. Die offensichtliche Beteiligung von Mikrogliazellen an der Induktion lokal bedingter Effekte, aber auch an der Signaltransduktion peripherer inflammatorischer Signale über humorale bzw. neuronale Signalwege, könnte demnach unterschiedlich durch siRNA beeinflusst werden (Kap. I., 2.2.2.). Ergebnisse aus der *in vitro* Studie zeigten außerdem tendenziell, dass die IL-6-Produktion in neuroglialen Kulturen durch anti-NF-IL6-siRNA unterdrückt werden kann, was

für TNF α nach 6 Stunden nicht der Fall war (Abb. 78 & 79, S. 183). Ergebnisse der *in vivo* Studie konnten diese Feststellung nicht weiter untermauern. Es traten vorwiegend pro-inflammatorische Effekte durch die potentielle Unterdrückung der NF-IL6-Aktivität aufgrund der siRNA-Behandlung zu früheren Zeitpunkten nach LPS-Stimulation auf.

Die Anwendung der RNAi erwies sich also in der dritten Teilstudie der vorliegenden Arbeit vor allem *in vivo* als problematisch, da trotz einer eindeutig erfolgreichen Transfektion der gewünschte Effekt im Hypothalamus nicht erreicht werden konnte. Für die spezifische Bedeutung von NF-IL6 fanden sich Hinweise auf eine mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors auch schon zu früheren Zeitpunkten als den in der ersten Teilstudie als Aktivierungsmaximum festgestellten. Des Weiteren kann man aus den Ergebnissen zusätzliche Hinweise auf die Bedeutung von NF-IL6 im Rahmen lokaler Inflammationsprozesse im Gehirn entnehmen. Insgesamt ist trotz der begrenzten Aussagekraft dieser dritten Teilstudie ein zeitabhängig sowohl pro- als auch anti-inflammatorisches Potential von NF-IL6 denkbar. Für zukünftige Studien könnte z.B. die Verabreichung eines „pools“ von anti-NF-IL6-siRNA verschiedener Sequenzen sinnvoll sein.

2.5.2. Mögliche Einflüsse von NF-IL6 und der Steigerung seiner Expression auf den Verlauf des Krankheitsgeschehens

Insgesamt konnten in dieser Teilstudie (neben dem fehlenden Nachweis einer deutlichen Reduktion der NF-IL6-Expression und Immunreaktivität) ebenfalls nur geringgradige, meist nicht signifikante Effekte auf „sickness-behavior“ durch die siRNA-Behandlung nachgewiesen werden. In Bezug auf die Fieberinduktion durch systemische Stimulation mit LPS, konnte für die ersten 4 Stunden nach der Injektion lediglich die Tendenz einer Fiebererhöhung in der entsprechenden Gruppe beobachtet werden (Abb. 85 B, S. 190). Diese erreichte jedoch keine Signifikanz. Die mögliche individuelle Bedeutung von NF-IL6 für die Entwicklung des Fiebers ist aus diesen Daten nicht klar ersichtlich. Geht man von einer frühen Abnahme eines herunterregulierenden Effekts der anti-NF-IL6-siRNA in den ersten Stunden nach LPS-Stimulation aus, so zeichnet sich für die frühe Phase der Fieberentwicklung ein potentiell anti-inflammatorisches Potential von NF-IL6 ab, da in der mit siRNA vorbehandelten Gruppe das Fieber zusätzlich zur tendenziell stärkeren Ausprägung früher einsetzt (Tab. 35, S. 191). In diesem Fall wäre für den Wirkmechanismus von NF-IL6 eine Bedeutung der nukleären Translokation vorhandener Proteine früh nach LPS-Stimulation denkbar, welche durch frühe Wirksamkeit der anti-NF-IL6-siRNA verringert wurden. Zu späteren Zeitpunkten der inflammatorischen Reaktion könnte hingegen, wie bereits in der ersten Teilstudie postuliert, die *de novo* Synthese eine wichtigere Rolle spielen. Unterstützt wird die angedeutete Hemmung einer evtl. anti-inflammatorischen Funktion von NF-IL6 innerhalb der ersten 4 Stunden nach LPS-Injektion, durch die im Vergleich zur direkten Kontrolle signifikant vermehrte Aktivität anti-NF-IL6-siRNA-vorbehandelter Tiere in diesem Zeitraum (Abb. 87, S. 194). Dies könnte, wie schon in der zweiten Teilstudie, durch eine Übersteigerung des sog. „early sickness syndrome“ (vgl. S. 227) bedingt sein. Dass in keiner der LPS-behandelten Gruppen innerhalb von 24 Stunden eine signifikante Verringerung der lokomotorischen Aktivität auftrat, ist anhand der Reaktionen auf die i.c.v. Injektionen am Vortag erklärbar: Diese „Vorbehandlung“ hatte auch in Tieren der Kontrollgruppen teilweise in geringem Maße „sickness-behavior“ ausgelöst. Folglich lag am Tag der i.p. Stimulation in allen Gruppen noch immer eine verringerte Aktivität vor, welche von der LPS-Stimulation nicht so deutlich beeinflusst wurde wie in den am Vortag unbehandelten Tieren der anderen Teilstudien. Dies zeigt sich auch anhand der verminderten absoluten Zahl an „counts“ in Kontrollgruppen, die im Vergleich zur ersten Teilstudie (ca. 7000, Tab. 17, S. 127) nur ca. 3500 (Tab. 36, S. 193) betrug. Verlängerte Auswirkungen der i.c.v. Injektion am Vortag auf die aufgenommenen Futter- und

Wassermengen, sowie den Verlust an Körpermasse am Tag der LPS-Stimulation in Kontrollgruppen, waren hier nicht eindeutig erkennbar. Tendenziell deutete sich aber dennoch beispielsweise eine Verringerung der aufgenommenen Wassermenge nach LPS-Stimulation an, die aber keine Signifikanz erreichte. Die bereits erwähnte größere Bedeutung der Aktivität als sensitiver Marker von „sickness-behavior“ scheint sich hier zu bestätigen (S. 240).

3. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend weisen die drei Teilstudien der vorliegenden Arbeit auf eine weitreichende und vielschichtige Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 im Rahmen zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome hin. Es konnten folgende Haupt-Hypothesen entwickelt werden:

- NF-IL6 ist ein Aktivitätsmarker, der sich anders als bisher bekannte Marker, zellübergreifend für längerfristige und / oder chronische Entzündungsreaktionen im Gehirn zu eignen scheint.
- Damit kann NF-IL6 sowohl für die Untersuchung direkter nervaler als auch humoraler Kommunikationswege zwischen Gehirn und Peripherie dienen. Seine Bedeutung in Endothelzellen und perivaskulären Makrophagen als wichtige Komponenten humoraler Wege konnte hier erstmals deutlich demonstriert werden.
- NF-IL6 scheint eine zentrale Rolle für die Aktivierung von Mikrogliazellen durch pro-inflammatorische Mediatoren oder mechanische / traumatische Einflüsse zu spielen.
- NF-IL6 könnte sowohl an der Aufrechterhaltung von Krankheitssymptomen als auch an ihrem Abklingen beteiligt sein.
- Sowohl synergistische als auch zeitlich aufeinander aufbauende Funktionen der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT3 und NF-IL6 für die Induktion, Aufrechterhaltung und Beendigung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome sind wahrscheinlich.
- Ein sowohl pro- als auch anti-inflammatorisches Potential von NF-IL6 scheint einerseits zeitabhängig zu sein (frühe anti-inflammatorische gegenüber späteren pro-inflammatorischen Wirkungen) und andererseits durch das Verhältnis der aktiven Isoform LAP zur inhibierenden Isoform LIP bedingt zu sein.
- Für die Regulation dieses Verhältnisses kommt IL-10 vermutlich eine zentrale Bedeutung zu.
- Die *de novo* Synthese von NF-IL6 scheint im Rahmen LPS-bedingter Inflammationsreaktionen der wichtigste Regulationsmechanismus der NF-IL6-Aktivität zu sein.
- Als NF-IL6-aktivierende Mediatoren stehen neben IL-6 vermutlich vor allem TNF α und IL-10 im Vordergrund.
- NF-IL6 scheint in Verbindung mit STAT3 *in vivo* insbesondere eine entscheidende Bedeutung für die hypothalamische Expression der Zielgene COX2, mPGES, TNF α und vor allem IL-10 zu haben.
- Das Protein Trib1 könnte ein wichtiges „Stoppsignal“ LPS-induzierter NF-IL6-Aktivierung im Gehirn von Säugern sein.
- NF-IL6 scheint eine Rolle auf mehreren Ebenen in der HPA-Stressachse zu spielen. Dabei könnte deren Aktivierung durch NF-IL6 vor allem für langfristige Effekte verantwortlich sein.
- Der potentielle JAK2-Inhibitor AG490 könnte therapeutisch Verwendung finden, um Krankheitssymptome abzuschwächen, ohne jedoch Fieber als wichtige Abwehrreaktion des Organismus gegen Infektion zu hemmen.
- Teilweise gegenläufige Einflüsse von AG490 auf die Entwicklung charakteristischer, LPS-induzierter Krankheitssymptome, im Sinne anti-inflammatorischer (Fieber) und inflammatorischer

(Lethargie, Adipsie) Wirkungen, scheinen durch STAT3 und NF-IL6 unabhängig voneinander oder auch gemeinschaftlich vermittelt zu werden.

- AG490 sollte nicht mit der Intention der reinen, spezifischen JAK-STAT3 Inhibition verwendet werden, da durch die Substanz eine Reihe von Signalwegen (wahrscheinlich unter anderem NF-IL6- und STAT3-vermittelte) auf vielschichtige Art und Weise beeinflusst werden.
- Das Lösungsmittel Cremophor® EL kann für i.c.v. Applikationen *in vivo* verwendet werden, scheint aber vor allem bei systemischer Anwendung gewisse Eigeneffekte zu induzieren, die zu berücksichtigen sind.
- Die Anwendung der RNAi *in vivo* stellt sich vor allem für die Untersuchung inflammatorischer Prozesse im Gehirn problematisch dar.

Um die Rolle von NF-IL6 im Verlauf zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome näher einzugrenzen, sind zusätzliche Studien möglicherweise vielversprechend: Zum Einen kann eine komplette Unterdrückung jeglicher NF-IL6-Aktivität durch die Verwendung von NF-IL6-defizienten Tieren evtl. weitere Erkenntnisse liefern. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass diese Tiere eine z.T. generell abweichende Physiologie aufweisen (Kap. I., 3.3.) und daher wie alle „knock-out“ Tiere nicht ohne weiteres mit dem entsprechenden Wildtyp verglichen werden können. Außerdem ist in derartigen Studien eine Unterscheidung von auftretenden Veränderungen (z.B. LPS-bedingte Krankheitssymptome) in Bezug auf zentrale gegenüber peripheren Einflüssen von NF-IL6 nicht möglich. Daher könnten sie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellten Indizien zur Funktionsweise von NF-IL6 im Gehirn nicht eindeutig verifizieren bzw. widerlegen. Kompensationsmechanismen, die häufig in defizienten Tieren greifen und in diesem Fall eine veränderte Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren darstellen könnten, müssten außerdem überprüft und möglichst ausgeschlossen werden. Zusätzlich zur Verwendung des JAK2-Inhibitors AG490, könnten andere Inhibitoren, die die NF-IL6-Aktivierung negativ beeinflussen können, zu weiteren Erkenntnissen führen. Dabei wäre der potentielle MEK-Inhibitor PD98059 zu erwähnen, der die Aktivierung von ERK-Isoformen unterdrückt (Datenblatt des Herstellers) und so die Phosphorylierung von NF-IL6 im Zellkern direkt beeinflussen könnte (vgl. Kap. I., 3.2.2.1.). In einer Pilotstudie im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwies sich jedoch ein starkes pyrogenes Potential dieses Inhibitors bei i.c.v. Injektion als Hindernis, so dass dieses Problem z.B. über andere Applikationswege zunächst zu lösen wäre. Auch die Verwendung von Tieren, die Defizienzen an Zytokinrezeptoren aufweisen, könnte wertvolle Auskünfte über NF-IL6-Signalwege liefern. Für den IL-6-Rezeptor wurde diese Methode von Fielding et al. (2008) zur Untersuchung von STAT3-Bedeutungen für die Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten erfolgreich angewandt. Schließlich könnte die Rolle der allgemein als negativer Inhibitor angesehenen NF-IL6-Isoform LIP z.B. über deren zentrale Überexpression im Zuge der Inflammation eingegrenzt werden. Die Bestimmung der ACTH-Konzentration im Plasma LPS-stimulierter Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten im Zusammenhang mit der NF-IL6-Aktivierung könnte Hinweise auf eine Bedeutung der HPA-Achse liefern. Außerdem sollte den Hinweisen auf die Bedeutung von NF-IL6 im Rahmen von Stressreaktionen nachgegangen werden, was durch die genauere Charakterisierung NF-IL6-reaktiver Zellen in der Hypophyse im Anschluss an LPS-Stimulationen oder aber durch die Untersuchung der NF-IL6-Aktivität im Rahmen anderer Aktivierungsmechanismen der HPA-Achse, wie beispielsweise psychologischem Stress, erfolgen könnte. Die genaue und detaillierte Kenntnis funktionaler Zusammenhänge in der

Induktion und Aufrechterhaltung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome ist die Grundlage für möglichst gezielte Inhibitionsstrategien, deren klinische Bedeutung vor allem jenseits der hier als Modell genutzten, LPS-bedingten Inflammationsreaktion liegt.

NF-IL6 kann als äußerst vielfältiger Transkriptionsfaktor angesehen werden, der höchstwahrscheinlich in vielen medizinisch relevanten und aktuellen Bereichen von Bedeutung ist. Die Wirkungsweise im Rahmen zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome stellt nur einen Ausschnitt des vielfältigen Spektrums von NF-IL6 dar und bedarf aufgrund ihrer außerordentlichen Komplexität und der bislang nicht vollständig aufgeklärten Beteiligung an verschiedensten Komponenten und Regulationsebenen der zugrundeliegenden Mechanismen umfangreicher und ausführlicher weiterführender Untersuchungen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Systemische Entzündungsreaktionen gehen mit charakteristischen Symptomen wie Fieber, Anorexie, Adipsie, Lethargie und Verminderung der Körpermasse einher. Diese unterliegen der zentralnervösen Kontrolle und werden zusammengefasst auch als „sickness-behavior“ bezeichnet. Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, gehört zu einer Gruppe von hoch konservierten, pathogentypischen Molekülstrukturen, den sog. „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs). LPS löst nach experimenteller, systemischer Applikation in Ratten zuverlässig und reproduzierbar den Symptomkomplex „sickness-behavior“ aus. Für die Übermittlung inflammatorischer Stimuli aus der Peripherie an übergeordnete, regulatorische Zentren des ZNS hat unter anderem der sogenannte humorale Signalweg eine zentrale Bedeutung. Er beschreibt das Einwirken zirkulierender Mediatoren auf bestimmte, exponierte Gehirnareale und die nachfolgende Weiterleitung der entsprechenden Signale zu spezifischen Gehirnstrukturen. Dabei kommt den sogenannten circumventrikulären Organen (CVO) eine zentrale Rolle zu, da ihre im Allgemeinen als „undicht“ bezeichnete Blut-Hirn-Schranke den direkten Kontakt von Signalmolekülen mit Hirnzellen ermöglicht. Des Weiteren sind vor allem Endothelzellen des Gehirns und perivaskuläre Makrophagen an der Signalübermittlung beteiligt. Die am Ende verschiedener Kommunikationswege zwischen Peripherie und ZNS stehende, genomische Aktivierung von Zellen innerhalb der entsprechenden regulatorischen Zentren im Hypothalamus wird über spezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt, die damit gleichzeitig als Aktivierungsmarker im Gehirn angesehen und zur Darstellung entsprechender Aktivierungsvorgänge verwendet werden können. Neuroanatomisch charakteristische Expressionsmuster nach systemischer Inflammation wurden in der Vergangenheit im Gehirn z.B. für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 aufgezeigt, die vorrangig mit der Induktion aber auch der Aufrechterhaltung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome in Verbindung gebracht werden. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die neuroanatomische Charakterisierung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 (Nuclear Factor IL-6), einem Mitglied der sog. Transkriptionsfaktor-Superfamilie „bZIP“. Im Speziellen wurde seine spezifische Rolle im Gehirn für die Induktion, Ausprägung und Aufrechterhaltung von Krankheitssymptomen, sowie sein Zusammenspiel mit STAT3 und NF- κ B im Verlauf systemischer Inflammationsreaktionen näher untersucht.

In drei einzelnen Teilstudien stellte sich NF-IL6 nach intraperitonealer Injektion von 100 μ g bzw. 1 mg/kg KM LPS gegenüber PBS-behandelten Kontrollen als ein weiterer Aktivierungsmarker im Gehirn dar. Erstmals konnte ein deutliches, zeitabhängiges Muster der LPS-induzierten NF-IL6-Immunreaktivität (I.R.) gezeigt werden. Dabei trat die maximale Signaldichte und -intensität im Gehirn im Zeitraum zwischen 6 und 8 Stunden nach einem LPS-Stimulus auf und konzentrierte sich auf Hirnstrukturen und Zellen, die an der Übermittlung und Weiterleitung peripherer inflammatorischer Signale an das ZNS und der Induktion und Aufrechterhaltung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome beteiligt sind. Dazu gehörten z.B. die sensorischen CVO (*Organum vasculosum laminae terminalis*, OVLT; *Organum subfornicale*, SFO; *Area postrema*, AP) und Zellen der Blut-Hirn-Schranke. Eindeutig konnte erstmals neben Astrozyten, Mikrogliazellen und Neuronen außerdem die Bedeutung von NF-IL6 in Endothelzellen und perivaskulären Makrophagen im Gehirn demonstriert werden. Entsprechend dieser Ergebnisse scheint NF-IL6 ein neuer „später“ Zellaktivierungsmarker zu sein, der möglicherweise anders als bisher bekannte Marker, zellübergreifend und auch im Verlauf längerfristiger und / oder chronischer Entzündungsreaktionen im

Gehirn, für Untersuchungen sowohl direkter neuraler als auch humoraler Kommunikationswege zwischen Gehirn und Peripherie geeignet ist. Als Hauptregulationsmechanismus der NF-IL6-Aktivität im Rahmen LPS-bedingter Inflammationsreaktionen trat die *de novo* Synthese von NF-IL6 in den Vordergrund. Die aktivierende Isoform des Proteins (LAP) wurde nach Stimulation mit 100 µg/kg KM LPS im Western Blot und immunhistochemisch im Vergleich zu Kontrolltieren vermehrt im Gehirn nachgewiesen.

Funktionell ist eine Rolle von NF-IL6 anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowohl für die Aufrechterhaltung von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen, als auch für deren Abklingen denkbar; der Transkriptionsfaktor scheint sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften aufzuweisen. So korrelierte die maximale LPS-bedingte NF-IL6-I.R. nach Verabreichung von 100 µg bzw. 1 mg/kg LPS mit der Plateauphase bzw. einer jeweils stabilen Phase des resultierenden Fiebers, sowie einer verlängerten Expression des wichtigen Mediators IL-6 im Blutkreislauf. Parallel wurden potentielle pro-inflammatorische (COX2, mPGES, IL-1β), sowie anti-inflammatorische (IL-10) NF-IL6-Zielgene im Hypothalamus induziert. Außerdem verursachte die gezielte Blockade einer JAK2-vermittelten NF-IL6-Aktivierung im Gehirn, verbunden mit der gleichzeitigen Inhibition der STAT3-Aktivierung, durch den spezifischen Inhibitor AG490 (3 µg, intracerebroventrikulär; i.c.v.) dissoziierende Veränderungen von LPS-induzierten Krankheitssymptomen im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt worden waren. Die Ausprägung dieser Symptome wurde durch die JAK2-Inhibition sowohl teilweise verstärkt (Fieber) als auch vermindert (Lethargie, Adipsie). Hier zeigte sich vor allem ein bedeutender Zusammenhang von STAT3- und NF-IL6-bedingten Signalwegen für die IL-10-Expression im Hypothalamus, da die mRNA-Expression dieses Gens durch die Behandlung mit AG490 signifikant beeinflusst wurde. Außerdem wurde für COX2, mPGES und TNFα die Bedeutung der Kombination von STAT3 und NF-IL6 für die hypothalamische Expression *in vivo* herausgearbeitet. Als mögliches „Stoppsignal“ der NF-IL6-Aktivierung im Gehirn konnte in dieser Arbeit erstmalig Trib1 charakterisiert werden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse sind für die Induktion, Aufrechterhaltung und Beendigung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome sowohl synergistische, als auch zeitlich aufeinander aufbauende Funktionen der Transkriptionsfaktoren NF-κB, STAT3 und nachfolgend NF-IL6 anzunehmen.

Durch die angewendete Methodik der i.c.v. Verabreichung von AG490 oder anti-NF-IL6-siRNA wurden über die zentrale Fragestellung hinaus zusätzliche, interessante Erkenntnisse gewonnen. So untermauerten die entsprechenden Teilstudien die zentrale Rolle von NF-IL6 für die Aktivierung von Mikrogliazellen durch pro-inflammatorische Mediatoren oder mechanische bzw. traumatische Einflüsse sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Auf methodologischer Ebene zeigt die vorliegende Arbeit zusätzlich Grenzen der Anwendung der RNAi *in vivo*, vor allem in Bezug auf die Untersuchung inflammatorischer Prozesse im Gehirn auf. Für zukünftige, weiterführende Studien stellt vor allem die Rolle von NF-IL6 auf verschiedenen Ebenen der HPA-Stressachse, die in der vorliegenden Arbeit insbesondere anhand langfristiger, anti-inflammatorischer Effekte deutlich wurde, eine vielversprechende Fragestellung dar.

Neben einem besseren Verständnis bzw. neuen Erklärungsansätzen der komplizierten Mechanismen, die das Zusammenspiel inflammatorischer Mediatoren und Transkriptionsfaktoren untereinander regeln und letztendlich die zentralnervöse Kontrolle peripher ausgelöster Krankheitssymptome ermöglichen, bieten die vorliegenden Ergebnisse zur möglichen Bedeutung von NF-IL6

auch neue Anhaltspunkte für die Entwicklung therapeutischer Ansätze. Außer dem inflammatorischen „Stoppsignal“ Trib1 ist insbesondere die beobachtete Dissoziation von Fieber und anderen Krankheitssymptomen nach zentraler Anwendung des JAK2-Inhibitors AG490 von Bedeutung und könnte die gezielte Bekämpfung unerwünschter Krankheitssymptome bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der im Zuge der Infektionsabwehr bedeutsamen Fieberreaktion erlauben.

Nicht zuletzt bietet das in der vorliegenden Arbeit zeitlich charakterisierte LPS-induzierte Aktivierungsmuster von NF-IL6 im Gehirn von Ratten eine wichtige Grundlage für die Verwendung von NF-IL6 als neuer „später“ Aktivierungsmarker zur zukünftigen Klärung weiterer Fragestellungen aus dem Bereich der neuroimmunologischen Grundlagenforschung.

VI. SUMMARY

Systemic inflammation is associated with characteristic brain-controlled symptoms, such as fever, anorexia, adipisia, lethargy and weight loss, which are frequently referred to as „sickness-behavior“. Lipopolysaccharide (LPS), a component of Gram-negative bacterial cell walls, belongs to a group of highly conserved molecular structures which are expressed by several pathogens and commonly known as „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs). Experimental systemic application of LPS consistently evokes „sickness-behavior“ in a reproducible manner. The so-called humoral pathway, amongst other pathways, plays a significant role in the transmission of inflammatory stimuli from the periphery to the regulatory areas of the CNS. It describes the action of circulating mediators on special, exposed regions within the brain that finally leads to a transmission of these signals to specific brain structures. In this scenario circumventricular organs (CVOs) are important structures because of their „leaky“ blood-brain barrier that allows circulating mediators to gain direct access to brain cells. In addition, brain endothelial cells and perivascular macrophages participate in this signal transmission. The consequence of different communication pathways between the periphery and the brain is the genomic activation of cells within regulatory hypothalamic centers, which is mediated by the activation of specific transcription factors. Therefore these transcription factors can be considered as brain activation markers and used to visualize the respective activation processes within different brain structures. In the past, neuroanatomically characteristic expression patterns in the brain have been described for the transcription factors NF- κ B and STAT3, which are primarily linked to the induction, but also the maintenance of brain-controlled sickness symptoms. The present study is focused on the neuroanatomical characterization of the transcription factor NF-IL6 (Nuclear Factor IL-6), a member of the so-called bZIP family of transcription factors. The major areas investigated were the specific role of NF-IL6 in the brain during the induction, development and maintenance of sickness symptoms, as well as its interaction with STAT3 and NF- κ B during systemic inflammation.

The three parts of the study revealed NF-IL6 as another activation marker in the brain following administration of moderate (100 μ g) or high (1 mg/kg) doses of LPS, in comparison to PBS-treated controls. For the first time a clear time-dependent pattern of LPS-induced NF-IL6-immunoreactivity (I.R.) could be demonstrated. The density and intensity of the signals peaked at 6 to 8 hours after the LPS-stimulus and accumulated primarily in brain structures and -cells that are involved in the transmission and forwarding of peripheral inflammatory signals to the CNS, and the induction and maintenance of brain-controlled sickness symptoms. These are for instance the sensory CVOs (Vascular organ of the lamina terminalis, OVLT; Subfornical organ, SFO; Area postrema, AP) and cells belonging to the blood-brain barrier. Besides astrocytes, microglial cells and neurons, the significance of NF-IL6 was unequivocally shown in brain endothelial cells and perivascular macrophages for the first time. Based on these results, NF-IL6 seems to be a novel, delayed early activation marker, which possibly, unlike other markers, can also be used to analyze the different cell types involved in humoral, as well as direct neuronal pathways during long-term an / or chronic inflammatory processes in the brain. The main regulatory mechanism of NF-IL6 activity in this study turned out to be *de novo* synthesis of the transcription factor itself. Following stimulation with LPS (100 μ g/kg) immunohistochemical, as well as Western Blot analyses revealed increased concentrations of the activating isoform of the protein (LAP) in the brain, compared to PBS-injected controls.

According to the present study, NF-IL6 could be involved in the maintenance, as well as the termination, of brain-controlled sickness symptoms on a functional level, as there seems to be both, a pro- and an anti-inflammatory potential for this transcription factor. Thus, LPS-induced NF-IL6-I.R. peaked in parallel with the plateau phase of the resulting febrile response after injection of 100 µg or 1 mg/kg LPS, respectively. The peak in NF-IL6-I.R. was also related to a sustained expression of the important mediator IL-6 within the circulation. Moreover, possible pro-inflammatory (COX2, mPGES, IL-1β) and anti-inflammatory (IL-10) NF-IL6 target genes were induced in the hypothalamus simultaneously. The selective blockade of a JAK2-mediated NF-IL6-activation in the brain, in conjunction with the inhibition of STAT3-activation, which was achieved by using the specific inhibitor AG490 (3 µg, intracerebroventricular; i.c.v.), lead to dissociating changes of LPS-induced sickness symptoms in comparison to vehicle-treated control animals. The intensity of the fever increased while lethargy and adipsia were decreased by JAK2-inhibition. These results underline the importance of signaling pathways that include a cooperative activation of STAT3 and NF-IL6, particularly for the hypothalamic expression of IL-10, because mRNA-expression of this gene was significantly influenced by AG490-treatment. Furthermore, we were able to demonstrate the importance of the combined expression of STAT3 and NF-IL6 for the hypothalamic expression of COX2, mPGES and TNFα *in vivo*. For the first time, this study illustrates the function of Trib1 as a possible „stop-signal“ of NF-IL6-activation in the brain.

Based on the present results, the induction, maintenance and termination of brain-controlled sickness symptoms are likely to be synergistically and successively mediated by NF-κB, STAT3 and, at a later time point, NF-IL6.

Because of the i.c.v. route of administration of AG490 or anti-NF-IL6-siRNA, interesting supplementary findings were obtained that exceeded the original purpose of the study: The respective experiments pointed out the important role of NF-IL6 for the activation of microglial cells by pro-inflammatory mediators or mechanical / traumatic insults *in vitro*, as well as *in vivo*. Moreover, the present study demonstrates on a methodological level, existing limitations for the use of RNAi *in vivo*, especially when it comes to the analysis of inflammatory processes in the brain. The role of NF-IL6 on different levels of HPA-axis activation, that became apparent particularly within the scope of anti-inflammatory long-term effects in the present study, might be of interest for future studies.

In addition to new insights concerning the complex mechanisms that regulate the interaction of inflammatory mediators and transcription factors between the periphery and the brain that finally lead to the induction of sickness symptoms, the present study provides new indications on the possible role of NF-IL6 in the development of therapeutic approaches to manage acute or chronic inflammatory processes. Besides identifying the inflammatory „stop-signal“ Trib1, the observed dissociation of fever and other sickness symptoms following central administration of the JAK2-inhibitor AG490, is of particular interest, as this could allow targeted reduction of unwanted symptoms while maintaining the febrile response, which is of specific importance for the defense of infectious diseases.

Overall, the present study provides a spatiotemporal characterization of NF-IL6-activation in the rat brain, an important basis for the utilization of this transcription factor as a new delayed early activation marker in future studies, aiming to solve further questions arising in the neuroimmunological area of basic research.

VII. LITERATUR

- Aarden, L. A., De Groot, E. R., Schaap, O. L. & Lansdorp, P. M.** (1987). Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol*, **17**(10), 1411-1416.
- Abbud, R. A., Kelleher, R. & Melmed, S.** (2004). Cell-specific pituitary gene expression profiles after treatment with leukemia inhibitory factor reveal novel modulators for proopiomelanocortin expression. *Endocrinology*, **145**(2), 867-880.
- Abercrombie, M.** (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*, **94**, 239-247.
- Aderem, A. & Ulevitch, R. J.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**(6797), 782-787.
- Agrawal, A., Cha-Molstad, H., Samols, D. & Kushner, I.** (2003). Overexpressed nuclear factor-kappaB can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBPbeta and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology*, **108**(4), 539-547.
- Agre, P., Johnson, P. F. & McKnight, S. L.** (1989). Cognate DNA binding specificity retained after leucine zipper exchange between GCN4 and C/EBP. *Science*, **246**(4932), 922-926.
- Akagi, T., Saitoh, T., O'Kelly, J., Akira, S., Gombart, A. F. & Koeffler, H. P.** (2008). Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBPbeta-deficient hematopoietic cells. *Blood*, **111**(6), 2999-3004.
- Akhtar, S. & Benter, I.** (2007a). Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv Drug Deliv Rev*, **59**(2-3), 164-182.
- Akhtar, S. & Benter, I. F.** (2007b). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest*, **117**(12), 3623-3632.
- Akira, S.** (1997). IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**(12), 1401-1418.
- Akira, S. & Kishimoto, T.** (1992). IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev*, **127**, 25-50.
- Akira, S. & Kishimoto, T.** (1997). NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol*, **65**, 1-46.
- Akira, S. & Takeda, K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**(7), 499-511.
- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., et al.** (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*, **9**(6), 1897-1906.
- Akira, S., Nishio, Y., Tanaka, T., Inoue, M., Matsusaka, T., Wang, X. J., et al.** (1995). Transcription factors NF-IL6 and APRF involved in gp130-mediated signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci*, **762**, 15-27; discussion 27-18.
- Alam, T., An, M. R. & Papaconstantinou, J.** (1992). Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem*, **267**(8), 5021-5024.
- Alexander, W. S.** (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **2**.
- Allen, A. M., Zhuo, J. & Mendelsohn, F. A.** (2000). Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*, **13**(1 Pt 2), 31S-38S.
- An, M. R., Hsieh, C. C., Reisner, P. D., Rabek, J. P., Scott, S. G., Kuninger, D. T., et al.** (1996). Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol*, **16**(5), 2295-2306.
- Anderson, K. V.** (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, **12**(1), 13-19.
- Andrews, D. M., Matthews, V. B., Sammels, L. M., Carrello, A. C. & McMinn, P. C.** (1999). The severity of murray valley encephalitis in mice is linked to neutrophil infiltration and inducible nitric oxide synthase activity in the central nervous system. *J Virol*, **73**(10), 8781-8790.

- Anforth, H. R., Bluthe, R. M., Bristow, A., Hopkins, S., Lenczowski, M. J., Luheshi, G., et al. (1998). Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1alpha and interleukin-1beta. *Eur Cytokine Netw*, 9(3), 279-288.
- Arditi, M., Zhou, J., Dorio, R., Rong, G. W., Goyert, S. M. & Kim, K. S. (1993). Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. *Infect Immun*, 61(8), 3149-3156.
- Arnal-Estape, A., Tarragona, M., Morales, M., Guiu, M., Nadal, C., Massague, J., et al. (2010). HER2 silences tumor suppression in breast cancer cells by switching expression of C/EBP α isoforms. *Cancer Res*, 70(23), 9927-9936.
- Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 87(1), 13-20.
- Baeuerle, P. A. & Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12, 141-179.
- Bankers-Fulbright, J. L., Kalli, K. R. & McKean, D. J. (1996). Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci*, 59(2), 61-83.
- Banks, W. A., Kastin, A. J. & Broadwell, R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, 2(4), 241-248.
- Banks, W. A., Ortiz, L., Plotkin, S. R. & Kastin, A. J. (1991). Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*, 259(3), 988-996.
- Barber, S. A., Gama, L., Dudaronek, J. M., Voelker, T., Tarwater, P. M. & Clements, J. E. (2006). Mechanism for the establishment of transcriptional HIV latency in the brain in a simian immunodeficiency virus-macaque model. *J Infect Dis*, 193(7), 963-970.
- Baumgartner, R. A., Deramo, V. A. & Beaven, M. A. (1996). Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines. *J Immunol*, 157(9), 4087-4093.
- Bechmann, I., Galea, I. & Perry, V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, 28(1), 5-11.
- Beeson, P. B. (1948). Temperature-elevating effect of substance obtained from polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*, 27, 524-548.
- Bell, R. C. & Lipton, J. M. (1987). Pulsatile release of antipyretic neuropeptide alpha-MSH from septum of rabbit during fever. *Am J Physiol*, 252(6 Pt 2), R1152-1157.
- Berg, D. J., Zhang, J., Lauricella, D. M. & Moore, S. A. (2001). IL-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *J Immunol*, 166(4), 2674-2680.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366.
- Berridge, M. V. & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), 474-482.
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E. & Dinarello, C. A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*, 233(4764), 652-654.
- Beutler, B. & Cerami, A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*, 320(6063), 584-588.
- Bhattacharya, S. & Schindler, C. (2003). Regulation of Stat3 nuclear export. *J Clin Invest*, 111(4), 553-559.
- Billack, B., Heck, D. E., Mariano, T. M., Gardner, C. R., Sur, R., Laskin, D. L., et al. (2002). Induction of cyclooxygenase-2 by heat shock protein 60 in macrophages and endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(4), C1267-1277.
- Blanque, R., Meakin, C., Millet, S. & Gardner, C. R. (1996). Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. *Gen Pharmacol*, 27(6), 973-977.
- Blatteis & Sehic, E. (1997). Fever: how may circulating cytokines signal the brain? *News in Physiological Sciences*, 12, 1-9.

- Blatteis, C. M., Quan, N., Xin, L. & Ungar, A. L.** (1990). Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs. *Brain Res Bull*, 25(6), 895-901.
- Blatteis, C.M., Bealer, S. L., Hunter, W. S., Llanos, Q. J., Ahokas, R. A. & Mashburn, T. A., Jr.** (1983). Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull*, 11(5), 519-526.
- Blatteis, C.M.;** (1992). Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res*, 91, 409-412.
- Blatteis, C.M.;** (2003). Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? *J. Hterm. Biol.*, 28, 1-13.
- Blatteis, C.M.;** (2004). The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy? *Journal of Thermal Biology*, 29(7-8), 359-368.
- Blatteis, C.M.;** (2006). Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther*, 111(1), 194-223.
- Blatteis, C.M.; Hales, J. R., McKinley, M. J. & Fawcett, A. A.** (1987). Role of the anteroventral third ventricle region in fever in sheep. *Can J Physiol Pharmacol*, 65(6), 1255-1260.
- Bluthé, R. M., Beaudu, C., Kelley, K. W. & Dantzer, R.** (1995). Differential effects of IL-1ra on sickness behavior and weight loss induced by IL-1 in rats. *Brain Res*, 677(1), 171-176.
- Bluthé, R. M., Castanon, N., Pousset, F., Bristow, A., Ball, C., Lestage, J., et al.** (1999). Central injection of IL-10 antagonizes the behavioural effects of lipopolysaccharide in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 24(3), 301-311.
- Bluthé, R. M., Laye, S., Michaud, B., Combe, C., Dantzer, R. & Parnet, P.** (2000). Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci*, 12(12), 4447-4456.
- Bluthé, R. M., Michaud, B., Poli, V. & Dantzer, R.** (2000a). Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. *Physiol Behav*, 70(3-4), 367-373.
- Bluysen, A. R., Durbin, J. E. & Levy, D. E.** (1996). ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7(1), 11-17.
- Bode, J. G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., et al.** (1999). LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett*, 463(3), 365-370.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y. & Nathan, C.** (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*, 174(6), 1549-1555.
- Bohatschek, M., Werner, A. & Raivich, G.** (2001). Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency. *Exp Neurol*, 172(1), 137-152.
- Boisclair, Y. R., Wang, J., Shi, J., Hurst, K. R. & Ooi, G. T.** (2000). Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1beta on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells. *J Biol Chem*, 275(6), 3841-3847.
- Borison, H. L. & Brizzee, K. R.** (1951). Morphology of emetic chemoreceptor trigger zone in cat medulla oblongata. *Proc Soc Exp Biol Med*, 77(1), 38-42.
- Borrelli, E.** (1998). A chilled-out knockout. *Nat Genet*, 19(2), 108-109.
- Boulant, J. A.** (1980). Hypothalamic control of thermoregulation: neurophysiological basis. In P. J. Morgane & J. Panksepp (Eds.), *Handbook of the hypothalamus*. N. Y.: Marcel Dekker.
- Boulant, J. A.** (1996). Hypothalamic neurons regulating body temperature. In M. J. Fregly & C. M. Blatteis (Eds.), *APS handbook of physiology, section 4: environmental physiology* (pp. 105-126). N. Y.: Oxford Press.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Bradley, M. N., Zhou, L. & Smale, S. T.** (2003). C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Cell Biol*, 23(14), 4841-4858.
- Breder, C. D., Hazuka, C., Ghayur, T., Klug, C., Huginin, M., Yasuda, K., et al.** (1994). Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(24), 11393-11397.

- Breder, C. D., Tsujimoto, M., Terano, Y., Scott, D. W. & Saper, C. B. (1993). Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol*, 337(4), 543-567.
- Bretz, J. D., Williams, S. C., Baer, M., Johnson, P. F. & Schwartz, R. C. (1994). C/EBP-related protein 2 confers lipopolysaccharide-inducible expression of interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 to a lymphoblastic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15), 7306-7310.
- Bruunsgaard, H. & Pedersen, B. K. (2003). Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*, 23(1), 15-39.
- Buck, M., Poli, V., van der Geer, P., Chojkier, M. & Hunter, T. (1999). Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell*, 4(6), 1087-1092.
- Buck, M., Zhang, L., Halasz, N. A., Hunter, T. & Chojkier, M. (2001). Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha. *Embo J*, 20(23), 6712-6723.
- Buller, K. M. (2001). Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28(7), 581-589.
- Burgess, W., Gheusi, G., Yao, J., Johnson, R. W., Dantzer, R. & Kelley, K. W. (1998). Interleukin-1beta-converting enzyme-deficient mice resist central but not systemic endotoxin-induced anorexia. *Am J Physiol*, 274(6 Pt 2), R1829-1833.
- Calapai, G., Mazzaglia, G., Cilia, M., Zingarelli, B., Squadrito, F. & Caputi, A. P. (1994). Mediation by nitric oxide formation in the preoptic area of endotoxin and tumour necrosis factor-induced inhibition of water intake in the rat. *Br J Pharmacol*, 111(4), 1328-1332.
- Calapai, G., Parente, L., Nava, F., Facciola, G., Marciano, M. C. & Caputi, A. P. (1997). Interleukin-1 inhibits drinking behaviour through prostaglandins, but not by nitric oxide formation. *Life Sci*, 60(7), 457-464.
- Calapai, G., Squadrito, F., Altavilla, D., Zingarelli, B., Campo, G. M., Cilia, M., et al. (1992). Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour. *Neuropharmacology*, 31(8), 761-764.
- Campbell, S. J., Hughes, P. M., Iredale, J. P., Wilcockson, D. C., Waters, S., Docagne, F., et al. (2003). CINC-1 is an acute-phase protein induced by focal brain injury causing leukocyte mobilization and liver injury. *Faseb J*, 17(9), 1168-1170.
- Cannon, J. G., Tatro, J. B., Reichlin, S. & Dinarello, C. A. (1986). Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol*, 137(7), 2232-2236.
- Cao, C., Matsumura, K., Shirakawa, N., Maeda, M., Jikihara, I., Kobayashi, S., et al. (2001). Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors. *Eur J Neurosci*, 13(9), 1781-1790.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K. & Watanabe, Y. (1995). Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain Res*, 697(1-2), 187-196.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K. & Watanabe, Y. (1996). Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res*, 733(2), 263-272.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K. & Watanabe, Y. (1997). Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 2), R1712-1725.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K. & Watanabe, Y. (1998). Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Brain Res Mol Brain Res*, 56(1-2), 45-56.
- Cao, C.; Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. & Goeddel, D. V. (1996a). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, 383(6599), 443-446.
- Cao, C.; Z., Henzel, W. J. & Gao, X. (1996b). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, 271(5252), 1128-1131.
- Cappello, C., Zwergal, A., Kanclerski, S., Haas, S. C., Kandemir, J. D., Huber, R., et al. (2009). C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha. *Cell Signal*, 21(12), 1918-1924.

- Cardinaux, J. R. & Magistretti, P. J.** (1996). Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J Neurosci*, **16**(3), 919-929.
- Cardinaux, J. R., Allaman, I. & Magistretti, P. J.** (2000). Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia*, **29**(1), 91-97.
- Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C. & Wolf, D. E.** (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(23), 8790-8794.
- Carey, F., Forder, R., Edge, M. D., Greene, A. R., Horan, M. A., Strijbos, P. J., et al.** (1990). Lipocortin 1 fragment modifies pyrogenic actions of cytokines in rats. *Am J Physiol*, **259**(2 Pt 2), R266-269.
- Carl, V. S., Gautam, J. K., Comeau, L. D. & Smith, M. F., Jr.** (2004). Role of endogenous IL-10 in LPS-induced STAT3 activation and IL-1 receptor antagonist gene expression. *J Leukoc Biol*, **76**(3), 735-742.
- Carmona, M. C., Hondares, E., Rodriguez de la Concepcion, M. L., Rodriguez-Sureda, V., Peinado-Onsurbe, J., Poli, V., et al.** (2005). Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBPbeta. *Biochem J*, **389**(Pt 1), 47-56.
- Carro, M. S., Lim, W. K., Alvarez, M. J., Bollo, R. J., Zhao, X., Snyder, E. Y., et al.** (2010). The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*, **463**(7279), 318-325.
- Cartmell, T., Ball, C., Bristow, A. F., Mitchell, D. & Poole, S.** (2003). Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-induced and *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in rats. *J Physiol*, **549**(Pt 2), 653-664.
- Cartmell, T., Luheshi, G. N. & Rothwell, N. J.** (1999). Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *J Physiol*, **518**(2), 585-594.
- Cartmell, T., Luheshi, G. N., Hopkins, S. J., Rothwell, N. J. & Poole, S.** (2001). Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. *J Physiol*, **531**(Pt 1), 171-180.
- Cartmell, T., Miller, A.J., Mistry, Y., Rothwell, N.J., Luheshi, G.N.** (1998). Circulating IL-6 is derived from the site of inflammation in response to a localized injection of lipopolysaccharide in the rat. *J Physiol*, **513**-146.
- Cartmell, T., Mitchell, D., Lamond, F. J. & Laburn, H. P.** (2002). Route of administration differentially affects fevers induced by Gram-negative and Gram-positive pyrogens in rabbits. *Exp Physiol*, **87**(3), 391-399.
- Cartmell, T., Poole, S., Turnbull, A. V., Rothwell, N. J. & Luheshi, G. N.** (2000). Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol*, **526** Pt 3, 653-661.
- Cassatella, M. A., Gasperini, S., Bovolenta, C., Calzetti, F., Vollebregt, M., Scapini, P., et al.** (1999). Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood*, **94**(8), 2880-2889.
- Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. C.** (1988). Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett*, **232**(2), 347-350.
- Catania, A. & Lipton, J. M.** (1993). alpha-Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions. *Endocr Rev*, **14**(5), 564-576.
- Cerami, A. & Beutler, B.** (1988). The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today*, **9**(1), 28-31.
- Chai, Z., Alheim, K., Lundkvist, J., Gatti, S. & Bartfai, T.** (1996a). Subchronic glucocorticoid pretreatment reversibly attenuates IL-beta induced fever in rats; IL-6 mRNA is elevated while IL-1 alpha and IL-1 beta mRNAs are suppressed, in the CNS. *Cytokine*, **8**(3), 227-237.

- Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V. & Bartfai, T.** (1996). Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med*, **183**(1), 311-316.
- Chakravarty, S. & Herkenham, M.** (2005). Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci*, **25**(7), 1788-1796.
- Chan, C. C., Panneton, M., Taylor, A. M., Therien, M. & Rodger, I. W.** (1997). A selective inhibitor of cyclooxygenase-2 reverses endotoxin-induced pyretic responses in non-human primates. *Eur J Pharmacol*, **327**(2-3), 221-225.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. & Lenardo, M. J.** (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**(5475), 2351-2354.
- Chang, C. J., Chen, T. T., Lei, H. Y., Chen, D. S. & Lee, S. C.** (1990). Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol*, **10**(12), 6642-6653.
- Chang, H. R., Dulloo, A. G. & Bistran, B. R.** (1998). Role of cytokines in AIDS wasting. *Nutrition*, **14**(11-12), 853-863.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P. & Stark, G. R.** (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J*, **19**(15), 4111-4122.
- Chen & Goeddel, D. V.** (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, **296**(5573), 1634-1635.
- Chen, G., Castro, W. L., Chow, H. H. & Reichlin, S.** (1997). Clearance of 125I-labeled interleukin-6 from brain into blood following intracerebroventricular injection in rats. *Endocrinology*, **138**(11), 4830-4836.
- Chen, T. Y., Lei, M. G., Suzuki, T. & Morrison, D. C.** (1992). Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*, **181**, 169-188.
- Chen, C. C., Rosenbloom, C. L., Anderson, D. C. & Manning, A. M.** (1995). Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J Immunol*, **155**(7), 3538-3545.
- Chen, Y., Zhuang, S., Cassenaer, S., Casteel, D. E., Gudi, T., Boss, G. R., et al.** (2003). Synergism between calcium and cyclic GMP in cyclic AMP response element-dependent transcriptional regulation requires cooperation between CREB and C/EBP-beta. *Mol Cell Biol*, **23**(12), 4066-4082.
- Chinery, R., Brockman, J. A., Dransfield, D. T. & Coffey, R. J.** (1997). Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299. *J Biol Chem*, **272**(48), 30356-30361.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**(1), 156-159.
- Christoph, T., Grunweller, A., Mika, J., Schafer, M. K., Wade, E. J., Weihe, E., et al.** (2006). Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **350**(1), 238-243.
- Chun, K. S. & Surh, Y. J.** (2004). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol*, **68**(6), 1089-1100.
- Cieslik, K. A., Zhu, Y., Shtivelband, M. & Wu, K. K.** (2005). Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase-mediated CCAAT/enhancer-binding protein beta activation and cyclooxygenase-2 expression by salicylate. *J Biol Chem*, **280**(18), 18411-18417.
- Cloutier, A., Ear, T., Blais-Charron, E., Dubois, C. M. & McDonald, P. P.** (2007). Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *J Leukoc Biol*, **81**(2), 567-577.
- Cloutier, A., Guindi, C., Larivee, P., Dubois, C. M., Amrani, A. & McDonald, P. P.** (2009). Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors. *J Immunol*, **182**(1), 563-571.
- Cocconi, F., Lees, J., Mancilla, J., Belizario, J. & Dinarello, C. A.** (1993). Interleukin-6 and tumor necrosis factor in cerebrospinal fluid: changes during pyrogen fever. *Brain Res*, **612**(1-2), 165-171.
- Coelho, M. M., Souza, G. E. & Pela, I. R.** (1992). Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. *Am J Physiol*, **263**(2 Pt 2), R423-427.

- Colucci, M., Maione, F., Bonito, M. C., Piscopo, A., Di Giannuario, A. & Pieretti, S.** (2008). New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacol Res*, **57(6)**, 419-425.
- Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C. & Bartfai, T.** (2004). Cytokines and fever. *Front Biosci*, **9**, 1433-1449.
- Coons, A. H.** (1958). Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods*, **1**, 399-422.
- Cooper, A. L., Brouwer, S., Turnbull, A. V., Luheshi, G. N., Hopkins, S. J., Kunkel, S. L., et al.** (1994). Tumor necrosis factor-alpha and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am J Physiol*, **267(6 Pt 2)**, R1431-1436.
- Cooper, K. E.** (1995). Fever and antipyresis-the role of the nervous system. *Cambridge: University Press*.
- Cooper, K.E.; Cranston, W. I. & Honour, A. J.** (1967). Observations on the site & mode of action of pyrogens in the rabbit brain. *J Physiol*, **191(2)**, 325-337.
- Cortes-Canteli, M., Luna-Medina, R., Sanz-Sancristobal, M., Alvarez-Barrientos, A., Santos, A. & Perez-Castillo, A.** (2008). CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci*, **121(Pt 8)**, 1224-1234.
- Cortes-Canteli, M., Pignatelli, M., Santos, A. & Perez-Castillo, A.** (2002). CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, **277(7)**, 5460-5467.
- Cortes-Canteli, M., Wagner, M., Ansorge, W. & Perez-Castillo, A.** (2004). Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury. *J Biol Chem*, **279(14)**, 14409-14417.
- Cranston, W. I., Duff, G. W., Hellon, R. F., Mitchell, D. & Townsend, Y.** (1976). Evidence that brain prostaglandin synthesis is not essential in fever. *J Physiol*, **259(1)**, 239-249.
- Cranston, W. I., Hellon, R. F. & Townsend, Y.** (1980). Suppression of fever in rabbits by a protein synthesis inhibitor, anisomycin. *J Physiol*, **305**, 337-344.
- Croniger, C. M., Millward, C., Yang, J., Kawai, Y., Arinze, I. J., Liu, S., et al.** (2001). Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta have an attenuated response to cAMP and impaired carbohydrate metabolism. *J Biol Chem*, **276(1)**, 629-638.
- Csóka, B., Nemeth, Z. H., Virag, L., Gergely, P., Leibovich, S. J., Pacher, P., et al.** (2007). A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli. *Blood*, **110(7)**, 2685-2695.
- Cunningham, J. T., Beltz, T., Johnson, R. F. & Johnson, A. K.** (1992). The effects of ibotenate lesions of the median preoptic nucleus on experimentally-induced and circadian drinking behavior in rats. *Brain Res*, **580(1-2)**, 325-330.
- Cutler, R. L., Liu, L., Damen, J. E. & Krystal, G.** (1993). Multiple cytokines induce the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 in hemopoietic cells. *J Biol Chem*, **268(29)**, 21463-21465.
- Dahle, M. K., Overland, G., Myhre, A. E., Stuestol, J. F., Hartung, T., Krohn, C. D., et al.** (2004). The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is activated by lipoteichoic acid and plays a role in Kupffer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10. *Infect Immun*, **72(10)**, 5704-5711.
- Damm, J., Luheshi, G. N., Gerstberger, R., Roth, J. & Rummel, C.** (2011). Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *J Comp Neurol*, **519(3)**, 480-505.
- Damm, J., Wiegand, F., Harden, L. M., Gerstberger, R., Rummel, C. & Roth, J.** (2012). Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod. *Neuroscience*, **201**, 166-183.
- Dantzer, R.** (2001). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun*, **15(1)**, 7-24.
- Dantzer, R., Bluthé, R. M. & Castanon, N.** (2001). Cytokine effects on behavior. In R. Ader, D. Felten & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (Vol. 1, pp. 703-727). San Diego, CA: Academic Press.
- Dantzer, R., Bluthé, R. M., Laye, S., Bret-Dibat, J. L., Parnet, P. & Kelley, K. W.** (1998). Cytokines and sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 586-590.

- Dantzer, R., Konsman, J. P., Bluthé, R. M. & Kelley, K. W. (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci*, **85**(1-3), 60-65.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, **9**(1), 46-56.
- Dantzer, R., Wollman, E., Vitkovic, L. & Yirmiya, R. (1999). Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry*, **4**(4), 328-332.
- Davidson, J., Milton, A. S. & Rotondo, D. (1992). Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses fever and increases in plasma levels of prostaglandin E2 in the rabbit. *J Physiol*, **451**, 491-502.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, **24**(4), 488-522.
- de Oliveira, A. C., Candelario-Jalil, E., Bhatia, H. S., Lieb, K., Hull, M. & Fiebich, B. L. (2008). Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. *Glia*, **56**(8), 844-855.
- de Paiva, V. N., Lima, S. N., Fernandes, M. M., Soncini, R., Andrade, C. A. & Giusti-Paiva, A. (2010). Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behav Brain Res*, **215**(1), 146-151.
- De Paula, D., Steiner, A. A. & Branco, L. G. (2000). The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. *Physiol Behav*, **70**(5), 505-511.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. & de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, **174**(5), 1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., Roncarolo, M. G., Spits, H. & de Vries, J. E. (1992). Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*, **4**(3), 314-320.
- Deininger, M. H., Kreamsner, P. G., Meyermann, R. & Schluesener, H. J. (2000). Focal accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 expressing cells in cerebral malaria. *J Neuroimmunol*, **106**(1-2), 198-205.
- Derijk, R. H., Van Kampen, M., Van Rooijen, N. & Berkenbosch, F. (1994). Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. *Am J Physiol*, **266**(1 Pt 2), R1-8.
- Descombes, P. & Schibler, U. (1991). A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, **67**(3), 569-579.
- Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E. & Schibler, U. (1990). LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev*, **4**(9), 1541-1551.
- Desson, S. E. & Ferguson, A. V. (2003). Interleukin 1beta modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance. *J Physiol*, **550**(Pt 1), 113-122.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. & Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I-kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, **388**(6642), 548-554.
- Digicaylioglu, M. & Lipton, S. A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, **412**(6847), 641-647.
- Dijkstra, C. D., Dopp, E. A., Joling, P. & Kraal, G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Adv Exp Med Biol*, **186**, 409-419.
- Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., et al. (2004). A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol*, **172**(8), 4733-4743.
- Dinarello, C. A. (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med*, **311**(22), 1413-1418.
- Dinarello, C. A. (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J*, **8**(15), 1314-1325.

- Dinarello, C. A. (1999). Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*, 179 Suppl 2, S294-304.
- Dinarello, C. A. (2010). IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol*, 40(3), 599-606.
- Dinarello, C.A. & Savage, N. (1989). Interleukin-1 and its receptor. *Crit Rev Immunol*, 9(1), 1-20.
- Dinarello, C.A.; (1997). Cytokines as endogenous pyrogens. In C. A. Mackowiak (Ed.), *Fever: Basic Mechanisms and Management*, 2nd edn. (pp. 87-116). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Dinarello, C.A.; Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., et al. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*, 163(6), 1433-1450.
- Dogan, M. D., Ataoglu, H. & Akarsu, E. S. (2002). Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on lipopolysaccharide-induced dual thermoregulatory changes in rats. *Brain Res Bull*, 57(2), 179-185.
- Dower, S. K., Kronheim, S. R., March, C. J., Conlon, P. J., Hopp, T. P., Gillis, S., et al. (1985). Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med*, 162(2), 501-515.
- Dudaronek, J. M., Barber, S. A. & Clements, J. E. (2007). CUGBP1 is required for IFNbeta-mediated induction of dominant-negative CEBPbeta and suppression of SIV replication in macrophages. *J Immunol*, 179(11), 7262-7269.
- Dunn, A. J. & Swiergiel, A. H. (1998). The role of cytokines in infection-related behavior. *Ann N Y Acad Sci*, 840, 577-585.
- Duprez, E., Wagner, K., Koch, H. & Tenen, D. G. (2003). C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *EMBO J*, 22(21), 5806-5816.
- Durez, P., Abramowicz, D., Gerard, C., Van Mechelen, M., Amraoui, Z., Dubois, C., et al. (1993). In vivo induction of interleukin 10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin A. *J Exp Med*, 177(2), 551-555.
- Edamitsu, S., Matsukawa, A., Ohkawara, S., Takagi, K., Nariuchi, H. & Yoshinaga, M. (1995). Role of TNF alpha, IL-1, and IL-1ra in the mediation of leukocyte infiltration and increased vascular permeability in rabbits with LPS-induced pleurisy. *Clin Immunol Immunopathol*, 75(1), 68-74.
- Eder, K., Baffy, N., Falus, A. & Fulop, A. K. (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res*, 58(11), 727-736.
- Ejarque-Ortiz, A., Medina, M. G., Tusell, J. M., Perez-Gonzalez, A. P., Serratos, J. & Saura, J. (2007). Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia*, 55(2), 178-188.
- Ek, M., Arias, C., Sawchenko, P. & Ericsson-Dahlstrand, A. (2000). Distribution of the EP3 prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. *J Comp Neurol*, 428(1), 5-20.
- Ek, M., Engblom, D., Saha, S., Blomqvist, A., Jakobsson, P. J. & Ericsson-Dahlstrand, A. (2001). Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature*, 410(6827), 430-431.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2), 188-200.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J*, 20(23), 6877-6888.
- Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Kalden, J. R., Antoni, C., Smolen, J. S., et al. (1994). Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 344(8930), 1105-1110.
- Elmqvist, J. K., Ackermann, M. R., Register, K. B., Rimler, R. B., Ross, L. R. & Jacobson, C. D. (1993). Induction of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following *Pasteurella multocida* endotoxin administration. *Endocrinology*, 133(6), 3054-3057.
- Elmqvist, J. K., Breder, C. D., Sherin, J. E., Scammell, T. E., Hickey, W. F., Dewitt, D., et al. (1997). Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol*, 381(2), 119-129.

- Elmqvist, J. K., Scammell, T. E., Jacobson, C. D. & Saper, C. B. (1996). Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J Comp Neurol*, 371(1), 85-103.
- Engblom, D., Ek, M., Andersson, I. M., Saha, S., Dahlstrom, M., Jakobsson, P. J., et al. (2002a). Induction of microsomal prostaglandin E synthase in the rat brain endothelium and parenchyma in adjuvant-induced arthritis. *J Comp Neurol*, 452(3), 205-214.
- Engblom, D., Ek, M., Saha, S., Ericsson-Dahlstrand, A., Jakobsson, P. J. & Blomqvist, A. (2002). Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. *J Mol Med*, 80(1), 5-15.
- Engblom, D., Saha, S., Engstrom, L., Westman, M., Audoly, L. P., Jakobsson, P. J., et al. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci*, 6(11), 1137-1138.
- Ericsson, A., Kovacs, K. J. & Sawchenko, P. E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci*, 14(2), 897-913.
- Ericsson, A., Liu, C., Hart, R. P. & Sawchenko, P. E. (1995). Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol*, 361(4), 681-698.
- Espevik, T. & Nissen-Meyer, J. (1986). A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods*, 95(1), 99-105.
- Fattori, E., Sellitto, C., Cappelletti, M., Lazzaro, D., Bellavia, D., Screpanti, I., et al. (1995). Functional analysis of IL-6 and IL-6DBP/C/EBP beta by gene targeting. *Ann N Y Acad Sci*, 762, 262-273.
- Ferguson, A. V. & Bains, J. S. (1996). Electrophysiology of the circumventricular organs. *Front Neuroendocrinol*, 17(4), 440-475.
- Fernandez-Botran, R. (2000). Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(3), 497-514.
- Ferrell, J. E., Jr. (2000). What do scaffold proteins really do? *Sci STKE*, 2000(52), pe1.
- Fielding, C. A., McLoughlin, R. M., McLeod, L., Colmont, C. S., Najdovska, M., Grail, D., et al. (2008). IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol*, 181(3), 2189-2195.
- Fields, J., Gardner-Mercer, J., Borgmann, K., Clark, I. & Ghorpade, A. (2011). CCAAT/enhancer binding protein beta expression is increased in the brain during HIV-1-infection and contributes to regulation of astrocyte tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Neurochem*, 118(1), 93-104.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- Fitzgerald, K. A. & O'Neill, L. A. (2000). The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. *Microbes Infect*, 2(8), 933-943.
- Flick, D. A. & Gifford, G. E. (1985). Tumor necrosis factor. In Academic (Ed.), *Biological Response Modifiers* (Vol. 1, pp. 171-218). New York.
- Foka, P., Kousteni, S. & Ramji, D. P. (2001). Molecular characterization of the *Xenopus* CCAAT-enhancer binding protein beta gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(2), 430-436.
- Frangakis, M. V. & Kimelberg, H. K. (1984). Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem Res*, 9(12), 1689-1698.
- Frangakis, M. V., Koopman, W. J., Kiyono, H., Michalek, S. M. & McGhee, J. R. (1982). An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J Immunol Methods*, 48(1), 33-44.
- Frei, K., Malipiero, U. V., Leist, T. P., Zinkernagel, R. M., Schwab, M. E. & Fontana, A. (1989). On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol*, 19(4), 689-694.
- Gabay, C. & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340(6), 448-454.

- Gardiner, T. W. & Stricker, E. M.** (1985). Impaired drinking responses of rats with lesions of nucleus medianus: circadian dependence. *Am J Physiol*, **248(2 Pt 2)**, R224-230.
- Gardiner, T. W., Verbalis, J. G. & Stricker, E. M.** (1985). Impaired secretion of vasopressin and oxytocin in rats after lesions of nucleus medianus. *Am J Physiol*, **249(6 Pt 2)**, R681-688.
- Gatti, S. & Bartfai, T.** (1993). Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res*, **624(1-2)**, 291-294.
- Gautron, L., Lafon, P., Chaigniau, M., Tramu, G. & Laye, S.** (2002). Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience*, **112(3)**, 717-729.
- Gautron, L., Lafon, P., Tramu, G. & Laye, S.** (2003). In vivo activation of the interleukin-6 receptor/gp130 signaling pathway in pituitary corticotropes of lipopolysaccharide-treated rats. *Neuroendocrinology*, **77(1)**, 32-43.
- Gayle, D., Ilyin, S. E. & Plata-Salaman, C. R.** (1997). Central nervous system IL-1 beta system and neuropeptide Y mRNAs during IL-1 beta-induced anorexia in rats. *Brain Res Bull*, **44(3)**, 311-317.
- Gebke, E., Muller, A. R., Jurzak, M. & Gerstberger, R.** (1998). Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience*, **85(2)**, 509-520.
- Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., et al.** (1996). Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem*, **271(22)**, 12991-12998.
- Gerstberger, R.** (1999). Nitric Oxide and Body Temperature Control. *News Physiol Sci*, **14(1)**, 30-36.
- Gilmore, I. R., Fox, S. P., Hollins, A. J. & Akhtar, S.** (2006). Delivery strategies for siRNA-mediated gene silencing. *Curr Drug Deliv*, **3(2)**, 147-145.
- Gilmore, I. R., Fox, S. P., Hollins, A. J., Sohail, M. & Akhtar, S.** (2004). The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J Drug Target*, **12(6)**, 315-340.
- Giltiay, N. V., Karakashian, A. A., Alimov, A. P., Ligthle, S. & Nikolova-Karakashian, M. N.** (2005). Ceramide- and ERK-dependent pathway for the activation of CCAAT/enhancer binding protein by interleukin-1beta in hepatocytes. *J Lipid Res*, **46(11)**, 2497-2505.
- Giulian, D., Woodward, J., Young, D. G., Krebs, J. F. & Lachman, L. B.** (1988). Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci*, **8(7)**, 2485-2490.
- Givalois, L., Dornand, J., Mekaouche, M., Solier, M. D., Bristow, A. F., Ixart, G., et al.** (1994). Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol*, **267(1 Pt 2)**, R164-170.
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P., Nguyen, K. T., Lee, J. E., Tilders, F. J., Maier, S. F., et al.** (1999). Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci*, **19(7)**, 2799-2806.
- Goethe, R. & Loc, P. V.** (1994). The far upstream chicken lysozyme enhancer at -6.1 kilobase, by interacting with NF-M, mediates lipopolysaccharide-induced expression of the chicken lysozyme gene in chicken myelomonocytic cells. *J Biol Chem*, **269(49)**, 31302-31309.
- Goldbach, J. M., Roth, J., Storr, B. & Zeisberger, E.** (1996). Repeated infusions of TNF-alpha cause attenuation of the thermal response and influence LPS fever in guinea pigs. *Am J Physiol*, **270(4 Pt 2)**, R749-754.
- Goldbach, J. M., Roth, J., Storr, B. & Zeisberger, E.** (1997). Influence of pentoxifylline on fevers induced by bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*, **319(2-3)**, 273-278.
- Gonindard, C., Goigoux, C., Hollande, E. & D'Hinterland, L. D.** (1996). The administration of an alpha-MSH analogue reduces the serum release of IL-1 alpha and TNF alpha induced by the injection of a sublethal dose of lipopolysaccharides in the BALB/c mouse. *Pigment Cell Res*, **9(3)**, 148-153.
- Gorgoni, B., Caivano, M., Arizmendi, C. & Poli, V.** (2001). The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem*, **276(44)**, 40769-40777.

- Gorina, R., Petegnief, V., Chamorro, A. & Planas, A. M.** (2005). AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem*, **92**(3), 505-518.
- Graeber, M. B., Streit, W. J. & Kreutzberg, G. W.** (1989). Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res*, **22**(1), 103-106.
- Greenbaum, L. E., Li, W., Cressman, D. E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V., et al.** (1998). CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest*, **102**(5), 996-1007.
- Greenfeder, S. A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R. A. & Ju, G.** (1995). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem*, **270**(23), 13757-13765.
- Grosshans, J. & Wieschaus, E.** (2000). A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell*, **101**(5), 523-531.
- Guissouma, H., Froidevaux, M. S., Hassani, Z. & Demeneix, B. A.** (2006). In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neurosci Lett*, **406**(3), 240-243.
- Gutierrez, M. B., Miguel, B. S., Villares, C., Gallego, J. G. & Tunon, M. J.** (2006). Oxidative stress induced by Cremophor EL is not accompanied by changes in NF-kappaB activation or iNOS expression. *Toxicology*, **222**(1-2), 125-131.
- Gyllensten, U. B. & Erlich, H. A.** (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(20), 7652-7656.
- Haddad, J. J., Saade, N. E. & Safieh-Garabedian, B.** (2002). Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol*, **133**(1-2), 1-19.
- Halterman, M. W., De Jesus, C., Rempe, D. A., Schor, N. F. & Federoff, H. J.** (2008). Loss of c/EBP-beta activity promotes the adaptive to apoptotic switch in hypoxic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci*, **38**(2), 125-137.
- Hamberg, M. & Samuelsson, B.** (1971). On the metabolism of prostaglandins E 1 and E 2 in man. *J Biol Chem*, **246**(22), 6713-6721.
- Hanada, T. & Yoshimura, A.** (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **13**, 413-421.
- Hannum, C. H., Wilcox, C. J., Arend, W. P., Joslin, F. G., Dripps, D. J., Heimdal, P. L., et al.** (1990). Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*, **343**(6256), 336-340.
- Harden, L. M., du Plessis, I., Poole, S. & Laburn, H. P.** (2006). Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Physiol Behav*, **89**(2), 146-155.
- Harden, L. M., du Plessis, I., Poole, S. & Laburn, H. P.** (2008). Interleukin (IL)-6 and IL-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. *Brain Behav Immun*, **22**(6), 838-849.
- Harden, L. M., du Plessis, I., Roth, J., Loram, L. C., Poole, S. & Laburn, H. P.** (2011). Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1beta and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology*, **36**(5), 608-622.
- Harding, H. P., Calfon, M., Urano, F., Novoa, I. & Ron, D.** (2002). Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 575-599.
- Harkin, A., O'Donnell, J. M. & Kelly, J. P.** (2002). A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiol Behav*, **77**(1), 65-77.
- Harré, E. M., Roth, J., Gerstberger, R. & Hübschle, T.** (2003). Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res*, **980**(1), 151-155.

- Harre, E. M., Roth, J., Pehl, U., Kueth, M., Gerstberger, R. & Hübschle, T.** (2002). Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol*, **92**(6), 2657-2666.
- Hart, B. L.** (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev*, **12**(2), 123-137.
- Harvey, D., Smith, R., English, K., Mahon, B. & Commins, S.** (2006). Interleukin-10 (IL-10) but not Lipopolysaccharide (LPS) produces increased motor activity and abnormal exploratory patterns while impairing spatial learning in Balb/c mice. *Physiol Behav*, **87**(5), 842-847.
- Hashimoto, M., Ueno, T. & Iriki, M.** (1994). What roles does the organum vasculosum laminae terminalis play in fever in rabbits? *Pflugers Arch*, **429**(1), 50-57.
- Haspel, R. L. & Darnell, J. E., Jr.** (1999). A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(18), 10188-10193.
- Hassani, Z., Lemkine, G. F., Erbacher, P., Palmier, K., Alfama, G., Giovannangeli, C., et al.** (2005). Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J Gene Med*, **7**(2), 198-207.
- Heguy, A., Baldari, C. T., Macchia, G., Telford, J. L. & Melli, M.** (1992). Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J Biol Chem*, **267**(4), 2605-2609.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L.** (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, **334** (Pt 2), 297-314.
- Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A., Hanke, M., Himler, J., Bailey, M. T., et al.** (2008). Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J Neuroinflammation*, **5**, 15.
- Hensel, H.** (1981). Thermoreception and temperature regulation. *Monogr Physiol Soc*, **38**, 1-321.
- Herkenham, M., Lee, H. Y. & Baker, R. A.** (1998). Temporal and spatial patterns of c-fos mRNA induced by intravenous interleukin-1: a cascade of non-neuronal cellular activation at the blood-brain barrier. *J Comp Neurol*, **400**(2), 175-196.
- Herschman, H. R.** (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*, **1299**(1), 125-140.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T.** (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, **63**(6), 1149-1157.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R.** (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, **10**(4), 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**(9), 1026-1030.
- Hinz, B., Brune, K. & Pahl, A.** (2000). Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**(3), 790-796.
- Hitzel, N.** (2009). Charakterisierung ionotroper purinergere Rezeptoren im Nucleus medianus praeopticus des anterioren Hypothalamus der Ratte.
- Hodge, D. R., Hurt, E. M. & Farrar, W. L.** (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer*, **41**, 2502-2512.
- Hofer, H.** (1958). Zur Morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Zool Anz (Suppl)*, **22**, 203-251.
- Hollis, J. H., Lemus, M., Evetts, M. J. & Oldfield, B. J.** (2010). Central interleukin-10 attenuates lipopolysaccharide-induced changes in food intake, energy expenditure and hypothalamic Fos expression. *Neuropharmacology*, **58**(4-5), 730-738.
- Holst, O., Ulmer, A. J., Brade, H., Flad, H. D. & Rietschel, E. T.** (1996). Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **16**(2), 83-104.
- Holzappel, B. & Wickert, L.** (2007). Die quantitative realtime-PCR (qRT-PCR) *Biologie in Unserer Zeit* (Vol. 37, pp. 120-126).

- Honda, Y., Rogers, L., Nakata, K., Zhao, B. Y., Pine, R., Nakai, Y., et al. (1998). Type I interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP)beta, repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. *J Exp Med*, 188(7), 1255-1265.
- Hori, T., Kiyohara, T., Nakashima, T., Mizuno, K., Muratani, H. & Katafuchi, T. (1992). Effects of temperature and neuroactive substances on hypothalamic neurones in vitro: possible implications for the induction of fever. *Physiol Res*, 41(1), 77-81.
- Hori, T., Shibata, M., Nakashima, T., Yamasaki, M., Asami, A., Asami, T., et al. (1988). Effects of interleukin-1 and arachidonate on the preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Brain Res Bull*, 20(1), 75-82.
- Howard, M. & O'Garra, A. (1992). Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today*, 13(6), 198-200.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V. & Goeddel, D. V. (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 4(4), 387-396.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. & Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84(2), 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 81(4), 495-504.
- Hsu, W., Kerppola, T. K., Chen, P. L., Curran, T. & Chen-Kiang, S. (1994). Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol*, 14(1), 268-276.
- Hu, H. M., Tian, Q., Baer, M., Spooner, C. J., Williams, S. C., Johnson, P. F., et al. (2000). The C/EBP bZIP domain can mediate lipopolysaccharide induction of the proinflammatory cytokines interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Biol Chem*, 275(21), 16373-16381.
- Hübschle, T., Harré, E. M., Meyerhof, W., Pehl, U., Roth, J. & Gerstberger, R. (2001). The central pyrogenic action of interleukin-6 is related to nuclear translocation of STAT3 in the anteroventral preoptic area of the rat brain. *J Therm Biol*, 26, 299-305.
- Hübschle, T., Mütze, J., Muhlradt, P. F., Korte, S., Gerstberger, R. & Roth, J. (2006). Pyrexia, anorexia, adipisia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(1), R180-187.
- Hübschle, T., Thom, E., Watson, A., Roth, J., Klaus, S. & Meyerhof, W. (2001a). Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci*, 21(7), 2413-2424.
- Hurst, H. C. (1995). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, 2(2), 101-168.
- Hutvagner, G. & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 22-32.
- Ibelgaufts, H. (1995). *Dictionary of cytokines*. Weinheim: VCH Verlag.
- Idriss, H. T. & Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*, 50(3), 184-195.
- Iida, M., Watanabe, K., Tsurufuji, M., Takaishi, K., Iizuka, Y. & Tsurufuji, S. (1992). Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Infect Immun*, 60(4), 1268-1272.
- International Union of Physiological Sciences, C. f. T. P. (2001). Glossary of terms for thermal physiology. 3rd Edition. *Jpn J Physiol*, 51(245-80).
- Isshiki, H., Akira, S., Tanabe, O., Nakajima, T., Shimamoto, T., Hirano, T., et al. (1990). Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol*, 10(6), 2757-2764.
- Ivanov, A. I. & Romanovsky, A. A. (2004). Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci*, 9, 1977-1993.
- Jackson, D. L. (1967). A hypothalamic region responsive to localized injection of pyrogens. *J Neurophysiol*, 30(3), 586-602.

- Jana, M., Liu, X., Koka, S., Ghosh, S., Petro, T. M. & Pahan, K. (2001). Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *J Biol Chem*, 276(48), 44527-44533.
- Jansky, L., Vybiral, S., Pospisilova, D., Roth, J., Dornand, J., Zeisberger, E., et al. (1995). Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinology*, 62(1), 55-61.
- Jenkins, J. K., Malyak, M. & Arend, W. P. (1994). The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res*, 13(1), 47-54.
- Jiang, N., Moyle, M., Soule, H. R., Rote, W. E. & Chopp, M. (1995). Neutrophil inhibitory factor is neuroprotective after focal ischemia in rats. *Ann Neurol*, 38(6), 935-942.
- Jiang, Y., Deacon, R., Anthony, D. C. & Campbell, S. J. (2008). Inhibition of peripheral TNF can block the malaise associated with CNS inflammatory diseases. *Neurobiol Dis*, 32(1), 125-132.
- Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W. & Goeddel, D. V. (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*, 283(5401), 543-546.
- Jinek, M. & Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228), 405-412.
- Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Luciw, P. A. & Tjian, R. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science*, 232(4751), 755-759.
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K. & MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*, 23(4), 457-462.
- Juliano, R., Alam, M. R., Dixit, V. & Kang, H. (2008). Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 36(12), 4158-4171.
- Jurzak, M., Muller, A.R., Schmid, H.A., Gerstberger, R. (1994). Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Res*, 662(1-2), 198-208.
- Juttler, E., Tarabin, V. & Schwaninger, M. (2002). Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist*, 8(3), 268-275.
- Kamimura, D., Ishihara, K. & Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 149, 1-38.
- Kano, A., Wolfgang, M. J., Gao, Q., Jacoby, J., Chai, G. X., Hansen, W., et al. (2003). Endothelial cells require STAT3 for protection against endotoxin-induced inflammation. *J Exp Med*, 198(10), 1517-1525.
- Kapadia, R., Tureyen, K., Bowen, K. K., Kalluri, H., Johnson, P. F. & Vemuganti, R. (2006). Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 98(6), 1718-1731.
- Kass, E. H. & Finland, M. (1958). Corticosteroids and infections. *Adv Intern Med*, 9, 45-80.
- Katz, S., Kowenz-Leutz, E., Muller, C., Meese, K., Ness, S. A. & Leutz, A. (1993). The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells. *EMBO J*, 12(4), 1321-1332.
- Kaufman, R. J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 110(10), 1389-1398.
- Kawasaki, H., Moriyama, M., Ohtani, Y., Naitoh, M., Tanaka, A. & Nariuchi, H. (1989). Analysis of endotoxin fever in rabbits by using a monoclonal antibody to tumor necrosis factor (cachectin). *Infect Immun*, 57(10), 3131-3135.
- Kelicen, P. & Tindberg, N. (2004). Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBPbeta and -delta. *J Biol Chem*, 279(16), 15734-15742.
- Kemp, D. J., Smith, D. B., Foote, S. J., Samaras, N. & Peterson, M. G. (1989). Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7), 2423-2427.

- Kent, S., Bluthe, R. M., Dantzer, R., Hardwick, A. J., Kelley, K. W., Rothwell, N. J., et al.** (1992). Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(19), 9117-9120.
- Kent, S., Bluthe, R. M., Kelley, K. W. & Dantzer, R.** (1992a). Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci*, **13**(1), 24-28.
- Kent, S., Bret-Dibat, J. L., Kelley, K. W. & Dantzer, R.** (1996). Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, **20**(1), 171-175.
- Kim, B., Lee, J. H., Yang, M. S., Jou, I. & Joe, E. H.** (2008). Retinoic acid enhances prostaglandin E2 production through increased expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 in rat brain microglia. *J Neurosci Res*, **86**(6), 1353-1360.
- Kim, K. S.** (2003). Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*, **4**(5), 376-385.
- Kim, O. Y., Chae, J. S., Paik, J. K., Seo, H. S., Jang, Y., Cavallion, J. M., et al.** (2011). Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age (Dordr)*.
- King, M. K. & Wood, W. B., Jr.** (1958). Studies on the pathogenesis of fever. IV. The site of action of leucocytic and circulating endogenous pyrogen. *J Exp Med*, **107**(2), 291-303.
- Kinoshita, S. M. & Taguchi, S.** (2008). NF-IL6 (C/EBPbeta) induces HIV-1 replication by inhibiting cytidine deaminase APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(39), 15022-15027.
- Kirtikara, K., Raghov, R., Laulederkind, S. J., Goorha, S., Kanekura, T. & Ballou, L. R.** (2000). Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in the human microvascular endothelial cell line, HMEC-1: control by the combinatorial actions of AP2, NF-IL-6 and CRE elements. *Mol Cell Biochem*, **203**(1-2), 41-51.
- Kiss-Toth, E., Bagstaff, S. M., Sung, H. Y., Jozsa, V., Dempsey, C., Caunt, J. C., et al.** (2004). Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, **279**(41), 42703-42708.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. & Schindler, C. W.** (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, **285**(1-2), 1-24.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. & Khorana, H. G.** (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, **56**(2), 341-361.
- Klir, J. J., McClellan, J. L., Kozak, W., Szelenyi, Z., Wong, G. H. & Kluger, M. J.** (1995). Systemic but not central administration of tumor necrosis factor-alpha attenuates LPS-induced fever in rats. *Am J Physiol*, **268**(2 Pt 2), R480-486.
- Kluger, M. J.** (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev*, **71**(1), 93-127.
- Kolch, W.** (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, **351** Pt 2, 289-305.
- Kolyada, A. Y. & Madias, N. E.** (2001). Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1beta in endothelial cells. *Mol Med*, **7**(5), 329-343.
- Konsman, J. P., Kelley, K. & Dantzer, R.** (1999). Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience*, **89**(2), 535-548.
- Konsman, J. P., Luheshi, G. N., Bluthe, R. M. & Dantzer, R.** (2000). The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci*, **12**(12), 4434-4446.
- Konsman, J. P., Parnet, P. & Dantzer, R.** (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*, **25**(3), 154-159.
- Konsman, J. P., Veeneman, J., Combe, C., Poole, S., Luheshi, G. N. & Dantzer, R.** (2008). Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci*, **28**(12), 2499-2510.

- Konsman, J. P., Vignes, S., Mackerlova, L., Bristow, A. & Blomqvist, A.** (2004). Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol*, **472**(1), 113-129.
- Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., et al.** (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem*, **221**(3), 889-897.
- Kotenko, S. V. & Pestka, S.** (2000). Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene*, **19**(21), 2557-2565.
- Kouzarides, T. & Ziff, E.** (1989). Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature*, **340**(6234), 568-571.
- Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S. & Leutz, A.** (1994). Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev*, **8**(22), 2781-2791.
- Kozak, W., Kluger, M. J., Soszynski, D., Conn, C. A., Rudolph, K., Leon, L. R., et al.** (1998). IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci*, **856**, 33-47.
- Kozak, W., Wrotek, S. & Kozak, A.** (2006). Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**(4), R871-880.
- Kozak, W., Zheng, H., Conn, C. A., Soszynski, D., van der Ploeg, L. H. & Kluger, M. J.** (1995). Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol*, **269**(5 Pt 2), R969-977.
- Krebs, D. L. & Hilton, D. J.** (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, **19**(5), 378-387.
- Krogmann, A., Staiger, K., Haas, C., Gommer, N., Peter, A., Heni, M., et al.** (2011). Inflammatory response of human coronary artery endothelial cells to saturated long-chain fatty acids. *Microvasc Res*, **81**(1), 52-59.
- Krueger, J. M. & Majde, J. A.** (1994). Microbial products and cytokines in sleep and fever regulation. *Crit Rev Immunol*, **14**(3-4), 355-379.
- Krzyszton, C. P., Sparkman, N. L., Grant, R. W., Buchanan, J. B., Broussard, S. R., Woods, J., et al.** (2008). Exacerbated fatigue and motor deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral immune stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**(4), R1109-1114.
- Kujubu, D. A. & Herschman, H. R.** (1992). Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J Biol Chem*, **267**(12), 7991-7994.
- Kuo, C. F., Xanthopoulos, K. G. & Darnell, J. E., Jr.** (1990). Fetal and adult localization of C/EBP: evidence for combinatorial action of transcription factors in cell-specific gene expression. *Development*, **109**(2), 473-481.
- Kurreck, J.** (2009). RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, **48**(8), 1378-1398.
- Kyrkanides, S., O'Banion, M. K., Whiteley, P. E., Daeschner, J. C. & Olschowka, J. A.** (2001). Enhanced glial activation and expression of specific CNS inflammation-related molecules in aged versus young rats following cortical stab injury. *J Neuroimmunol*, **119**(2), 269-277.
- Laburn, H., Mitchell, D. & Rosendorff, C.** (1977). Effects of prostaglandin antagonism on sodium arachidonate fever in rabbits. *J Physiol*, **267**(2), 559-570.
- Lacroix, S. & Rivest, S.** (1998). Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J Neurochem*, **70**(2), 452-466.
- Lacroix, S., Feinstein, D. & Rivest, S.** (1998). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol*, **8**(4), 625-640.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680-685.

- Laflamme, N. & Rivest, S.** (1999). Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain. *J Neurochem*, **73**(1), 309-321.
- Laflamme, N. & Rivest, S.** (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *Faseb J*, **15**(1), 155-163.
- Laflamme, N., Lacroix, S. & Rivest, S.** (1999). An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J Neurosci*, **19**(24), 10923-10930.
- Lai, C. S., Lee, J. H., Ho, C. T., Liu, C. B., Wang, J. M., Wang, Y. J., et al.** (2009). Rosmanol potently inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through downregulating MAPK, NF-kappaB, STAT3 and C/EBP signaling pathways. *J Agric Food Chem*, **57**(22), 10990-10998.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J. & McKnight, S. L.** (1988). Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev*, **2**(7), 786-800.
- Lang, R., Patel, D., Morris, J. J., Rutschman, R. L. & Murray, P. J.** (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol*, **169**(5), 2253-2263.
- Langhans, W., Geary, N. & Lutz, T. A.** (2010). Steuerung der Nahrungsaufnahme. In W. Engelhardt & G. Breves (Eds.), *Physiologie der Haustiere* (3 ed.). Stuttgart: Enke Verlag.
- Lau, W. W., Ng, J. K., Lee, M. M., Chan, A. S. & Wong, Y. H.** (2011). Interleukin-6 autocrine signaling mediates melatonin MT(1/2) receptor-induced STAT3 Tyr(705) phosphorylation. *J Pineal Res*.
- Lawrence, T., Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R. & Willoughby, D. A.** (2001). Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med*, **7**(12), 1291-1297.
- Lawson, L. J. & Perry, V. H.** (1995). The unique characteristics of inflammatory responses in mouse brain are acquired during postnatal development. *Eur J Neurosci*, **7**(7), 1584-1595.
- Laye, S., Parnet, P., Goujon, E. & Dantzer, R.** (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res*, **27**(1), 157-162.
- Lazarus, M., Yoshida, K., Coppari, R., Bass, C. E., Mochizuki, T., Lowell, B. B., et al.** (2007). EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci*, **10**(9), 1131-1133.
- Lebel, E., Vallieres, L. & Rivest, S.** (2000). Selective involvement of interleukin-6 in the transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 in the brain during systemic immune challenges. *Endocrinology*, **141**(10), 3749-3763.
- LeClair, K. P., Blannar, M. A. & Sharp, P. A.** (1992). The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(17), 8145-8149.
- Ledeboer, A., Binnekade, R., Breve, J. J., Bol, J. G., Tilders, F. J. & Van Dam, A. M.** (2002). Site-specific modulation of LPS-induced fever and interleukin-1 beta expression in rats by interleukin-10. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **282**(6), R1762-1772.
- Ledeboer, A., Breve, J. J., Poole, S., Tilders, F. J. & Van Dam, A. M.** (2000). Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*, **30**(2), 134-142.
- Lee, H. Y., Whiteside, M. B. & Herkenham, M.** (1998). Area postrema removal abolishes stimulatory effects of intravenous interleukin-1beta on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and c-fos mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull*, **46**(6), 495-503.
- Lee, S. Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K. A., Nussenzweig, M. C. & Choi, Y.** (1997). TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity*, **7**(5), 703-713.
- Legler, D. F., Micheau, O., Doucey, M. A., Tschopp, J. & Bron, C.** (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*, **18**(5), 655-664.
- LeMay, L. G., Vander, A. J. & Kluger, M. J.** (1990). Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **258**(3), R798-803.

- Lenczowski, M. J., Bluthe, R. M., Roth, J., Rees, G. S., Rushforth, D. A., van Dam, A. M., et al. (1999). Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. *Am J Physiol*, 276(3 Pt 2), R652-658.
- Lentsch, A. B., Shanley, T. P., Sarma, V. & Ward, P. A. (1997). In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest*, 100(10), 2443-2448.
- Leon, L. R. (2002). Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol*, 92(6), 2648-2655.
- Leon, L. R. (2004). Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Front Biosci*, 9, 1877-1888.
- Leon, L. R., Kozak, W. & Kluger, M. J. (1998a). Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*, 856, 69-75.
- Leon, L. R., Kozak, W., Rudolph, K. & Kluger, M. J. (1999). An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 2), R81-89.
- Leon, L. R., White, A. A. & Kluger, M. J. (1998). Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 2), R269-277.
- Levchenko, A., Bruck, J. & Sternberg, P. W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), 5818-5823.
- Li, S., Ballou, L. R., Morham, S. G. & Blatteis, C. M. (2001). Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1beta. *Brain Res*, 910(1-2), 163-173.
- Li, H., Gade, P., Xiao, W. & Kalvakolanu, D. V. (2007). The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta. *Cell Mol Immunol*, 4(6), 407-418.
- Li, W. & Szoka, F. C., Jr. (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res*, 24(3), 438-449.
- Li, S., Wang, Y., Matsumura, K., Ballou, L. R., Morham, S. G. & Blatteis, C. M. (1999). The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res*, 825(1-2), 86-94.
- Li, Y., Karlin, A., Loike, J. D. & Silverstein, S. C. (2002). A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12), 8289-8294.
- Liao, W., Yu, C., Wen, J., Jia, W., Li, G., Ke, Y., et al. (2009). Adiponectin induces interleukin-6 production and activates STAT3 in adult mouse cardiac fibroblasts. *Biol Cell*, 101(5), 263-272.
- Liebermeister, C. (1887). Vorlesungen über spezielle Pathologie und Therapie. Verlag-Vogel, Leipzig.
- Lin, J. H. & Lin, M. T. (1996a). Inhibition of nitric oxide synthase or cyclo-oxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis attenuates interleukin-1 beta fever in rabbits. *Neurosci Lett*, 208(3), 155-158.
- Lin, J. H. & Lin, M. T. (1996). Nitric oxide synthase-cyclo-oxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis: possible role in pyrogenic fever in rabbits. *Br J Pharmacol*, 118(1), 179-185.
- Lin, M. T. & Lin, J. H. (2000). Involvement of tyrosine kinase in the pyrogenic fever exerted by NOS pathways in organum vasculosum laminae terminalis. *Neuropharmacology*, 39(2), 347-352.
- Liu, S., Croniger, C., Arizmendi, C., Harada-Shiba, M., Ren, J., Poli, V., et al. (1999). Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene. *J Clin Invest*, 103(2), 207-213.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4(6), 357-362.
- Long, N. C., Kunkel, S. L., Vander, A. J. & Kluger, M. J. (1990). Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 258(2), R332-337.

- Long, N. C., Otterness, I., Kunkel, S. L., Vander, A. J. & Kluger, M. J.** (1990a). Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol*, 259(4 Pt 2), R724-728.
- Löwenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russell, S. W., et al.** (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20), 9730-9734.
- Lu, Y. C., Kim, I., Lye, E., Shen, F., Suzuki, N., Suzuki, S., et al.** (2009). Differential role for c-Rel and C/EBPbeta/delta in TLR-mediated induction of proinflammatory cytokines. *J Immunol*, 182(11), 7212-7221.
- Luheshi, G. N., Stefferl, A., Turnbull, A. V., Dascombe, M. J., Brouwer, S., Hopkins, S. J., et al.** (1997). Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat. *Am J Physiol*, 272(3 Pt 2), R862-868.
- Luheshi, G. N. & Rothwell, N.** (1996). Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol*, 109(4), 301-307.
- Luheshi, G. N., Miller, A. J., Brouwer, S., Dascombe, M. J., Rothwell, N. J. & Hopkins, S. J.** (1996). Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. *Am J Physiol*, 270(1 Pt 1), E91-95.
- Luo, C. & Laaja, P.** (2004). Inhibitors of JAKs/STATs and the kinases: a possible new cluster of drugs. *Drug Discov Today*, 9(6), 268-275.
- Lutticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., et al.** (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, 263(5143), 89-92.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D.** (2006). *Der Experimentator Immunologie* (2 ed.). München.
- Macallan, D. C.** (1999). Wasting in HIV infection and AIDS. *J Nutr*, 129(1S Suppl), 238S-242S.
- MacRae, I. J. & Doudna, J. A.** (2007). Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 17(1), 138-145.
- Maimone, D., Cioni, C., Rosa, S., Macchia, G., Aloisi, F. & Annunziata, P.** (1993). Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. *J Neuroimmunol*, 47(1), 73-81.
- Mangiapane, M. L. & Simpson, J. B.** (1983). Drinking and pressor responses after acetylcholine injection into subfornical organ. *Am J Physiol*, 244(4), R508-513.
- Marpegan, L., Bekinschtein, T. A., Costas, M. A. & Golombek, D. A.** (2005). Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *J Neuroimmunol*, 160(1-2), 102-109.
- Marsh, C. B. & Wewers, M. D.** (1994). Cytokine-induced interleukin-1 receptor antagonist release in mononuclear phagocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10(5), 521-525.
- Martin, M., Bol, G. F., Eriksson, A., Resch, K. & Brigelius-Flohe, R.** (1994). Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur J Immunol*, 24(7), 1566-1571.
- Martin, S. M., Malkinson, T. J., Veale, W. L. & Pittman, Q. J.** (1990). Depletion of brain alpha-MSH alters prostaglandin and interleukin fever in rats. *Brain Res*, 526(2), 351-354.
- Mata, J., Curado, S., Ephrussi, A. & Rorth, P.** (2000). Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in Drosophila by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell*, 101(5), 511-522.
- Mathison, J. C., Tobias, P. S., Wolfson, E. & Ulevitch, R. J.** (1992). Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol*, 149(1), 200-206.
- Matsuda, T., Hori, T. & Nakashima, T.** (1992). Thermal and PGE₂ sensitivity of the organum vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices. *J Physiol*, 454, 197-212.
- Matsumoto, H., Kumon, Y., Watanabe, H., Ohnishi, T., Shudou, M., Ii, C., et al.** (2007). Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J Neurosci Res*, 85(5), 994-1009.
- Matsumura, K. & Kobayashi, S.** (2004). Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci*, 9, 2819-2826.

- Matsumura, K., Cao, C. & Watanabe, Y.** (1998). Prostaglandin system in the brain: sites of biosynthesis and sites of action under normal and hyperthermic states. *Prog Brain Res*, **115**, 275-295.
- Matsumura, K. Cao, C., Ozaki, M., Morii, H., Nakadate, K. & Watanabe, Y.** (1998a). Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Neurosci.*, **18(16)**, 6279-6289.
- Matsuo, Y., Onodera, H., Shiga, Y., Nakamura, M., Ninomiya, M., Kihara, T., et al.** (1994). Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke*, **25(7)**, 1469-1475.
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., et al.** (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90(21)**, 10193-10197.
- May, S. A., Hooke, R. E. & Lees, P.** (1991). Late-stage mediators of the inflammatory response: identification of interleukin-1 and a casein-degrading enzyme in equine acute inflammatory exudates. *Res Vet Sci*, **50(1)**, 14-17.
- Mazia, D., Schatten, G. & Sale, W.** (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*, **66(1)**, 198-200.
- McClellan, J. L., Klir, J. J., Morrow, L. E. & Kluger, M. J.** (1994). Central effects of glucocorticoid receptor antagonist RU-38486 on lipopolysaccharide and stress-induced fever. *Am J Physiol*, **267(3 Pt 2)**, R705-711.
- McDonald, P. P., Bald, A. & Cassatella, M. A.** (1997). Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*, **89(9)**, 3421-3433.
- McKinley, M. J., Badoer, E., Vivas, L. & Oldfield, B. J.** (1995). Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. *Brain Res Bull*, **37(2)**, 131-137.
- McKinley, M. J., Gerstberger, R., Mathai, B. J., Oldfield & Schmidt, H. A.** (1999a). The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J Clin Neurosci*, **6**, 289-301.
- McKinley, M. J., Mathai, M. L., Pennington, G., Rundgren, M. & Vivas, L.** (1999). Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. *Am J Physiol*, **276(3 Pt 2)**, R673-683.
- McKinley, M. J., McAllen, R. M., Davern, P., Giles, M. E., Penschow, J., Sunn, N., et al.** (2003). The Sensory Circumventricular Organs of the Mammalian Brain. Subfornical Organ, OVLT and Area Postrema. (1 ed.), Berlin, Heidelberg, New York, Hong Kong, London, Milan, Paris.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., et al.** (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*, **278(5339)**, 860-866.
- Metz, R. & Ziff, E.** (1991). cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev*, **5(10)**, 1754-1766.
- Meyer, T., Gavenis, K. & Vinkemeier, U.** (2002). Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res*, **272(1)**, 45-55.
- Micheau, O. & Tschopp, J.** (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, **114(2)**, 181-190.
- Miller, A. J., Hopkins, S. J. & Luheshi, G. N.** (1997a). Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Br J Pharmacol*, **120(7)**, 1274-1279.
- Miller, A. J., Luheshi, G. N., Rothwell, N. J. & Hopkins, S. J.** (1997). Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am J Physiol*, **272(3 Pt 2)**, R857-861.
- Milton, A. S.** (1998). Prostaglandins and fever. *Prog Brain Res*, **115**, 129-139.
- Milton, A. S. & Wendlandt, S.** (1971). Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J Physiol*, **218(2)**, 325-336.
- Minghetti, L., Nicolini, A., Polazzi, E., Greco, A., Perretti, M., Parente, L., et al.** (1999). Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *Br J Pharmacol*, **126(6)**, 1307-1314.

- Mizuno, T., Sawada, M., Marunouchi, T. & Suzumura, A. (1994). Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(3), 1907-1915.
- Morgan, S. J. & Darling, D.C. (1994). *Kultur tierischer Zellen*. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Morimoto, A., Sakata, Y., Watanabe, T. & Murakami, N. (1989). Characteristics of fever and acute-phase response induced in rabbits by IL-1 and TNF. *Am J Physiol*, 256(1 Pt 2), R35-41.
- Morrison, D. K. & Davis, R. J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 91-118.
- Morrow, L. E., McClellan, J. L., Conn, C. A. & Kluger, M. J. (1993). Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. *Am J Physiol*, 264(5 Pt 2), R1010-1016.
- Morrow, L. E., McClellan, J. L., Klir, J. J. & Kluger, M. J. (1996). The CNS site of glucocorticoid negative feedback during LPS- and psychological stress-induced fevers. *Am J Physiol*, 271(3 Pt 2), R732-737.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mouihate, A. & Pittman, Q. J. (2003). Neuroimmune response to endogenous and exogenous pyrogens is differently modulated by sex steroids. *Endocrinology*, 144(6), 2454-2460.
- Mouihate, A., Boisse, L. & Pittman, Q. J. (2004). A novel antipyretic action of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in the rat brain. *J Neurosci*, 24(6), 1312-1318.
- Mukaida, N., Mahe, Y. & Matsushima, K. (1990). Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem*, 265(34), 21128-21133.
- Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics* (6 ed.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350.
- Munck, A. & Holbrook, N. J. (1984). Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells. Rapid kinetic behavior and a cyclic model. *J Biol Chem*, 259(2), 820-831.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., et al. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*, 260(5115), 1808-1810.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., et al. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275(42), 32783-32792.
- Murray, P. J. (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*, 6(4), 379-386.
- Nabel, G. & Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, 326(6114), 711-713.
- Nadeau, S. & Rivest, S. (1999). Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience*, 93(4), 1449-1464.
- Nadeau, S. & Rivest, S. (2000). Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci*, 20(9), 3456-3468.
- Nadeau, S., Hein, P., Fernandes, K. J., Peterson, A. C. & Miller, F. D. (2005). A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury. *Mol Cell Neurosci*, 29(4), 525-535.
- Nadjar, A., Bluthe, R. M., May, M. J., Dantzer, R. & Parnet, P. (2005a). Inactivation of the cerebral NFkappaB pathway inhibits interleukin-1beta-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei. *Neuropsychopharmacology*, 30(8), 1492-1499.
- Nadjar, A., Combe, C., Laye, S., Tridon, V., Dantzer, R., Amedee, T., et al. (2003). Nuclear factor kappaB nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse. *J Neurochem*, 87(4), 1024-1036.

- Nadjar, A., Tridon, V., May, M. J., Ghosh, S., Dantzer, R., Amedee, T., et al.** (2005). NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, **25(8)**, 1047-1059.
- Nagashima, K., Nakai, S., Tanaka, M. & Kanosue, K.** (2000). Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci*, **85(1-3)**, 18-25.
- Nakajima, S., Kato, H., Takahashi, S., Johno, H. & Kitamura, M.** (2011). Inhibition of NF-kappaB by MG132 through ER stress-mediated induction of LAP and LIP. *FEBS Lett*, **585(14)**, 2249-2254.
- Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T., et al.** (1993). Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90(6)**, 2207-2211.
- Nakamori, T., Morimoto, A., Yamaguchi, K., Watanabe, T. & Murakami, N.** (1994). Interleukin-1 beta production in the rabbit brain during endotoxin-induced fever. *J Physiol*, **476(1)**, 177-186.
- Nakamori, T., Morimoto, A., Yamaguchi, K., Watanabe, T., Long, N. C. & Murakami, N.** (1993). Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) is a brain site to produce interleukin-1 beta during fever. *Brain Res*, **618(1)**, 155-159.
- Nakamura, H., Seto, Y., Motoyoshi, S., Kadokawa, T. & Sunahara, N.** (1988). Recombinant human tumor necrosis factor causes long-lasting and prostaglandin-mediated fever, with little tolerance, in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*, **245(1)**, 336-341.
- Nakamura, K., Kaneko, T., Yamashita, Y., Hasegawa, H., Katoh, H., Ichikawa, A., et al.** (1999). Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, **260(2)**, 117-120.
- Nakamura, K., Matsumura, K., Kaneko, T., Kobayashi, S., Katoh, H. & Negishi, M.** (2002). The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci*, **22(11)**, 4600-4610.
- Nakano, M., Denda, N., Matsumoto, M., Kawamura, M., Kawakubo, Y., Hatanaka, K., et al.** (2007). Interaction between cyclooxygenase (COX)-1- and COX-2-products modulates COX-2 expression in the late phase of acute inflammation. *Eur J Pharmacol*, **559(2-3)**, 210-218.
- Nakashima, T., Hori, T., Mori, T., Kuriyama, K. & Mizuno, K.** (1989). Recombinant human interleukin-1 beta alters the activity of preoptic thermosensitive neurons in vitro. *Brain Res Bull*, **23(3)**, 209-213.
- Nakashima, T., Kiyohara, T. & Hori, T.** (1991). Tumor necrosis factor-beta specifically inhibits the activity of preoptic warm-sensitive neurons in tissue slices. *Neurosci Lett*, **128(1)**, 97-100.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D. J., Woodgett, J. R., Balsano, C., et al.** (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science*, **275(5297)**, 200-203.
- Natsuka, S., Akira, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Sugita, T., Isshiki, H., et al.** (1992). Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood*, **79(2)**, 460-466.
- Nava, F., Calapai, G., Facciola, G., Cuzzocrea, S., Marciano, M. C., De Sarro, A., et al.** (1997). Effects of interleukin-10 on water intake, locomotory activity, and rectal temperature in rat treated with endotoxin. *Int J Immunopharmacol*, **19(1)**, 31-38.
- Netea, M. G., Kullberg, B. J. & Van Der Meer, J. W.** (1999). Do only circulating pyrogenic cytokines act as mediators in the febrile response? A hypothesis. *Eur J Clin Invest*, **29(4)**, 351-356.
- Nguyen, M. D., Julien, J. P. & Rivest, S.** (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*, **3(3)**, 216-227.
- Niehof, M., Manns, M. P. & Trautwein, C.** (1997). CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol Cell Biol*, **17(7)**, 3600-3613.
- Niehof, M., Streetz, K., Rakemann, T., Bischoff, S. C., Manns, M. P., Horn, F., et al.** (2001). Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3. *J Biol Chem*, **276(12)**, 9016-9027.
- Nihiro, H., Otsuka, T., Tanabe, T., Hara, S., Kuga, S., Nemoto, Y., et al.** (1995). Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood*, **85(12)**, 3736-3745.

- Niizuma, K., Endo, H., Nito, C., Myer, D. J., Kim, G. S. & Chan, P. H. (2008). The PIDosome mediates delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(42), 16368-16373.
- Nijsten, M. W., de Groot, E. R., ten Duis, H. J., Klasen, H. J., Hack, C. E. & Aarden, L. A. (1987). Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet*, 2(8564), 921.
- Nishizawa, M. & Nagata, S. (1990). Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages. *Mol Cell Biol*, 10(5), 2002-2011.
- Nussler, A. K. & Billiar, T. R. (1993). Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol*, 54(2), 171-178.
- O'Banion, M. K. (1999). Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 13(1), 45-82.
- Ogimoto, K., Harris, M. K., Jr. & Wisse, B. E. (2006). MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Endocrinology*, 147(9), 4445-4453.
- Oka, Y., Ibuki, T., Matsumura, K., Namba, M., Yamazaki, Y., Poole, S., et al. (2007). Interleukin-6 is a candidate molecule that transmits inflammatory information to the CNS. *Neuroscience*, 145(2), 530-538.
- Opal, S. M. & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162-1172.
- Oprica, M., Eriksson, C. & Schultzberg, M. (2003). Inflammatory mechanisms associated with brain damage induced by kainic acid with special reference to the interleukin-1 system. *J Cell Mol Med*, 7(2), 127-140.
- Ossipow, V., Descombes, P. & Schibler, U. (1993). CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17), 8219-8223.
- Ota, K., Katafuchi, T., Takaki, A. & Hori, T. (1997). AV3V neurons that send axons to hypothalamic nuclei respond to the systemic injection of IL-1 β . *Am J Physiol*, 272, R532-R540.
- Ott, D., Murgott, J., Rafalzik, S., Wuchert, F., Schmalenbeck, B., Roth, J., et al. (2010). Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res*, 1363, 93-106.
- Pahan, K., Jana, M., Liu, X., Taylor, B. S., Wood, C. & Fischer, S. M. (2002). Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, inhibits the induction of nitric-oxide synthase in human astrocytes. *J Biol Chem*, 277(48), 45984-45991.
- Palin, K., McCusker, R. H., Strle, K., Moos, F., Dantzer, R. & Kelley, K. W. (2008). Tumor necrosis factor- α -induced sickness behavior is impaired by central administration of an inhibitor of c-jun N-terminal kinase. *Psychopharmacology (Berl)*, 197(4), 629-635.
- Palmi, M., Frosini, M., Sgaragli, G. P., Becherucci, C., Perretti, M. & Parente, L. (1995). Inhibition of interleukin-1 beta-induced pyresis in the rabbit by peptide 204-212 of lipocortin 5. *Eur J Pharmacol*, 281(1), 97-99.
- Papadimitriou, A. & Priftis, K. N. (2009). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 265-271.
- Papadimitriou, J. M., Shilkin, K. B., Archer, J. M. & Walters, M. N. (1967). Inflammation induced by dimethylsulfoxide (DMSO). II. Ultrastructural investigation of the inflammatory phase. *Exp Mol Pathol*, 6(3), 347-360.
- Park, J. M., Greten, F. R., Wong, A., Westrick, R. J., Arthur, J. S., Otsu, K., et al. (2005). Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity*, 23(3), 319-329.
- Park, K. W., Lee, H. G., Jin, B. K. & Lee, Y. B. (2007). Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. *Exp Mol Med*, 39(6), 812-819.
- Patil, C. & Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3), 349-355.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th edn.* (4th ed.). San Diego: Academic Press.

- Pelletier, N., Boudreau, F., Yu, S. J., Zannoni, S., Boulanger, V. & Asselin, C.** (1998). Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*, **439(3)**, 275-280.
- Peña, G., Cai, B., Deitch, E. A. & Ulloa, L.** (2010). JAK2 inhibition prevents innate immune responses and rescues animals from sepsis. *J Mol Med (Berl)*, **88(8)**, 851-859.
- Penton-Rol, G., Orlando, S., Polentarutti, N., Bernasconi, S., Muzio, M., Introna, M., et al.** (1999). Bacterial lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA expression, of the IL-1 type II receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts. *J Immunol*, **162(5)**, 2931-2938.
- Perez-Capote, K., Saura, J., Serratosa, J. & Sola, C.** (2006). Expression of C/EBPalpha and C/EBPbeta in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. *Neurosci Lett*, **410(1)**, 25-30.
- Pfaffl, M. W.** (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR*, **10**, 92-95.
- Plata-Salaman, C. R.** (1999). 1998 Curt P. Richter Award. Brain mechanisms in cytokine-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology*, **24(1)**, 25-41.
- Poli, V.** (1998). The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, **273(45)**, 29279-29282.
- Poli, V., Mancini, F. P. & Cortese, R.** (1990). IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell*, **63(3)**, 643-653.
- Poltorak, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Citterio, S. & Beutler, B.** (2000). Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97(5)**, 2163-2167.
- Pope, R. M., Leutz, A. & Ness, S. A.** (1994). C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. *J Clin Invest*, **94(4)**, 1449-1455.
- Pope, R. M., Lovis, R., Mungre, S., Perlman, H., Koch, A. E. & Haines, G. K., 3rd.** (1999). C/EBP beta in rheumatoid arthritis: correlation with inflammation, not disease specificity. *Clin Immunol*, **91(3)**, 271-282.
- Price, C. J., Hoyda, T. D. & Ferguson, A. V.** (2008). The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*, **14(2)**, 182-194.
- Quan, N. & Blatteis, C. M.** (1989). Intrapreoptically microdialyzed and microinjected norepinephrine evokes different thermal responses. *Am J Physiol*, **257(4 Pt 2)**, R816-821.
- Quan, N., Stern, E. L., Whiteside, M. B. & Herkenham, M.** (1999). Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *J Neuroimmunol*, **93(1-2)**, 72-80.
- Quan, N., Whiteside, M. & Herkenham, M.** (1998). Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*, **83(1)**, 281-293.
- Quan, N., Whiteside, M., Kim, L. & Herkenham, M.** (1997). Induction of inhibitory factor kBalpha mRNA in the central nervous system after peripheral lipopolysaccharide administration: an in situ hybridization histochemistry study in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94(20)**, 10985-10990.
- Rafalzik, S., Pehl, U., Ott, D., Strotmann, J., Wolff, M. & Gerstberger, R.** (2008). Cholinergic signal transduction in the mouse sphenopalatine ganglion. *Brain Res*, **1241**, 42-55.
- Ramji, D. P. & Foka, P.** (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, **365(Pt 3)**, 561-575.
- Ramji, D. P., Vitelli, A., Tronche, F., Cortese, R. & Ciliberto, G.** (1993). The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Res*, **21(2)**, 289-294.
- Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z. & Rothe, M.** (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell*, **90(2)**, 373-383.
- Rehm, H. & Letzel, T.** (2010). *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics* (6 ed.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V. & Williams, L. T.** (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J*, **16**(5), 1080-1092.
- Rietschel, E. T., Seydel, U., Zahringer, U., Schade, U. F., Brade, L., Loppnow, H., et al.** (1991). Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *Infect Dis Clin North Am*, **5**(4), 753-779.
- Rivest, S.** (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun*, **17**(1), 13-19.
- Rivest, S.** (2009). Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*, **9**(6), 429-439.
- Robert, A., Olafsson, A. S., Lancaster, C. & Zhang, W. R.** (1991). Interleukin-1 is cytoprotective, antisecretory, stimulates PGE2 synthesis by the stomach, and retards gastric emptying. *Life Sci*, **48**(2), 123-134.
- Romanovsky, A. A.** (2004). Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? *Front Biosci*, **9**, 494-504.
- Romanovsky, A. A.** (2007). Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**(1), R37-46.
- Romanovsky, A. A. & Szekely, M.** (1998). Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med Hypotheses*, **50**(3), 219-226.
- Romanovsky, A. A., Kulchitsky, V. A., Akulich, N. V., Koulchitsky, S. V., Simons, C. T., Sessler, D. I., et al.** (1996). First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? *Am J Physiol*, **271**(1 Pt 2), R244-253.
- Romanovsky, A. A., Shido, O., Sakurada, S., Sugimoto, N. & Nagasaka, T.** (1996a). Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. *Am J Physiol*, **270**(4 Pt 2), R693-703.
- Romanovsky, A. A., Sugimoto, N., Simons, C. T. & Hunter, W. S.** (2003). The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling: a reappraisal of lesion experiments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**(2), R420-428.
- Ross, G., Hübschle, T., Pehl, U., Braun, H. A., Voigt, K., Gerstberger, R., et al.** (2003). Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol*, **94**(4), 1395-1402.
- Ross, G., Roth, J., Storr, B., Voigt, K. & Zeisberger, E.** (2000). Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. *Physiol Behav*, **71**(3-4), 305-313.
- Roth, J., Conn, C. A., Kluger, M. J. & Zeisberger, E.** (1993). Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am J Physiol*, **265**(3 Pt 2), R653-658.
- Roth, J.** (2000). Hyperthermia *Encyclopedia of stress* (3 ed., Vol. 2, pp. 431-438). San Diego, CA: Academic Press.
- Roth, J.** (2006). Endogenous antipyretics. *Clin Chim Acta*, **371**(1-2), 13-24.
- Roth, J. & De Souza, G. E.** (2001). Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res*, **34**(3), 301-314.
- Roth, J., Harré, E. M., Rummel, C., Gerstberger, R. & Hübschle, T.** (2004). Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci*, **9**, 290-300.
- Roth, J., Hübschle, T., Pehl, U., Ross, G. & Gerstberger, R.** (2002). Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. *Pflugers Arch*, **443**(3), 411-417.
- Roth, J., Martin, D., Storr, B. & Zeisberger, E.** (1998a). Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release. *J Physiol*, **509** (Pt 1), 267-275.
- Roth, J., Zeisberger, E., Vybiral, S. & Jansky, L.** (2004a). Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. *Front Biosci*, **9**, 816-826.

- Roth, J., McClellan, J. L., Kluger, M. J. & Zeisberger, E. (1994). Changes in body temperature and circulating levels of interleukin-6 after intra-arterial injections or infusions of tumor necrosis factor alpha in guinea pigs. *Experientia*, 50(9), 815-820.
- Roth, J., Rummel, C., Barth, S. W., Gerstberger, R. & Hübschle, T. (2006). Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurol Clin*, 24(3), 421-439, v.
- Roth, J., Storr, B., Voigt, K. & Zeisberger, E. (1998). Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1beta-induced fever in rats. *Life Sci*, 62(22), PL 345-350.
- Roux-Lombard, P. (1998). The interleukin-1 family. *Eur Cytokine Netw*, 9(4), 565-576.
- Rudaya, A. Y., Steiner, A. A., Robbins, J. R., Dragic, A. S. & Romanovsky, A. A. (2005). Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(5), R1244-1252.
- Ruetten, H. & Thiemermann, C. (1997). Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br J Pharmacol*, 122(1), 59-70.
- Rummel, C., Barth, S. W., Voss, T., Korte, S., Gerstberger, R., Hübschle, T., et al. (2005). Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(2), R340-R347.
- Rummel, C., Hübschle, T., Gerstberger, R. & Roth, J. (2004). Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localised inflammation. *J Physiol*, 557, 671-687.
- Rummel, C., Inoue, W., Poole, S. & Luheshi, G. N. (2010). Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Mol Psychiatry*, 15(5), 523-534.
- Rummel, C., Inoue, W., Sachot, C., Poole, S., Hübschle, T. & Luheshi, G. N. (2008). Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. *J Comp Neurol*, 511(3), 373-395.
- Rummel, C., Matsumura K., Luheshi, G.N. (2011) Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin (in press)*.
- Rummel, C., Sachot, C., Poole, S. & Luheshi, G. N. (2006). Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(5), R1316-1326.
- Rummel, C., Voss, T., Matsumura, K., Korte, S., Gerstberger, R., Roth, J., et al. (2005a). Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Comp Neurol*, 491(1), 1-14.
- Ruocco, M. R., Chen, X., Ambrosino, C., Dragonetti, E., Liu, W., Mallardo, M., et al. (1996). Regulation of HIV-1 long terminal repeats by interaction of C/EBP(NF-IL6) and NF-kappaB/Rel transcription factors. *J Biol Chem*, 271(37), 22479-22486.
- Sagar, S. M., Sharp, F. R. & Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240(4857), 1328-1331.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saito, N., Pulford, K. A., Breton-Gorius, J., Masse, J. M., Mason, D. Y. & Cramer, E. M. (1991). Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am J Pathol*, 139(5), 1053-1059.
- Sakata, Y., Morimoto, A., Long, N. C. & Murakami, N. (1991). Fever and acute-phase response induced in rabbits by intravenous and intracerebroventricular injection of interleukin-6. *Cytokine*, 3(3), 199-203.
- Saper, C. B. & Breder, C. D. (1992). Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog Brain Res*, 93, 419-428; discussion 428-419.
- Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., et al. (1999). Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*, 4(6), 339-351.

- Satriotomo, I., Bowen, K. K. & Vemuganti, R.** (2006). JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, **98**(5), 1353-1368.
- Sawchenko, P. E. & Swanson, L. W.** (1982). The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res*, **257**(3), 275-325.
- Scammell, T. E., Elmquist, J. K., Griffin, J. D. & Saper, C. B.** (1996). Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci*, **16**(19), 6246-6254.
- Scarlett, J. M., Jobst, E. E., Enriori, P. J., Bowe, D. D., Batra, A. K., Grant, W. F., et al.** (2007). Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. *Endocrinology*, **148**(9), 4217-4225.
- Schiltz, J. C. & Sawchenko, P. E.** (2003). Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci*, **8**, s1321-1329.
- Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A. J. & Rietschel, E. T.** (1995). Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*, **164**(6), 383-389.
- Schmid, H. A., Riedel, W. & Simon, E.** (1998). Role of nitric oxide in temperature regulation. *Prog Brain Res*, **115**, 87-110.
- Schottelius, A. J., Mayo, M. W., Sartor, R. B. & Baldwin, A. S., Jr.** (1999). Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*, **274**(45), 31868-31874.
- Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., et al.** (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, **249**(4975), 1429-1431.
- Schwab, J. M., Seid, K. & Schluesener, H. J.** (2001). Traumatic brain injury induces prolonged accumulation of cyclooxygenase-1 expressing microglia/brain macrophages in rats. *J Neurotrauma*, **18**(9), 881-890.
- Schwanger, M., Petersen, N., Prinz, S., Sallmann, S., Neher, M. & Spranger, M.** (2000). Adenosine-induced expression of interleukin-6 in astrocytes through protein kinase A and NF-IL-6. *Glia*, **31**(1), 51-58.
- Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., et al.** (1995). Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J*, **14**(9), 1932-1941.
- Seher, T. C. & Leptin, M.** (2000). Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation. *Curr Biol*, **10**(11), 623-629.
- Sehic, E., Szekely, M., Ungar, A. L., Oladehin, A. & Blatteis, C. M.** (1996). Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res Bull*, **39**(6), 391-399.
- Semenza, G. L.** (2000). Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res*, **1**(3), 159-162.
- Seo, I. A., Lee, H. K., Shin, Y. K., Lee, S. H., Seo, S. Y., Park, J. W., et al.** (2009). Janus Kinase 2 Inhibitor AG490 Inhibits the STAT3 Signaling Pathway by Suppressing Protein Translation of gp130. *Korean J Physiol Pharmacol*, **13**(2), 131-138.
- Sergeyev, V., Broberger, C. & Hokfelt, T.** (2001). Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin, CART and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*, **90**(2), 93-100.
- Serrats, J., Schiltz, J. C., Garcia-Bueno, B., van Rooijen, N., Reyes, T. M. & Sawchenko, P. E.** (2010). Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron*, **65**(1), 94-106.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr.** (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**(5), 815-820.
- Shibata, M. & Blatteis, C. M.** (1991). Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis. *Brain Res*, **562**(2), 323-326.
- Shih, S. T., Khorram, O., Lipton, J. M. & McCann, S. M.** (1986). Central administration of alpha-MSH antiserum augments fever in the rabbit. *Am J Physiol*, **250**(5 Pt 2), R803-806.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, K.** (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 405-455.

- Simpson, J. B. & Routtenberg, A.** (1973). Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science*, **181**(105), 1172-1175.
- Sims, J. E., Acres, R. B., Grubin, C. E., McMahan, C. J., Wignall, J. M., March, C. J., et al.** (1989). Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(22), 8946-8950.
- Siomi, H. & Siomi, M. C.** (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, **457**(7228), 396-404.
- Skinner, G. W., Mitchell, D. & Harden, L. M.** (2009). Avoidance of physical activity is a sensitive indicator of illness. *Physiol Behav*, **96**(3), 421-427.
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R.** (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**(9), 834-839.
- Smith, E. M., Cadet, P., Stefano, G. B., Opp, M. R. & Hughes, T. K., Jr.** (1999). IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. *J Neuroimmunol*, **100**(1-2), 140-148.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L.** (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**(5689), 1434-1437.
- Sonti, G., Flynn, M. C. & Plata-Salaman, C. R.** (1997). Interleukin-1 (IL-1) receptor type I mediates anorexia but not adipisia induced by centrally administered IL-1beta. *Physiol Behav*, **62**(5), 1179-1183.
- Spulber, S. & Schultzberg, M.** (2010). Connection between inflammatory processes and transmitter function-Modulatory effects of interleukin-1. *Prog Neurobiol*, **90**(2), 256-262.
- Sriram, K., Benkovic, S. A., Hebert, M. A., Miller, D. B. & O'Callaghan, J. P.** (2004). Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *J Biol Chem*, **279**(19), 19936-19947.
- Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., et al.** (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, **263**(5143), 92-95.
- Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. & Yancopoulos, G. D.** (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, **267**(5202), 1349-1353.
- Staiger, H., Staiger, K., Stefan, N., Wahl, H. G., Machicao, F., Kellerer, M., et al.** (2004). Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes*, **53**(12), 3209-3216.
- Stark, G. R.** (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E. & McCubrey, J. A.** (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, **18**(2), 189-218.
- Stein, B. & Baldwin, A. S., Jr.** (1993). Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, **13**(11), 7191-7198.
- Steiner, A. A., Antunes-Rodrigues, J., McCann, S. M. & Branco, L. G.** (2002). Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **282**(2), R584-593.
- Steiner, A. A., Chakravarty, S., Rudaya, A. Y., Herkenham, M. & Romanovsky, A. A.** (2006a). Bacterial lipopolysaccharide fever is initiated via Toll-like receptor 4 on hematopoietic cells. *Blood*, **107**(10), 4000-4002.
- Steiner, A. A., Hunter, J. C., Phipps, S. M., Nucci, T. B., Oliveira, D. L., Roberts, J. L., et al.** (2009). Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297**(2), R485-494.
- Steiner, A. A., Ivanov, A. I., Serrats, J., Hosokawa, H., Phayre, A. N., Robbins, J. R., et al.** (2006). Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol*, **4**(9), e284.
- Stephanou, A., Okosi, A., Knight, R. A., Chowdrey, H. S. & Latchman, D. S.** (1997). C/EBP activates the human corticotropin-releasing hormone gene promoter. *Mol Cell Endocrinol*, **134**(1), 41-50.

- Sterneck, E. & Johnson, P. F.** (1998). CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J Neurochem*, **70(6)**, 2424-2433.
- Stitt, J. T.** (1985). Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. *J Physiol*, **368**, 501-511.
- Stitt, J. T.** (1986). Prostaglandin E as the neural mediator of the febrile response. *Yale J Biol Med*, **59(2)**, 137-149.
- Stitt, J. T.** (1990). Passage of immunomodulators across the blood-brain barrier. *Yale J Biol Med*, **63(2)**, 121-131.
- Stitt, J. T.** (1991). Differential sensitivity in the sites of fever production by prostaglandin E1 within the hypothalamus of the rat. *J Physiol*, **432**, 99-110.
- Stowe, R. P., Peek, M. K., Cutchin, M. P. & Goodwin, J. S.** (2010). Plasma cytokine levels in a population-based study: relation to age and ethnicity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **65(4)**, 429-433.
- Suganuma, M., Okabe, S., Kurusu, M., Iida, N., Ohshima, S., Saeki, Y., et al.** (2002). Discrete roles of cytokines, TNF-alpha, IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. *Int J Oncol*, **20(1)**, 131-136.
- Sun, W., Choi, S. H., Park, S. K., Kim, S. J., Noh, M. R., Kim, E. H., et al.** (2007). Identification and characterization of novel activity-dependent transcription factors in rat cortical neurons. *J Neurochem*, **100(1)**, 269-278.
- Sung, H. Y., Francis, S. E., Crossman, D. C. & Kiss-Toth, E.** (2006). Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian trيبbles is cell-type specific. *Immunol Lett*, **104(1-2)**, 171-177.
- Swiergiel, A. H. & Dunn, A. J.** (2002). Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. *J Pharmacol Exp Ther*, **302(3)**, 1031-1036.
- Szebeni, J., Muggia, F. M. & Alving, C. R.** (1998). Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study. *J Natl Cancer Inst*, **90(4)**, 300-306.
- Szekely, M. & Szelenyi, Z.** (1979). Endotoxin fever in the rat. *Acta Physiol Acad Sci Hung*, **53(3)**, 265-277.
- Tabarelli, Z., Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Mello, C. F. & Rubin, M. A.** (2003). Antinociceptive effects of Cremophor EL orally administered to mice. *Braz J Med Biol Res*, **36(1)**, 119-123.
- Takahashi, Y., Smith, P., Ferguson, A. & Pittman, Q. J.** (1997). Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol*, **273(5 Pt 2)**, R1690-1695.
- Tanabe, T. & Tohnai, N.** (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 95-114.
- Tanaka, N., Hoshino, Y., Gold, J., Hoshino, S., Martiniuk, F., Kurata, T., et al.** (2005). Interleukin-10 induces inhibitory C/EBPbeta through STAT-3 and represses HIV-1 transcription in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **33(4)**, 406-411.
- Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., et al.** (1995). Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell*, **80(2)**, 353-361.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S.** (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J*, **16(24)**, 7432-7443.
- Taniguchi, A., Chen, X. M., Nagashima, K., Tanaka, M. & Kanosue, K.** (2003). Involvement of the raphe pallidus in the suppressive effect of preoptic warming on non-shivering thermogenesis in rats. *Brain Res*, **966(1)**, 103-109.
- Tatro, J. B.** (1996). Receptor biology of the melanocortins, a family of neuroimmunomodulatory peptides. *Neuroimmunomodulation*, **3(5)**, 259-284.
- Tatro, J. B.** (2000). Endogenous antipyretics. *Clin Infect Dis*, **31 Suppl 5**, S190-201.
- Taubenfeld, S. M., Milekic, M. H., Monti, B. & Alberini, C. M.** (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci*, **4(8)**, 813-818.
- Taylor, A. W.** (2005). The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) suppresses LPS-stimulated TLR4 with IRAK-M in macrophages. *J Neuroimmunol*, **162(1-2)**, 43-50.

- Tengku-Muhammad, T. S., Hughes, T. R., Ranki, H., Cryer, A. & Ramji, D. P.** (2000). Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines. *Cytokine*, **12**(9), 1430-1436.
- Thomis, D. C. & Berg, L. J.** (1997). The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling. *Curr Opin Immunol*, **9**(4), 541-547.
- Thompson, H. J., Hoover, R. C., Tkacs, N. C., Saatman, K. E. & McIntosh, T. K.** (2005). Development of posttraumatic hyperthermia after traumatic brain injury in rats is associated with increased periventricular inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*, **25**(2), 163-176.
- Tisdale, M. J.** (1999). Wasting in cancer. *J Nutr*, **129**(1S Suppl), 243S-246S.
- Tizard, I.** (2008). Sickness behavior, its mechanisms and significance. *Anim Health Res Rev*, **9**(1), 87-99.
- Töllner, B., Roth, J., Storr, B., Martin, D., Voigt, K. & Zeisberger, E.** (2000). The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. *Pflugers Arch*, **440**(6), 925-932.
- Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. & Chojkier, M.** (1993). Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*, **364**(6437), 544-547.
- Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T. & Chojkier, M.** (1994). Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J Clin Invest*, **93**(6), 2554-2561.
- Trebino, C. E., Stock, J. L., Gibbons, C. P., Naiman, B. M., Wachtmann, T. S., Umland, J. P., et al.** (2003). Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(15), 9044-9049.
- Tsushima, H. & Mori, M.** (2001). Involvement of protein kinase C and tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced anorexia. *Pharmacol Biochem Behav*, **69**(1-2), 17-22.
- Turnbull, A. V. & Rivier, C. L.** (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*, **79**(1), 1-71.
- Turner, R. & Tjian, R.** (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science*, **243**(4899), 1689-1694.
- Turrin, N. P. & Rivest, S.** (2004). Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229**(10), 996-1006.
- Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K. & Akira, S.** (2002). Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol*, **168**(11), 5811-5816.
- Ueno, N., Takegoshi, Y., Kamei, D., Kudo, I. & Murakami, M.** (2005). Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**(1), 70-76.
- Ueno, Y., Takano, N., Kanegane, H., Yokoi, T., Yachie, A., Miyawaki, T., et al.** (1989). The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. *Clin Exp Immunol*, **76**(3), 337-342.
- Vallières, L. & Rivest, S.** (1997). Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem*, **69**(4), 1668-1683.
- Vallières, L., Lacroix, S. & Rivest, S.** (1997). Influence of interleukin-6 on neural activity and transcription of the gene encoding corticotrophin-releasing factor in the rat brain: an effect depending upon the route of administration. *Eur J Neurosci*, **9**(7), 1461-1472.
- Van Dam, A. M., Brouns, M., Louisse, S. & Berkenbosch, F.** (1992). Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? *Brain Res*, **588**(2), 291-296.
- Van Dam, A. M., Brouns, M., Man, A. H. W. & Berkenbosch, F.** (1993). Immunocytochemical detection of prostaglandin E2 in microvasculature and in neurons of rat brain after administration of bacterial endotoxin. *Brain Res*, **613**(2), 331-336.
- Van Oers, M. H., Van der Heyden, A. A. & Aarden, L. A.** (1988). Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol*, **71**(2), 314-319.

- Vellucci, S. V. & Parrott, R. F.** (1998). Expression of mRNAs for vasopressin, oxytocin and corticotrophin releasing hormone in the hypothalamus, and of cyclooxygenases-1 and -2 in the cerebral vasculature, of endotoxin-challenged pigs. *Neuropeptides*, **32(5)**, 439-446.
- Vereker, E., O'Donnell, E. & Lynch, M. A.** (2000). The inhibitory effect of interleukin-1beta on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *J Neurosci*, **20(18)**, 6811-6819.
- Vichai, V., Suyarnsesthakorn, C., Pittayakhajonwut, D., Sriklung, K. & Kirtikara, K.** (2005). Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites. *Inflamm Res*, **54(4)**, 163-172.
- Vinson, C. R., Sigler, P. B. & McKnight, S. L.** (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, **246(4932)**, 911-916.
- Voss, T., Rummel, C., Gerstberger, R., Hübschle, T. & Roth, J.** (2006). Fever and circulating cytokines induced by double-stranded RNA in guinea pigs: dependence on the route of administration and effects of repeated injections. *Acta Physiol (Oxf)*, **187(3)**, 379-389.
- Vybíral, S., Cerny, L. & Jansky, L.** (1988). Mode of ACTH antipyretic action. *Brain Res Bull*, **21(4)**, 557-562.
- Vybíral, S., Szekely, M., Jansky, L. & Cerny, L.** (1987). Thermoregulation of the rabbit during the late phase of endotoxin fever. *Pflugers Arch*, **410(1-2)**, 220-222.
- Wang, L. H., Kirken, R. A., Erwin, R. A., Yu, C. R. & Farrar, W. L.** (1999). JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol*, **162(7)**, 3897-3904.
- Wang, Q., Fang, C. H. & Hasselgren, P. O.** (2001). Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **281(3)**, R1013-1023.
- Wanidworanun, C. & Strober, W.** (1993). Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol*, **151(12)**, 6853-6861.
- Ward, P. A. & Lentsch, A. B.** (2002). Endogenous regulation of the acute inflammatory response. *Mol Cell Biochem*, **234-235(1-2)**, 225-228.
- Watanabe, T., Makisumi, T., Macari, M., Tan, N., Nakamori, T., Nakamura, S., et al.** (1995). Febrile responses induced in adrenalectomized rats by administration of interleukin-1 beta or prostaglandin E2. *J Physiol*, **484 (Pt 3)**, 767-775.
- Watkins, L. R., Maier, S. F. & Goehler, L. E.** (1995). Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci*, **57(11)**, 1011-1026.
- Weaver, R. F. & Hedrick, P. W.** (1997). *Genetics* (3 ed.): Wm.C. Brown Publishers.
- Weber, K. & Osborn, M.** (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **244(16)**, 4406-4412.
- Weber, T.** (2009). Der Nucleus praeopticus medianus im Hypothalamus der Ratte als prä-integrative Struktur afferenter Signale zur Aufrechterhaltung des Salz- und Wasserhaushalts sowie der Körperkerntemperatur.
- Wegenka, U. M., Buschmann, J., Luttkien, C., Heinrich, P. C. & Horn, F.** (1993). Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*, **13(1)**, 276-288.
- Weiden, M., Tanaka, N., Qiao, Y., Zhao, B. Y., Honda, Y., Nakata, K., et al.** (2000). Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein beta expression. *J Immunol*, **165(4)**, 2028-2039.
- Weihua, X., Hu, J., Roy, S. K., Mannino, S. B. & Kalvakolanu, D. V.** (2000). Interleukin-6 modulates interferon-regulated gene expression by inducing the ISGF3 gamma gene using CCAAT/enhancer binding protein-beta(C/EBP-beta). *Biochim Biophys Acta*, **1492(1)**, 163-171.
- Welm, A. L., Mackey, S. L., Timchenko, L. T., Darlington, G. J. & Timchenko, N. A.** (2000). Translational induction of liver-enriched transcriptional inhibitory protein during acute phase response leads to repression of CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA. *J Biol Chem*, **275(35)**, 27406-27413.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z.** (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, **7(6)**, 837-847.

- Wilcockson, D. C., Campbell, S. J., Anthony, D. C. & Perry, V. H.** (2002). The systemic and local acute phase response following acute brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, **22(3)**, 318-326.
- Williams, S. C., Baer, M., Dillner, A. J. & Johnson, P. F.** (1995). CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *Embo J*, **14(13)**, 3170-3183.
- Williams, S. C., Cantwell, C. A. & Johnson, P. F.** (1991). A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev*, **5(9)**, 1553-1567.
- Wilson, H. L. & Roesler, W. J.** (2002). CCAAT/enhancer binding proteins: do they possess intrinsic cAMP-inducible activity? *Mol Cell Endocrinol*, **188(1-2)**, 15-20.
- Wong, M. L., Bongiorno, P. B., al-Shekhlee, A., Esposito, A., Khatri, P. & Licinio, J.** (1996). IL-1 beta, IL-1 receptor type I and iNOS gene expression in rat brain vasculature and perivascular areas. *Neuroreport*, **7(15-17)**, 2445-2448.
- Wong, M. L., Bongiorno, P. B., Rettori, V., McCann, S. M. & Licinio, J.** (1997). Interleukin (IL) 1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-10, and IL-13 gene expression in the central nervous system and anterior pituitary during systemic inflammation: pathophysiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94(1)**, 227-232.
- Woodroffe, M. N., Sarna, G. S., Wadhwa, M., Hayes, G. M., Loughlin, A. J., Tinker, A., et al.** (1991). Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol*, **33(3)**, 227-236.
- Wu, C. T., Eiserich, J. P., Ansari, A. A., Coppel, R. L., Balasubramanian, S., Bowlus, C. L., et al.** (2003). Myeloperoxidase-positive inflammatory cells participate in bile duct damage in primary biliary cirrhosis through nitric oxide-mediated reactions. *Hepatology*, **38(4)**, 1018-1025.
- Wuchert, F.** (2008). Die Bedeutung der Area postrema als zentralnervöser Sensor für inflammatorische Signale.
- Wuchert, F., Ott, D., Murgott, J., Rafalzik, S., Hitzel, N., Roth, J., et al.** (2008). Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*, **204(1-2)**, 66-74.
- Wuchert, F., Ott, D., Rafalzik, S., Roth, J. & Gerstberger, R.** (2009). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *J Neuroimmunol*, **206(1-2)**, 44-51.
- Xin, L. & Blatteis, C. M.** (1992). Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 in tissue slices: effects of indomethacin and naloxone. *Brain Res Bull*, **29(1)**, 27-35.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., et al.** (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, **101(2)**, 311-320.
- Xu, Z., Xue, T., Zhang, Z., Wang, X., Xu, P., Zhang, J., et al.** (2011). Role of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Up-Regulation of GFAP After Epilepsy. *Neurochem Res*.
- Xuan, Y. T., Guo, Y., Han, H., Zhu, Y. & Bolli, R.** (2001). An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98(16)**, 9050-9055.
- Yamagata, K., Matsumura, K., Inoue, W., Shiraki, T., Suzuki, K., Yasuda, S., et al.** (2001). Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci*, **21(8)**, 2669-2677.
- Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., et al.** (2007). Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J Exp Med*, **204(9)**, 2233-2239.
- Yan, S. F., Tritto, I., Pinsky, D., Liao, H., Huang, J., Fuller, G., et al.** (1995). Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J Biol Chem*, **270(19)**, 11463-11471.
- Yano, S., Fukunaga, K., Takiguchi, M., Ushio, Y., Mori, M. & Miyamoto, E.** (1996). Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J Biol Chem*, **271(38)**, 23520-23527.
- Yao, B., Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S. & Kolesnick, R.** (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature*, **378(6554)**, 307-310.

- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., et al.** (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J*, **18**(5), 1309-1320.
- Yasukawa, H., Sasaki, A. & Yoshimura, A.** (2000). Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol*, **18**, 143-164.
- Yin, M., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Lane, M. D., Chatterjee, S. & Diehl, A. M.** (1996). Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *J Biol Chem*, **271**(30), 17974-17978.
- Yokoyama, T. & Nakamura, T.** (2011). Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci*, **102**(6), 1115-1122.
- Yukawa, K., Tanaka, T., Tsuji, S. & Akira, S.** (1998). Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca²⁺/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, **273**(47), 31345-31351.
- Zeisberger, E.** (1999). From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *Journal of Thermal Biology*, **24**, 287-326.
- Zhang, Y. H., Lu, J., Elmquist, J. K. & Saper, C. B.** (2003). Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain. *J Comp Neurol*, **463**(1), 3-12.
- Zhang, Y. & Rom, W. N.** (1993). Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol Cell Biol*, **13**(6), 3831-3837.
- Zhang, Y., Turkson, J., Carter-Su, C., Smithgall, T., Levitzki, A., Kraker, A., et al.** (2000). Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J Biol Chem*, **275**(32), 24935-24944.
- Zhao, F. K., Chuang, L. F., Israel, M. & Chuang, R. Y.** (1989). Cremophor EL, a widely used parenteral vehicle, is a potent inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*, **159**(3), 1359-1367.
- Zhao, J., Li, G., Zhang, Y., Su, X. & Hang, C.** (2011). The potential role of JAK2/STAT3 pathway on the anti-apoptotic effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) after experimental traumatic brain injury of rats. *Cytokine*, **56**(2), 343-350.
- Zhao, X. & Siu, C. H.** (1996). Differential effects of two hydrocephalus/MASA syndrome-related mutations on the homophilic binding and neuritogenic activities of the cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem*, **271**(12), 6563-6566.
- Zhao, X., Zhuang, S., Chen, Y., Boss, G. R. & Pilz, R. B.** (2005). Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates CCAAT enhancer-binding protein beta functions through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*, **280**(38), 32683-32692.
- Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J. E., Jr.** (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, **264**(5155), 95-98.
- Zhu, S., Yoon, K., Sterneck, E., Johnson, P. F. & Smart, R. C.** (2002). CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(1), 207-212.
- Zimmer, J. A. & Lipton, J. M.** (1981). Central and peripheral injections of ACTH (1-24) reduce fever in adrenalectomized rabbits. *Peptides*, **2**(4), 413-417.

VIII. ANHANG

1. Publikationen

1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften

Damm, J., Luheshi, G.N., Gerstberger, R., Roth, J. & Rummel, C. (2011). Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *J Comp Neurol*, 519(3), 480-505.

Damm, J., Wiegand, F., Harden, L. M., Gerstberger, R., Rummel, C. & Roth, J. (2012). Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod. *Neuroscience*, 201, 166-183.

1.2. Veröffentlichte Abstracts

Damm, J., Gerstberger, R., Luheshi, G.N., Roth, J. & Rummel, C. (2009). Spatiotemporal activation of the transcription factor NF-IL6 in the rat brain during systemic inflammation. *Acta Physiologica*, 195 (Suppl. 669), 16.

Damm, J., Gerstberger, R., Roth, J., Luheshi, G.N. & Rummel, C. (2010). Nuclear factor interleukin 6 is a new delayed early cell activation marker in the rat brain during the course of LPS-induced systemic inflammation. *Brain Behav. Immun.* 24, (Suppl. 1), S5.

Damm, J., Gerstberger, R., Luheshi, G.N., Roth, J. & Rummel, C. (2010). Neuroanatomical distribution of nuclear NF-IL-6 immunoreactivity in the rat brain during the time course of systemic inflammation. In: *19. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Physiologischen Gesellschaft*: p 84. Verlag DVG Service, Giessen, ISBN-978-3-941703-55-1

Wiegand, F., Damm, J., Gerstberger, R., Rummel, C. & Roth, J. (2010). The Toll-like receptor (TLR)-7 agonist imiquimod induces a localized subcutaneous inflammatory response in rats. In: *19. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Physiologischen Gesellschaft*: p 85, Verlag DVG Service, Giessen, ISBN-978-3-941703-55-1

Damm, J., Harden, L., Gerstberger, R., Roth, J. & Rummel, C. (2011). The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness behavior, and alters the expression of pro- and antiinflammatory genes in the rat brain. *Brain Behav. Immun.* 25: S183-S184

2. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Dr. Christoph Rummel für die exzellente und außergewöhnlich engagierte Betreuung, sowie die gute, konstruktive und zumeist produktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie anzufertigen und insbesondere für sein Verständnis und die vielfältige Unterstützung vor allem in den letzten Phasen meiner Doktorandenzeit.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Joachim Roth, nicht nur für die Betreuung meiner Arbeit in der Anfangszeit, sondern auch für die unterstützende, kompetente Beratung in allen wissenschaftlichen Belangen, die uns allen jederzeit zur Verfügung stand und steht.

Allen dreien möchte ich außerdem für ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit danken, sowie für ihre Unterstützung während meiner ersten Schritte auf dem „internationalen, wissenschaftlichen Parkett“.

Ein herzlicher Dank geht an Daniela Ott für die Unterstützung bei der Durchführung des Western Blot, sowie für Rat und Tat in allen Lebenslagen. Des Weiteren danke ich Jolanta Murgott für die Unterstützung bei der Durchführung der Bioassays und Doreen Marks für die Einarbeitung in Telemetrie- und Immunotechniken, sowie die gute Zusammenarbeit im „Kittelgeschwader“.

Herrn Michael Haas und Herrn Jan Rodrigues-Fonseca danke ich für die sorgfältige Pflege der Versuchstiere. Danke auch an Herrn Herman Maurer, Herrn Gerd Herber und Herrn Alexander Heinrich für Maßanfertigungen, schnelle Hilfe bei technischen Problemen und für ihr Verständnis und ihre Geduld bei „akademischer Kompliziertheit“.

Dankeschön an Norma Hitzel und Florian Wuchert, die mich mit Erfahrungsberichten versorgt und damit dazu ermutigt haben, diese Arbeit anzufangen. Tanja Weber, Britta Deppe, Janine Avemary und Janina Welsch danke ich außerdem für den freundlichen Empfang im Institut.

Ein besonderer Dank gebührt meinem „officebuddy“ Thomas Hatzelmann, den Mitgliedern der Frühstücksrunde und auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ein wunderbares und unvergleichliches Arbeitsklima, sowie eine für mich unvergessliche Doktorandenzeit. Dazu haben auch Dr. Lois Harden und Dr. Denis Melo Soares beigetragen, durch ihre Freundschaft, den frischen Wind, den sie in unsere Arbeitsgruppe gebracht haben und die vielen „internationalen Feierlichkeiten“.

Susanne Held möchte ich für die lange Zeit des harmonischen Zusammenwohnens und ihre Freundschaft und Unterstützung während Studium und Doktorarbeit danken.

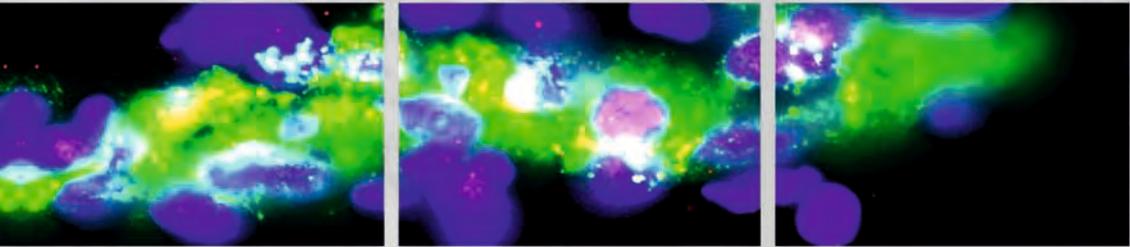
Danke auch an meine Geschwister, die mich auf meinem bisherigen Weg uneingeschränkt unterstützt haben, ebenso wie meine Mutter, die sich außerdem als Korrekturleserin zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer, persönlicher Dank geht natürlich an Florian Wiegand, der, neben der Hilfe im OP, durch moralische Unterstützung, Rückhalt, liebevollen Zuspruch und ein immer offenes Ohr für all meine Sorgen sehr zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem haben die Zusammenarbeit mit ihm, die gemeinsame Entwicklung von Lösungsstrategien, die vielen guten Gespräche und die gelegentlichen kleinen Ablenkungen die Zeit in der Physio für mich zu etwas ganz besonderem gemacht.

3. Erklärung:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Jelena Damm



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5926-2



9 783835 11959262