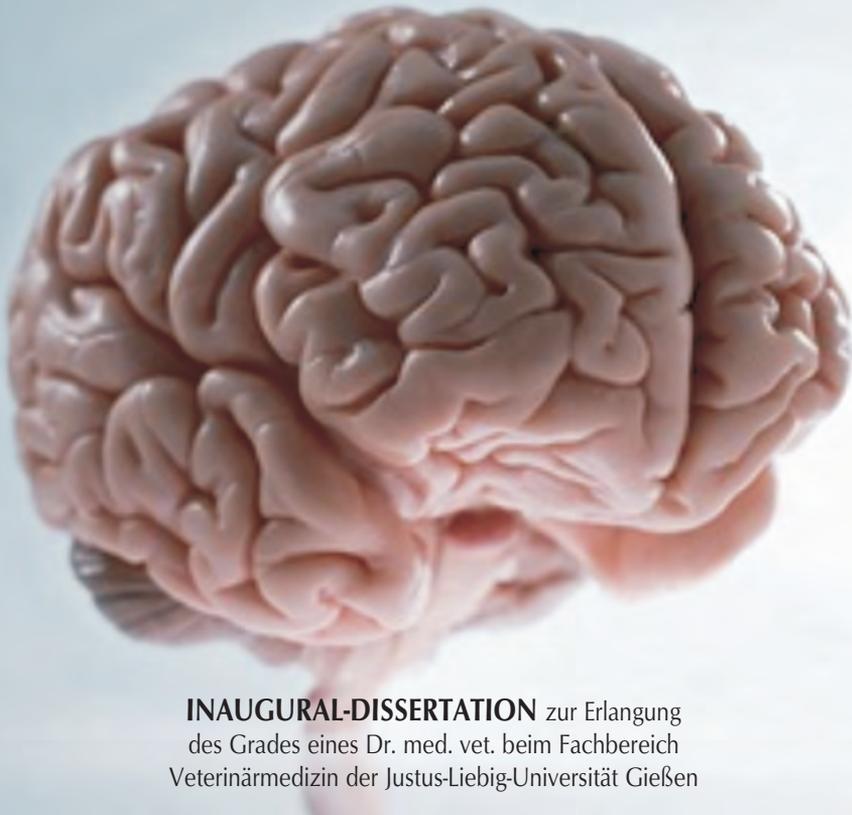


**Pyrogene Wirkung von mycoplasmalen Lipopeptiden
und bakteriellem Endotoxin bei Toll like Rezeptor-2-
defizienten Mäusen und bei CD36-defizienten
spontan hypertensiven Ratten**

JANINA WELSCH



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 2010

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 2010

© 2010 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 Veterinärphysiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

**Pyrogene Wirkung von mycoplasmalen Lipopeptiden und
bakteriellem Endotoxin bei Toll like Rezeptor-2-defizienten
Mäusen und bei CD36-defizienten spontan hypertensiven Ratten**

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

eingereicht von

Janina Welsch

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs für Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Joachim Roth

Prof. Dr. Eberhard Burkhardt

Tag der Disputation: 02.11.2009

<i>I. Einleitung</i> _____	11
1. Fieber als Komponente der Akute-Phase-Reaktion bei Infektions- und Entzündungsprozessen _____	11
2. Fieber als Reaktion des Organismus auf Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen _____	14
2.1. LPS _____	14
2.2. MALP-2 _____	15
2.3. FSL-1 _____	19
3. Bildung endogener Pyrogene nach Aktivierung von TLRs durch PAMPS _____	20
3.1. TLR 2/6 => MALP-2, FSL-1 _____	24
3.2. TLR 4 => LPS _____	28
3.3. Zytokine _____	28
3.3.1. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) _____	31
3.3.2. Interleukin-1 β (IL-1 β) _____	33
3.3.3. Interleukin-6 (IL-6) _____	34
4. Beeinflussung des Gehirns durch endogene Pyrogene _____	36
5. Finale Fiebermediatoren im ZNS _____	41
6. Ziele und zentrale Fragestellungen der vorliegenden Arbeit _____	48
6.1. Kritische Rolle von TLR2 bei der Fieberreaktion nach Stimulation mit mycoplasmalen Lipopeptiden _____	48
6.2. Rolle von CD36 bei der Fieberreaktion nach Stimulation mit mycoplasmalen Lipopeptiden _____	48
6.3. Untersuchte Fragestellungen _____	49
<i>II. Material und Methoden</i> _____	51
1. Material _____	51
1.1. Versuchstiere _____	51

1.1.1. Ratten	51
1.1.2. Mäuse	51
1.1.3. Klimakammer	52
1.2. Verwendete Geräte	53
1.3. Ge- und Verbrauchsmaterial	54
1.3.1. Medikamente	54
1.3.2. OP und OP-Vorbereitung	54
1.3.3. Intraperitoneale Sender	55
1.3.3.1. Rattensender	55
1.3.3.2. Mäusesender	55
1.3.4. Bioassay	56
1.3.5. Immunhistochemie	57
1.3.6. Verwendete Substanzen für die in vivo- Versuche	57
1.3.7. Verwendete Substanzen für den IL-6 Bioassay und das Passagieren der B9-Zelllinie	59
1.3.8. B9-Zelllinie	60
1.3.9. Verwendete Substanzen für den TNF Bioassay und das Passagieren der WEHI-Zelllinie	60
1.3.10. WEHI-Zellen	61
1.3.11. Verwendete Substanzen für den PGE ₂ -ELISA	61
1.3.12. Verwendete Substanzen und Antikörper für die Immunhistochemie	62
1.3.13. Verwendete Computerprogramme	63
2. Methoden	63
2.1. Blutdruckmessung bei den SH- und WKY-Ratten	63
2.2. Operation	64
2.2.1. Narkose	64
2.2.1.1. Narkose der Ratten	64
2.2.1.2. Narkose der Mäuse	65

2.2.2. Implantation des Senders _____	65
2.2.3. Telemetrische Aufzeichnung der Körpertemperatur und der Aktivität _____	66
2.2.4. Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben _____	67
2.2.5. Plasmaprobenanalyse _____	68
2.2.5.1. Nachweismethoden für Zytokine _____	68
2.2.5.2. IL-6 Bioassay _____	68
2.2.5.3. TNF α -Bioassay _____	71
2.2.5.4. PGE ₂ -ELISA _____	71
2.2.6. Immunhistochemische Untersuchung der Gehirnschnitte _____	73
2.2.6.1. Perfusion _____	73
2.2.6.2. Gehirnentnahme für die Immunhistochemie _____	74
2.2.6.3. Anfertigen der Gehirnschnitte _____	74
2.2.6.4. Grundlage der Immunhistochemie _____	75
2.2.6.5. Primärer Antikörper _____	75
2.2.6.6. Immunhistochemisches Protokoll _____	76
2.2.7. Auswertung der Daten und Statistik _____	81
2.2.7.1. Telemetrische Daten _____	81
2.2.7.2. Mikroskopie _____	82
2.2.7.3. IL-6 Bioassay _____	83
2.2.7.4. TNF Bioassay _____	84
2.2.7.5. PGE ₂ ELISA _____	85
III. Ergebnisse _____	86
1. Exogene Pyrogene: MALP-2, FSL-1 und LPS _____	86
2. TLR2-ko- und C57/BL-6-Kontroll-Mäuse _____	87
2.1. MALP-2-Stimulation _____	87
2.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer Injektion von MALP-2. Vergleich zwischen TLR2-ko- und C57/BL-6- Mäusen _____	87
2.1.2. Aktivitätsänderung nach MALP-2-Stimulation _____	92

2.1.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit MALP-2	95
2.1.3.1. Plasmawerte von TNF α	95
2.1.3.2. Plasmawerte von IL-6	96
2.2. FSL-1-Stimulation	98
2.2.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer Injektion von FSL-1. Vergleich zwischen TLR2-ko- und C57/BL6- Mäusen	98
2.2.2. Aktivitätsänderung nach FSL-1-Stimulation	102
2.2.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit FSL-1	105
2.2.3.1. Plasmawerte von TNF α	105
2.2.3.2. Plasmawerte von IL-6	106
2.3. LPS-Stimulation	107
2.3.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer Injektion von LPS. Vergleich zwischen TLR2-ko- und C57/BL-6- Mäusen	107
2.3.2. Aktivitätsänderung nach LPS-Stimulation	111
2.3.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF- α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit LPS	114
2.3.3.1. Plasmawerte von TNF- α	114
2.3.3.2. Plasmawerte von IL-6	115
3. SH- und WKY-Ratten	116
3.1. Blutdruckmessungen	116
3.2. MALP-2-Stimulation	117
3.2.1. Telemetrische Ergebnisse	117
3.2.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer MALP-2-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	117
3.2.1.2. Aktivitätsänderung nach intraperitonealer MALP-2-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	120

3.2.1.3. Futteraufnahme nach intraperitonealer MALP-2- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	123
3.2.1.4. Wasseraufnahme nach intraperitonealer MALP-2- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	126
3.2.1.5. Gewichtsveränderung nach intraperitonealer MALP-2- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	129
3.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit MALP-2	132
3.3.1.1. Plasmawerte von TNF α	132
3.3.1.2. Plasmawerte von IL-6	133
3.3.2. Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach intraperitonealer Injektion von MALP-2	135
3.3.2.1. Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3	135
3.4. FSL-1-Stimulation	141
3.4.1. Telemetrische Ergebnisse	141
3.4.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer FSL-1- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	141
3.4.1.2. Aktivitätsänderung nach intraperitonealer FSL-1- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	144
3.4.1.3. Futteraufnahme nach intraperitonealer FSL-1- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	147
3.4.1.4. Wasseraufnahme nach intraperitonealer FSL-1 Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	150
3.4.1.5. Gewichtsveränderung nach intraperitonealer FLS-1- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.	153
3.4.2. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit FSL-1	156
3.4.2.1. Plasmawerte von TNF α	156

3.4.2.2. Plasmawerte von IL-6 _____	158
3.4.3. Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 _____	159
3.4.3.1. Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 _____	159
3.5. LPS-Stimulation _____	165
3.5.1. Telemetrische Ergebnisse _____	165
3.5.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer LPS- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten. _____	165
3.5.1.2. Aktivitätsänderung nach intraperitonealer LPS- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten. _____	168
3.5.1.3. Futteraufnahme nach intraperitonealer LPS-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten. _____	171
3.5.1.4. Wasseraufnahme nach intraperitonealer LPS- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten. _____	174
3.5.1.5. Gewichtsveränderung nach intraperitonealer LPS- Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten. _____	177
3.5.2. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF α und IL-6 nach intraperitonealer LPS-Stimulation _____	180
3.5.2.1. Plasmawerte von TNF α _____	180
3.5.2.2. Plasmawerte von IL-6 _____	182
3.5.3. Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach intraperitonealer Injektion von LPS _____	183
3.5.3.1. Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 _____	183
3.5.4. Zirkulierendes PGE2 bei WKY- und SH-Ratten nach intraperitonealer Stimulation mit FSL-1, MALP-2 oder LPS _____	188
IV. Diskussion _____	189
1. Die verwendeten Tiermodelle _____	43

1.1.	Die TLR2-ko-Maus _____	44
1.2.	Die CD36-defiziente spontan hypertensive Ratte _____	45
1.3.	Reaktivität der TLR2-ko-Mäuse gegenüber mykoplasmalen Lipopeptiden und LPS _____	189
1.4.	Reaktivität der CD36- defizienten SH-Ratten gegenüber mykoplasmalen Lipopetiden und LPS _____	191
1.5.	Schlussfolgerung und Ausblick _____	197
V.	<i>Zusammenfassung</i> _____	199
VI.	<i>Summary</i> _____	201
VII.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> _____	203
VIII.	<i>Literaturverzeichnis</i> _____	208
IX.	<i>Anhang</i> _____	234
1.	Publikationen _____	234
1.1.	Zitierbare Kongressmitteilungen: _____	234
1.2.	Originalarbeiten _____	235
2.	Danksagung _____	235
3.	Erklärung _____	236

I. Einleitung

1. Fieber als Komponente der Akute-Phase-Reaktion bei Infektions- und Entzündungsprozessen

Wie schon Liebermeister im Jahre 1871 feststellte, handelt es sich bei Fieber um eine regulierte Erhöhung der Körpertemperatur. Sie stellt sich aufgrund einer aktiven Anhebung des vorgegebenen Sollwertes (International Union of Physiological Sciences, 2001) im thermoregulatorischen Kontrollsystem der präoptischen Region des Hypothalamus ein. Die Temperaturerhöhung wird in warmer Umgebung durch Einsparung der Wärmeabgabe, in kalter Umgebung durch zusätzliche Wärmeproduktion entwickelt, bis der erhöhte Sollwert erreicht ist (Roth, 2006), und auf diesem Level gehalten. Körpereigene antipyretische Kontrollmechanismen führen anschließend wieder zu einer Herabregulierung der Körpertemperatur.

Im Gegensatz hierzu kann es auch zu einer passiven Temperaturerhöhung des Körpers kommen. Dabei handelt es sich um eine Hyperthermie, bei der die Kapazität der Wärmeabgabe im Vergleich zur Wärmegewinnung überschritten wird und somit die überschüssige Wärme nicht im ausreichenden Maße abgegeben werden kann. Der Temperaturanstieg im Rahmen einer Hyperthermie ist in diesem Fall das Resultat einer erhöhten metabolischen Wärmeproduktion, übermäßiger Hitzeabsorption, Schädigung der Wärmeabgabemechanismen oder wird im Falle einer malignen Hyperthermie durch Medikamente wie Halothan und Isofluran ausgelöst. Auch Drogen wie Ecstasy (Sprague *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2004) sind in der Lage eine Hyperthermie hervorzurufen. Während dieser Art der Temperaturerhöhung wird eine gesteigerte Durchblutung der Haut und vermehrtes Schwitzen festgestellt, Reaktionen, die bei Fieber zumindest in der Phase des Fieberanstiegs nicht auftreten.

Es ist bereits seit langem bekannt, dass Infektionen häufig mit Fieber einhergehen, weshalb Fieber als Kardinalsymptom einer Infektion gesehen wird. Es wird aber nicht ausschließlich durch Infektion mit Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen sowie anderen Erregern hervorgerufen, sondern entsteht auch bei Verletzungen, die durch Operationen, Traumata oder Chemikalien verursacht werden. Neben diesen sind auch endogene Prozesse zur Fieberinduktion befähigt. Hierzu gehören autoimmun-bedingte Erkrankungen wie

rheumatoides Fieber oder aber Tumoren. Was haben all diese Ursachen gemeinsam, dass sie in der Lage sind Fieber auszulösen?

Alle der oben angeführten Fieberinduktoren sind gleichzeitig auch in der Lage Entzündungen auszulösen. Bei Entzündungsvorgängen liegen Veränderungen wie Gewebsuntergang, Infektion oder immunologische Reaktionen in vaskularisiertem Gewebe vor. Ziel einer Entzündungsreaktion ist es, den ursprünglichen Auslöser zu zerstören oder zu inaktivieren und das zerstörte Gewebe abzubauen, so dass eine Abheilung möglich ist.

Viele der am Entzündungsherd vorkommenden Zelltypen sind in der Lage, lösliche Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und andere zu bilden. Als Folge kommt es zu Gefäßveränderungen wie Vasodilatation, Stase und erhöhter Permeabilität der Gefäßwände, die die ersten Entzündungszeichen wie Rötung (Rubor), vermehrte Wärme (Calor) und Schwellung (Tumor) hervorrufen. Durch die ausgeschütteten Mediatoren werden auch Nocirezeptoren aktiviert, so dass Schmerz (Dolor) wahrgenommen wird. Leukozyten haben durch den verlangsamten Blutfluß die Möglichkeit sich an den Rand der Gefäßwände anzulagern, und beeinflusst durch die chemotaktisch wirkenden Mediatoren des Entzündungsherdes per Diapedese in das betroffene Gebiet zu migrieren.

In einigen Fällen gelingt die Bekämpfung der Erreger und ihrer Bestandteile nicht und es kommt zu Invasion ins Blutgefäßsystem und somit zur Verteilung im Organismus. Es folgt eine Akute-Phase-Reaktion. Sie ist multifaktoriell und beinhaltet Veränderungen der Plasmakonzentrationen von Metallen, Leberproteinen sowie Hormonen, führt weiter zu Neutrophilie und Stoffwechseleränderungen und zieht das sogenannte „sickness behavior“ nach sich. Hierbei entstehen Fieber oder Hypothermie, Appetitverlust, Müdigkeit, Aktivitätsverlust und reduzierte Libido (Aubert, 1999; Dantzer, 2001; Johnson, 2002; Szelenyi & Szekely, 2004; Dantzer *et al.*, 2008). Bei der Akute-Phase-Reaktion handelt es sich um eine frühe, unspezifische Abwehrreaktion, die durch freigesetzte Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α , Interferon und andere getriggert und moduliert wird. Diese Immunmodulatoren treten in großer Zahl während Entzündungen, Verletzungen und autoimmun bedingten Veränderungen im Blut auf und stehen mit der Fieberentwicklung im Zusammenhang. Aus diesem Grund werden sie auch als endogene Pyrogene bezeichnet (Luheshi & Rothwell, 1996; Roth & De Souza, 2001; Conti *et al.*, 2004; Romanovsky *et al.*, 2005).

Fieber kann verschiedenste Muster aufweisen. Neben tagelang andauerndem Fieber mit nur leichten Temperaturschwankungen (Pneumonie, Typhoides Fieber, Malaria) kommt auch intermittierendes Fieber vor, welches große Temperaturschwankungen aufweist (Sepsis). Des weiteren tritt auch über mehrere Tage persistierendes, biphasisches Fieber (viele virale

Erkrankungen) auf, oder aber es sind wöchentliche Fieberperioden mit fieberfreien Phasen anzutreffen (Mackowiak *et al.*, 1997). Dem vielfältigen Erscheinungsbild des Fiebers sind kaum Grenzen gesetzt.

Die heute gültigen Fiebermechanismen sind fast ausschließlich durch die von experimentellem Fieber gewonnenen Resultate bekannt. Hierzu wurden exogene Pyrogene, wie zum Beispiel fieberinduzierende Produkte von Bakterien benutzt, die meist im Tierversuchsmodell verwendet und vereinzelt an menschlichen Probanden getestet wurden. Daraus resultiert gewöhnlicherweise eine generalisierte inflammatorische Immunantwort, welche auch schon als Akute-Phase-Reaktion angesprochen werden kann. Das am meisten verwendete exogene Pyrogen ist das in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommende Lipopolysaccharid (LPS), welches auch als Endotoxin bekannt ist. Abhängig von der Dosierung, der Verabreichungsart und der Umgebungstemperatur entwickelt sich ein stereotypes, reproduzierbares Fieber von 6-8 Stunden (Rummel *et al.*, 2004), das mehrere Phasen aufweist. Neben LPS gibt es noch viele weitere exogene Pyrogene verschiedenster Mikroorganismen, die eine deutliche Fieberantwort auslösen können. Neben diesen sind auch andere Stoffe unterschiedlichsten Ursprungs pyrogen wirksam. So können von Pflanzen stammende Lektine oder Alkaloide fieberauslösend sein. Des Weiteren bewirken synthetisch hergestellte Substanzen wie Polynukleotide und Immunadjuvanzen eine Fieberantwort. Körpereigene Stoffe wie zerstörtes Gewebe, Antigen-Antikörper-Komplexe, aktivierte Komplementfaktoren, Metabolite und vieles mehr wirken neben den typischen endogenen Pyrogenen, den Zytokinen, ebenfalls fieberinduzierend. Da die meisten der aufgeführten Substanzen nicht körpereigen sind, werden sie als exogene Pyrogene bezeichnet (Cooper, 1995).

Wie bereits schon 1948 von Beeson vermutet wurde (Beeson, 1948), führen exogene Pyrogene im Körper nicht zur direkten Fieberentwicklung, sondern sorgen dort für eine Bildung so genannter „endogener Pyrogene“. Beeson gewann eine Substanz aus isolierten Peritonealmakrophagen, welche in der Lage war, bei nicht infizierten Kaninchen nach Injektion Fieber auszulösen. Es handelte sich um einen hitzelabilen Stoff, was zu der Vermutung führte, dass es sich um ein Protein handeln musste. Eine spätere Studie zeigte, dass nach Injektion eines exogenen Pyrogens wie LPS endogene Pyrogene in der Zirkulation auftraten (Cooper, 1995).

Dank intensiver Forschung, welche sich mit der molekularen Identifikation und dem Klonen der vermeintlichen endogenen Pyrogene beschäftigte, identifizierte man Wachstumsfaktoren, welche zur Familie der Zytokine gehören, die für die Fieberentwicklung

verantwortlich zu sein scheinen. Die genauere Beschreibung der Zytokine erfolgt in Kapitel 3.3.

2. Fieber als Reaktion des Organismus auf Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen

Wie beschrieben geht man davon aus, dass exogene Pyrogene wie LPS im Körper zur Freisetzung endogener Pyrogene führen, die für die Fieberentwicklung verantwortlich sind. Für die Erkennung der exogenen Pyrogene und der anschließenden Freisetzung endogener Pyrogene sind hauptsächlich Zellen des angeborenen Immunsystems verantwortlich (Arancibia *et al.*, 2007). Hierzu gehören neutrophile Granulozyten, Monozyten sowie Makrophagen, die die erste Abwehr gegen eine Vielzahl von Pathogenen darstellen. Pathogene weisen spezifische Strukturen auf, die sowohl intern wie auch extern auftreten können und als „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden. Hierbei handelt es sich um sehr beständige Strukturen der Pathogene, die für die Physiologie und das Überleben der Erreger essentiell sind. Sie werden daher immer ausgebildet, sind in gewisser Weise für diese Pathogenklasse spezifisch und kommen nicht im Wirtsorganismus vor (Schnare *et al.*, 2006). Diese Attribute machen die schnelle Erkennung der sogenannten PAMPs durch das angeborene Immunsystems so bedeutsam, da es eine frühzeitige Abwehr des Körpers erlaubt, ohne auf das deutlich verzögert agierende erworbene Abwehrsystem warten zu müssen; näheres hierzu wird aber in Kapitel 3 beschrieben. Zu den PAMPs gehören LPS aus der Wand gramnegativer Bakterien, diacylierte Lipopeptide wie z.B. das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1) und das Makrophagen-stimulierende Lipopeptid-2 (MALP-2), die jeweils von zellwandlosen Mycoplasmenarten stammen, das Muramyldipeptid aus Zellwandbestandteilen grampositiver Bakterien oder aber Poly I:C aus viraler Doppelstrang-RNA und viele andere mehr.

2.1. LPS

Das Lipopolysaccharid ist eines der am häufigsten verwendeten und am besten erforschten exogene Pyrogene. Es handelt sich hierbei um einen charakteristischen Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, der in Grampositiven nicht zu finden ist. Die Zellwand besteht aus der äußeren Kapsel, einer äußeren Membran, dem Mureingerüst, einem periplasmatischen Raum und einer inneren Membran. LPS steht nicht im direkten Kontakt mit der Umgebung, da die Kapsel das in der äußeren Membran verankerte LPS abschirmt

(Roberts, 1996). In der Zellwand inkorporiert hat LPS keine toxischen Wirkungen. Diese treten erst nach Freisetzung durch Vermehrung, Tod oder Lyse des Bakteriums in Kraft (Rietschel *et al.*, 1994; Hellman *et al.*, 2000).

LPS-Moleküle unterteilen sich in vier unterschiedliche Bestandteile (Raetz, 1990; Rietschel *et al.*, 1994). Der wichtigste Anteil ist das Lipid A, welches die toxische Komponente des LPS ausmacht (Kotani *et al.*, 1985). Es besteht aus sechs oder mehr Fettsäurekettenbestandteilen, die mit zwei phosphorylierten Glycosaminzuckern verbunden sind. Neben dem Lipid A gibt es noch einen Polysaccharidanteil mit innerer und äußerer Kernregion und eine O-spezifische Seitenkette, die hoch immunogen wirkt.

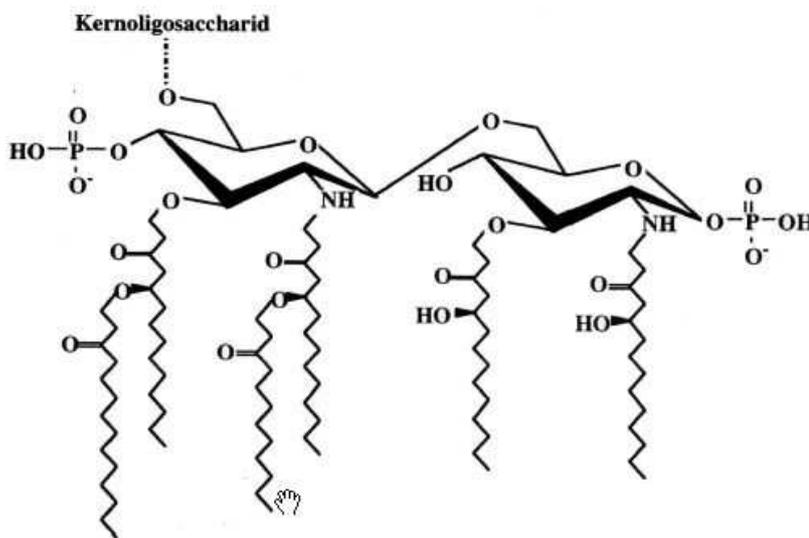


Abbildung 1: Lipid A-Bestandteil des LPS

2.2. MALP-2

Das Makrophagen-aktivierende Lipopeptid-2 entstammt dem zellwandlosen *Mycoplasma fermentans* und hat ein Molekulargewicht von 2 kDa.

Mykoplasmen sind die kleinsten Prokaryonten, die zur Autoreplikation fähig sind, keine Zellwand besitzen und somit ein pleomorphes Erscheinungsbild haben. Sie sind an vielerlei Erkrankungen bei Mensch und Tier beteiligt. So findet man sie häufig bei Entzündungen des Urogenitaltraktes, der Lunge sowie der Gelenke. Taxonomisch gehören sie zu den Mollicutes, also den Weichhäutern, und sind phylogenetisch mit den gramnegativen Bakterien verwandt. Ihre Vermehrung erfolgt nach Replikation des Genoms durch Zweiteilung. Statt einer Zellwand besitzen sie eine cholesterinhaltige Zytoplasmamembran als äußere Begrenzung. Dieser Eigenschaft verdanken sie die Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika wie z.B. den

β -Laktamen, deren Wirkmechanismus auf der Hemmung der Mureingerüstsynthese beruht. Des weiteren führt dies zu einer großen Vielfalt in ihrem Erscheinungsbild, ihrer Pleomorphie.

Mycoplasma fermentans wird häufig im Urogenitaltrakt erkrankter wie auch nicht erkrankter Personen nachgewiesen (Ruiter & Wentholt, 1953; Mardh & Westrom, 1970). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Infektion mit *M. fermentans* und einer daraus resultierenden Erkrankung wurde bisher nicht nachgewiesen. Einzig bei rheumatoiden Arthritiden vermutet man eine pathogene Beteiligung, da bei 21 % der betroffenen *M. fermentans* mittels PCR nachgewiesen werden konnte (Schaeffer *et al.*, 1996; Taylor-Robinson & Schaeffer, 1996). Auch bei anderen Formen der Arthritis, wie der Spondylarthritis, tritt es auf. Des weiteren wird vermutet, dass *M. fermentans* bei AIDS-Erkrankten eine Rolle spielt (Blanchard & Montagnier, 1994). Bei HIV-Betroffenen konnte im Blut (Lemaitre *et al.*, 1992) wie auch im Urin (Chirgwin *et al.*, 1993) ein Nachweis des Mykoplasma *fermentans* erfolgen. In vitro Untersuchungen brachten hervor, dass der zytopathische Effekt des HI-Virus gegenüber lymphoblastoiden und promonozytischen Zellen nur in Verknüpfung mit einer *M. fermentans*-Kontamination beobachtet werden konnte (Lemaitre *et al.*, 1992).

Mykoplasmen treten häufig als Störfaktor bei der Haltung von Zellkulturen auf, was zur Entdeckung von MALP-2 führte. Man isolierte diese Substanz aus dem Kulturüberstand einer *M. fermentans*-infizierten myeloischen Zelllinie. Der Überstand löste in murinen Makrophagen und humanen Monozyten eine IL-6-Produktion aus (Quentmeier *et al.*, 1990). Anfangs wurde ein neuartiges Zytokin für die IL-6-Produktion verantwortlich gemacht, so dass es noch Jahre dauerte, bis deutlich wurde, dass Mykoplasmen als Auslöser agierten. Die Substanz bezeichnete man zu Anfang als Mycoplasma-derived high-molecular-weight material (MDHM). Erste Isolationsversuche enthielten noch starke Verunreinigungen wie Membranfragmente und Vesikelbestandteile, so dass man von einem hohen Molekulargewicht ausging. Nach der Entwicklung hoch produktiver *M. fermentans*-Klone und der Integration mehrerer Reinigungsschritte mittels Detergenzextraktion, enzymatischer Verdauung und anschließender High Performance Liquid Chromatographie, konnte sichergestellt werden, dass das für die Zytokininduktion verantwortliche Molekül über ein Molekulargewicht von nur 2 kDa verfügt. Dieses Molekül vermag neben der IL-6-Induktion in vitro (Quentmeier *et al.*, 1990) wie in vivo die Freisetzung weiterer Zytokine durch Makrophagenaktivierung wie IL-1, TNF- α sowie die von Prostaglandinen (Muhlradt & Schade, 1991) und Stickstoffmonoxid (Ruschmeyer *et al.*, 1993) zu veranlassen, was zu

seiner Namensgebung führte. Erst 1997 konnte die Struktur des Aktivators isoliert und aufgeklärt werden (Muhlradt *et al.*, 1997). Neben der Ausschüttung der Immunmodulatoren kommt es auch zur Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wie CD40, CD80, CD83 und CD86, die als kostimulatorische Moleküle zur Zell-Zell-Interaktion von Immunzellen beitragen. Es ist bekannt, dass die zelluläre Aktivität dieses PAMP über die Toll-like Rezeptoren 2 und 6 vermittelt wird, die als Heterodimer agieren. Neben den Toll-like Rezeptoren scheint auch das Oberflächenmolekül CD36 eine Rolle bei der Erkennung des PAMPs zu spielen (Hoebe *et al.*, 2005).

MALP-2 stellt neben LPS ein wirksames exogenes Pyrogen dar. Seine Wirkstärke fällt im Vergleich zu LPS allerdings geringer aus, da man zumindest bei Mäusen eine wesentlich höhere Dosierung einsetzen muss, um gleiche Resultate zu erlangen (Deiters *et al.*, 2004). Bei Ratten hingegen sind LPS und MALP-2 in vergleichbarer Dosierung wirksam (Hubschle *et al.*, 2006; Knorr *et al.*, 2008).

Vom Aufbau her handelt es sich bei MALP-2 um das membrangebundene Lipopeptid, S-[2,3-bispalmitoyloxypropyl]cysteinyl-GNNDENISFKEK-, auch PAM₂CGNNDENISFKEK genannt, welches synthetisch hergestellt werden kann (Muhlradt *et al.*, 1997).

Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2 (MALP-2)

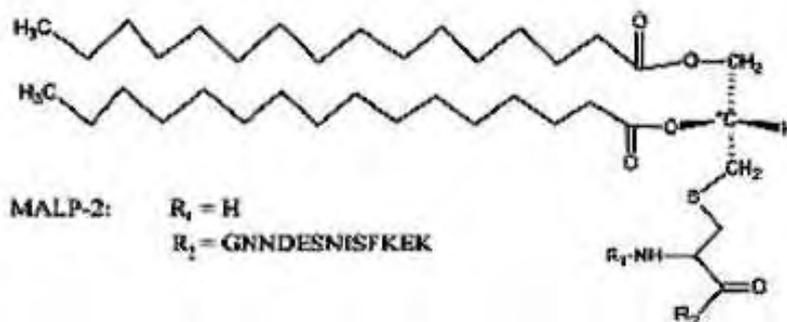


Abbildung 2: die Struktur von MALP-2

Strukturell unterscheidet sich das synthetisch hergestellte MALP in zwei Punkten vom nativ vorkommenden. Es enthält keine ungesättigten Fettsäuren und kann in unterschiedlichen

stereoisomeren Konfigurationen vorliegen. Diese Stereoisomerie hat großen Einfluss auf die Wirkstärke des MALP-2. Die auch natürlich vorkommende R-Variante wirkt bis zu 300 Mal stärker aktivierend auf Makrophagen, als das S-MALP-2. Der freie N-Terminus stellt die Grundlage der Makrophagen-stimulierenden Aktivität dar, wohingegen der Peptidanteil keinen Einfluss zu nehmen scheint (Muhlradt *et al.*, 1997).

Neben dem Einsatz als Pyrogen hat das Lipopeptid noch eine Reihe weiterer Wirkungen. Da es ein potenter Stimulator des Immunsystems ist und die Zell-Zell-Interaktion fördert, könnte es als Adjuvans bei Impfstoffen verwendet werden, um deren Wirksamkeit zu verbessern und zu beschleunigen. Studien an Mäusen zeigten, dass MALP die mukosale Abwehr gegen einige Antigene verstärkte und sich aus diesem Grund als Adjuvans für nasal applizierbare Impfstoffe eignet (Rharbaoui F, 2002; Borsutzky S, 2003).

Eine weitere auf die Immunsystem-Stimulation aufbauende Verwendung liegt in der Tumorbekämpfung. Eine optimale Tumorbehandlung könnte erzielt werden, wenn es möglich wäre, das eigene Immunsystem mit der spezifischen Zerstörung entarteter Zellen zu beauftragen und so das gesunde Gewebe verschont bliebe. Versuche an Mäusen mit Pankreastumoren zeigten, dass die tumornahe Injektion von MALP die durchschnittliche Überlebenszeit der betroffenen Mäuse signifikant verlängerte (Schneider *et al.*, 2004). Es gibt auch erste Hinweise, dass die Metastasenbildung nach MALP-Applikation verringert ist (Shingu *et al.*, 2003). Erste klinische Studien, die an der Heidelberger Universität durchgeführt wurden, zeigen, dass auch bei menschlichen Patienten mit Pankreastumoren die Überlebenszeit verlängert werden konnte. Den an einem inoperablen Pankreastumor leidenden Patienten wurde intraoperativ MALP in den Resttumor injiziert. Die Überlebensrate stieg mit nachfolgender Chemotherapie im Vergleich zu den Patienten, die postoperativ mit dem selben Chemotherapeutikum behandelt wurden, ohne MALP injiziert bekommen zu haben, deutlich an (Schmidt *et al.*, 2007).

Auch bei Wundheilungsproblemen kann MALP-2 unterstützend eingesetzt werden. Normalerweise heilen Wunden ohne größere Beschwerden. Es gibt allerdings Patientengruppen, bei denen die Wundheilung gestört ist. Hierzu gehören Diabetiker oder Patienten, die unter venösen Ulzera leiden. Als Tiermodell verwendete man übergewichtige, an Diabetes leidende Mäuse mit schlecht heilenden Wunden. Eine MALP-Behandlung führte zu beschleunigtem Wundschluss, indem die entzündliche Phase der Wundheilung verschlimmert wurde. Die vermehrte Freisetzung von Chemokinen durch Fibroblasten und Keratinozyten führte zur gesteigerten Einwanderung von Makrophagen und anderen Leukozyten ins Entzündungsgebiet. Diese wurden, dort angekommen, ebenfalls durch

MALP-2 zur vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren stimuliert, was für eine optimale Wundheilung sorgte (Deiters *et al.*, 2004). Die klinische Erprobung am Menschen steht nun bevor.

2.3. FSL-1

Wie MALP-2 entstammt auch das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 aus Mykoplasmen, in diesem Fall aus *Mycoplasma salivarium*. Der Erreger kommt häufig als Kommensale in der Mundflora von Gesunden, aber auch bei an Peridontitis, Osteitis oder Phlegmonen erkrankten Personen vor. Anfangs wurde ein Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 44 kDa gefunden (LP44), was die Fähigkeit hat, in monozytären Zelllinien die Freisetzung von TNF- α , sowie bei Fibroblasten die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) sowie die MCP-1-, IL-8- und IL-6-Produktion zu induzieren (Shibata *et al.*, 2000). Auf diesem LP44 basierend wurde das N-terminale Lipopeptid FSL synthetisch hergestellt. Es zeigt sich strukturell als S-(2,3-bispalmitoyloxypropyl)-cystein-GDPKHPKSF, auch Pam₂CGDPKHPKSF genannt, und weist, wie das natürlich vorkommende Lipopeptid, die Fähigkeit auf, die Expression von ICAM-1 wie auch die Freisetzung von Zytokinen zu induzieren. Damit scheint dieser Teil des LP44 die Schlüsselrolle bei der Aktivierung von Immunzellen zu übernehmen. Verschiedene Versuche zeigten, dass drei Dinge für die Wirkung des FSL entscheidend sind. Zum einen sind die beiden Fettsäurereste wie auch der Peptidanteil für die Wirkung essentiell, da ein Fehlen oder eine Änderung eines Anteils zu einer Verminderung der Wirksamkeit führt (Okusawa *et al.*, 2004). Modifiziert man die Aminosäurefrequenz, indem man eine hydrophobe Phenyl-Aminosäure (FSL-1) gegen eine hydrophile Arginin-Aminosäure (FSL-2) tauscht, resultiert daraus ein deutlicher Abfall der Zytokinbildung. MALP-2 und FSL-1 unterscheiden sich nur aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und zeigen bei in vitro Versuchen unterschiedliche Wirkstärke, FSL führt zu einem deutlicheren Anstieg der induzierten Zytokine. Reduziert man versuchsweise den Aminosäurerest auf nur eine Aminosäure, verschwindet die Aktivität der Lipopeptide gänzlich. Neben dem Peptidanteil sind auch Fettsäurereste von entscheidender Bedeutung. Tauscht man die vorkommenden Palmitinreste (FSL-1) gegen Stearinreste (FSL-3), kommt es zu einer reduzierten Aktivität. Des weiteren führt eine zusätzliche Veresterung einer Palmitinsäure an den freien Stickstoffanteil von Lipopeptiden zu einer Reduzierung der Aktivität (Shibata *et al.*, 2000).

Seine Aktivität wird zellulär wie auch die von MALP-2 über die Toll-like Rezeptoren 2 und -6 vermittelt, die dann als Heterodimer vorliegen.

Fibroblasten-stimulierendes Lipopetid-1 (FSL-1)

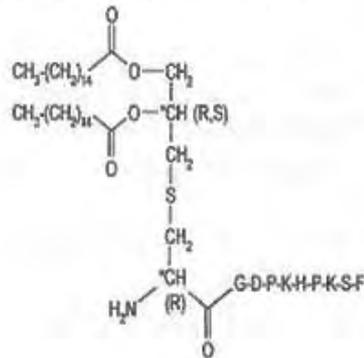


Abbildung 3: die Struktur von FSL-1

3. Bildung endogener Pyrogene nach Aktivierung von TLRs durch PAMPS

PAMPs werden im Körper durch spezifische Rezeptoren, die sogenannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), erkannt (Janeway & Medzhitov, 2002). Zu diesen gehören neben den NOD-like-Rezeptoren, welche als intrazelluläre mikrobielle Sensoren dienen (Strober *et al.*, 2006), Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie, die als Schlüsselrezeptoren für die Erkennung der PAMPs identifiziert wurden (Medzhitov *et al.*, 1997) und als Regulatoren des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems agieren. Der Name der Toll-like Rezeptoren stammt von den bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Toll-Rezeptoren (Lemaitre, 2004), die neben der dorsoventralen Musterbildung in der Embryonalentwicklung bei den Insekten unter anderem auch eine wichtige Funktion bei deren Immunabwehr spielen. Sie stimulieren hier die Produktion von antifungalen Peptiden und sorgen somit für eine gewisse Resistenz von *Drosophila* gegenüber Pilzinfektionen durch *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre *et al.*, 1996). Man vermutete, dass die homologen Rezeptoren der Säugetiere, die TLR, ähnliche Funktionen bei der angeborenen Immunabwehr übernehmen. Die funktionelle Charakterisierung der TLR erfolgte *in vitro* aufgrund ihrer unterschiedlichen Liganden. Der später als TLR4 benannte Rezeptor veranlasste nach Gabe von Lipopolysaccharid (LPS), welches gramnegativen Bakterien entstammt, die Induktion von Genen, die bei entzündlichen Immunantworten beteiligt sind (Medzhitov *et al.*, 1997).

Mäuse, die eine Punktmutation im TLR4-Gen aufwiesen, zeigten keinerlei entzündliche Reaktion auf die LPS-Gabe hin (Poltorak *et al.*, 1998). Dies verdeutlichte, dass der TLR4 für die Immunantwort verantwortlich sein muss. Die Erforschung der TLRs im Zusammenhang mit dem angeborenen Immunsystem nahm nun seinen Lauf, da anzunehmen war, dass weitere Rezeptoren, die ein anderes Ligandenspektrum als LPS aufweisen, vorliegen würden. Hierzu verwendete man Mäusestämme, bei denen eine Deletion der einzelnen TLRs vorlag, um deren Aufgabe genauer charakterisieren zu können.

Inzwischen sind 13 TLRs (Tabelle 1), davon 11 beim Menschen, bekannt, die die unterschiedlichen PAMPs spezifisch binden (Akira, 2006; Kielian, 2006; Schnare *et al.*, 2006; Uematsu & Akira, 2006). Das am meisten erforschte exogene Pyrogen LPS wird, wie schon erwähnt, vom TLR 4 (Poltorak *et al.*, 1998; Hajishengallis *et al.*, 2002; Takeda & Akira, 2005; Kielian, 2006; Schnare *et al.*, 2006) erkannt, wohingegen beispielsweise FSL-1 sowie MALP-2 mit dem Heterodimer aus TLR2/6 reagieren (Schnare *et al.*, 2006). Es scheint so, dass die Aktivierung der TLRs zur Freisetzung gleichartiger Zytokine führt, die eine Fieberantwort auslösen (Conti *et al.*, 2004; Dinarello, 2004). Sie kommen im Epithel des Gastrointestinaltraktes (Hornef *et al.*, 2003), der Bronchien (Muir *et al.*, 2004) und des Urogenitaltraktes (Zhang *et al.*, 2004), im Endothelium und an Zellen der Blut-Hirn-Schranke des Gehirns, sowie auf Zellen des Immunsystems wie den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, den natürlichen Killerzellen, den Mastzellen, den B-Zellen und den Monozyten (Hopkins & Sriskandan, 2005) vor.

Tabelle 1: Vielfalt der PAMPs und ihre spezifische Erkennung durch Toll-like Rezeptoren

Liganden (PAMPs)	Toll-like Rezeptoren
Tri-acylierte Lipopeptide	TLR1
Lipoproteine/-peptide (gram+), Zymosan	TLR2
Doppelsträngige RNA (virale & nicht virale), Poly I:C	TLR3
Lipopolysaccharid (gram -), Taxol (pflanzlich)	TLR4
Flagellin	TLR5
Di-acylierte Lipopeptide	TLR6
Einzelsträngige RNA (virale & nicht-virale)	TLR7

Einzelsträngige virale RNA	TLR8
Doppelsträngige DNA (CpG-reiche, virale & nicht virale)	TLR9
?	TLR10
Ligand aus Bakterien des Urogenitaltraktes	TLR11
CpG-reiche Oligodesoxynukleotide (Zytomegalievirus)	TLR12
CpG-reiche Oligodesoxynukleotide (Zytomegalievirus)	TLR13

Bei Toll-like-Rezeptoren handelt es sich um einen Typ1-Transmembran- Rezeptor, der in seinem Aufbau durch einen extrazellulären Amino-Terminus der „leucin-rich repeat domain“ (LRR) und einem intrazellulären carboxyterminalen Anteil, welcher die Toll/IL-1(TIR)Domäne beinhaltet, charakterisiert ist. Die LRRs sind in die Ligandenerkennung, in die Signaltransduktion sowie in die Dimerisation der TLRs involviert (Kobe & Deisenhofer, 1995). Sie sind von der transmembranären Region durch eine LRR carboxy-terminale Domäne separiert. Der TIR-Domänenanteil ist für die intrazelluläre Signalweiterleitung verantwortlich und besteht aus ca. 200 Aminosäuren, welche bei den einzelnen TLRs variieren. Er wird selbst nochmals in drei weitere Regionen unterteilt. Er weist eine große Homologie mit dem intrazellulärem Anteil des IL-1-Rezeptor auf (Takeda & Akira, 2003), was darauf schließen lässt, dass er die selbe Signalkaskade auslösen kann.

Die TIR-Domain rekrutiert nach ihrer Aktivierung im weiteren Verlauf Adapterproteine, wie etwa den „myeloid differentiation factor 88“ (MyD88), das TIRAP/MAL (TIR-domain-containing adaptor protein/MyD88 adaptor like), das TRIF (TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- β) oder das TRAM (TRIF-related adaptor molecule) (**Abbildung 4**). Der von den meisten TLRs induzierte MyD88-abhängige Signalweg verläuft weiter über die Rekrutierung der „IL-R-associated kinase“ (IRAK) 1 und 4 und deren Phosphorylierung, was dann die Assoziierung dieser mit dem „tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF) Adapterprotein 6 (TRAF6) nach sich zieht. TRAF6 aktiviert die TAK1 (transforming growth factor- β -activating kinase), die weitere Kinasen phosphoryliert und schlussendlich zur Freisetzung des Aktivator-Proteins 1 (AP1) sowie zur Freisetzung und zur nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B (**Abbildung 4**)

führt. Er ist für die Expression vieler für die Immunabwehr wichtigen Gene, wie z.B. die von inflammatorischen Zytokinen, verantwortlich (Uematsu & Akira, 2006).

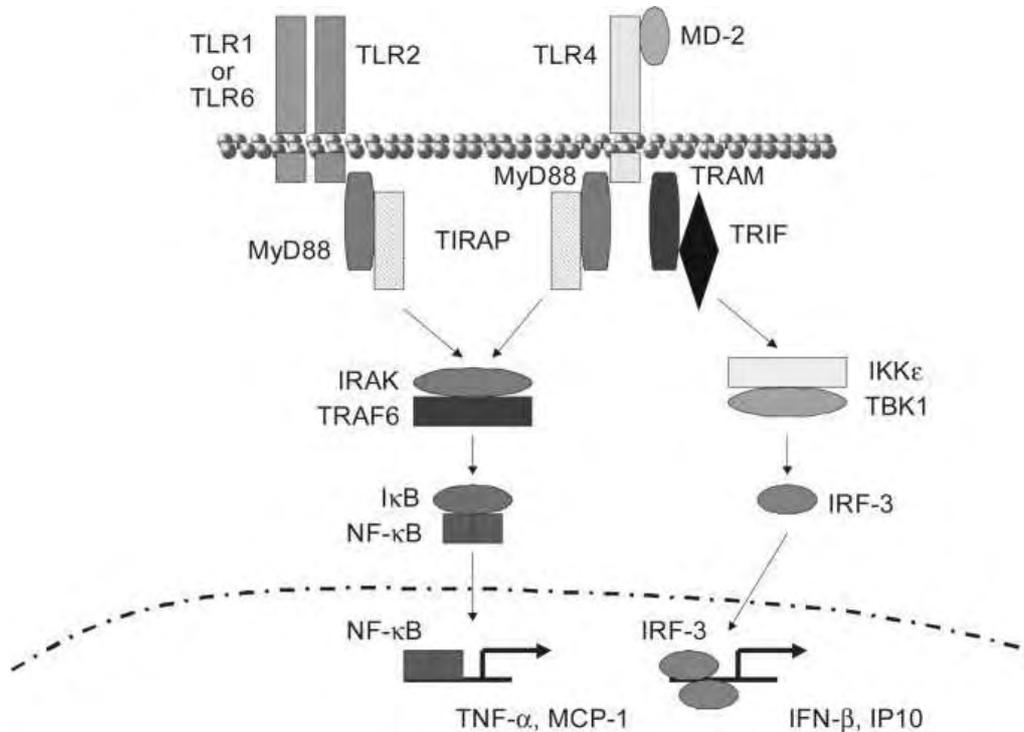


Abbildung 4: Signalweg der TLR2/6- Aktivierung (Kielian, 2006): Nach Bindung des TLR-Liganden kommt es zur Interaktion des Adaptermoleküls MyD88 mit dem TIR- Domain-Adaptermolekül (TIRAP). Im Anschluss daran werden die IL-1- Rezeptor- assoziierte Kinase (IRAK) und der Tumor – Nekrose-Faktor- assoziierte Faktor 6 (TRAF6) rekrutiert, so dass Inhibitory-κB (IκB) phosphoryliert werden kann. Dieses wirkt über einen weiteren Zwischenschritt auf den Nuclear Factor-κB (NF-κB), welcher die Transkription seiner Zielgene, z. B. TNF oder MCP-1, bewirkt. In der Graphik rechts eingezeichnet ist weiterhin der alternative Signalweg des LPS- Rezeptors TLR4, der letztendlich zur Expression von Interferon β (IFNβ) und IFN- inducible Protein of 10 kDa (IP-10) führt.

Neben dem schnellen MyD88-abhängigen Signalweg existiert auch ein langsamerer, alternativer, MyD88-unabhängige Signalweg. Dieser wird zum einen bei TLR3 (Alexopoulou *et al.*, 2001), aber auch neben dem MyD88-abhängigen Weg bei TLR4 (Kawai & Akira, 2005) verwendet. Bei dieser Signalübertragung tritt anstatt des MyD88 das Adaptermolekül TRAM auf, das über die Aktivierung weiterer Kinasen zur Expression von Interferon-induzierenden Genen führt (Abbildung 4, rechts).

3.1. TLR 2/6 => MALP-2, FSL-1

Der Toll-like-Rezeptor 2 ist in der Lage, ein großes Spektrum mikrobieller Bestandteile zu erkennen. Zu diesem Spektrum gehören Lipopeptide und Lipoproteine verschiedener Erreger, Peptidoglykane und Lipoteichoid-Säure grampositiver Bakterien, Glykosylphosphatidylinositol-Anker von *Trypanosoma cruzii*, Glykolipide von *Trypanosoma maltophilum*, sowie das Phenol-lösliche Modulin von *Staphylococcus epidermis* (Takeda *et al.*, 2003). Diese breitgefächerte Erkennungskapazität erhält er unter anderem durch seine Bildung von Heterodimeren mit weiteren TLRs wie dem TLR1 oder TLR6. Das Heterodimer TLR2/1 erkennt triacylierte Lipoproteine, wohingegen das Heterodimer TLR2/6 auf diacylierte Lipopeptide und Zymosan (einem Bestandteil der Zellwand von Pilzen) reagiert. Diese Vermutungen wurden mit Hilfe von knock-out-Versuchen untermauert. Makrophagen TLR6-defizienter Mäuse zeigten keinerlei inflammatorische Zytokinproduktion nach Stimulation mit mykoplasmalem diacylierten Lipopeptiden. Die Zytokinantwort auf triacylierte Lipopeptide gramnegativer Bakterien fiel hingegen normal aus (Takeuchi *et al.*, 2001). Im Gegensatz hierzu zeigten Makrophagen TLR1-defizienter Mäuse eine normale Antwort auf die Aktivierung durch mykoplasmale diacylierte Lipopeptide, während die Antwort auf triacylierte Lipopeptide beeinträchtigt schien (Takeuchi O *et al.*, 2002). Neben der Heterodimer-Bildung kooperiert der TLR2 mit weiteren Proteinen und Rezeptoren wie z.B. dem Dectin-1, der der Lectin-Rezeptorfamilie angehört. Mit ihm zusammen wird β -Glycan, ein Zellwandbestandteil von Pilzen, erkannt und die inflammatorische Zytokinproduktion eingeleitet (Gantner *et al.*, 2003).

Zudem kooperiert das Heterodimer des TLR2 unter anderem auch mit dem CD14 und dem CD36 als Co-Rezeptor. Bei CD14(Cluster of differentiation) handelt es sich um einen „pattern recognition receptor“ (PRR), genauer betrachtet um ein Glycosylphosphatidyl Inositol (GPI)-verankertes Glycoprotein. Er kommt in löslicher sowie membrangebundener Form vor. Die membrangebundene Form ist mit an der Aktivierung des TLR4 (Fitzgerald *et al.*, 2004) sowie der Heterodimere des TLR2 (Kielian *et al.*, 2002) beteiligt und wird auf myeloiden Zellen des Immunsystems exprimiert (Nadeau & Rivest, 2000; Kielian *et al.*, 2005a). Dort kommt er gehäuft in sogenannten „lipid rafts“ vor (Triantafyllou *et al.*, 2002), die bei CD36 genauer erläutert werden. Die lösliche Form des Rezeptors kann im Fall einer LPS-Stimulation CD14-freie Zellen bzw. deren TLR4 aktivieren (Esen & Kielian, 2005). Des Weiteren ist er in der Lage beispielsweise LPS zu binden und zu den membrangebundenen CD14 zu transportieren, um es dort dem CD14/MD2-Komplex zu präsentieren (Wright *et al.*, 1990; Blondin *et al.*, 1997).

Bei CD36 handelt es sich um ein Oberflächenglykoprotein, welches auf einer Vielzahl von Zellen wie Erythrozyten, Monozyten, Endothelzellen der Gefäße und Brustepithelzellen exprimiert ist (Gruarin *et al.*, 2000; Sarrias *et al.*, 2004). Bei Monozyten induziert es die Phagozytose von apoptotischen Zellen sowie die endozytotische Aufnahme von oxidierten LDL und Fettsäuren. Es ist ebenso in der Lage, native Lipoproteine wie HDL, LDL und VLDL zu binden. Bei den Thrombozyten agiert CD36 als Rezeptor für Kollagen und Thrombospondin-1, der nach Bindung des Liganden eine Inhibierung der Angiogenese und Zellmigration durch endotheliale Zellen veranlasst (Gruarin *et al.*, 2000; Sarrias *et al.*, 2004). Plasmodium falciparum befallene Erythrozyten werden von ihm erkannt (Greenwalt *et al.*, 1990). Bei den zur Phagozytose befähigten Zellen nimmt er wie CD14 den Platz als „pattern recognition receptor“ ein und ist in der Lage, diacylierte Lipoproteine zu binden.

Hoebe beschrieb 2005 den positiven Einfluss des CD36 auf die TLR2-Erkennung von diacylierten Lipopeptiden wie MALP-2 und LTA (Hoebe *et al.*, 2005). Er wies bei CD36-defizienten Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Staph. aureus nach, welches das diacylierte Lipopeptid LTA als PAMP enthält, das über das Heterodimer TLR2/6 erkannt wird. Des Weiteren konnte er bei Makrophagen CD36-defizienter Mäuse eine verminderte TNF-Produktion nach Stimulation mit MALP-2 und LTA nachweisen, wohingegen die Stimulation mit triacylierten Lipopeptiden sowie dem viralen PAMP Poly I:C zu vergleichbarer TNF-Produktion führte wie bei den Kontrollmäusen. Weitere Versuche mit naiven HEK-293-Zellen, denen neben TLR2 und dem NF- κ B-Rezeptorgen entweder TLR6 oder CD36 übertragen wurde zeigten, dass TLR6 und CD36 nach Stimulation mit MALP-2 oder LTA je zu einer stärkeren NF- κ B-Bildung führten, diese jedoch auch ohne die Substitution der beiden stattfinden konnte.

CD36 tritt konstitutiv in Zellmembranen in den sogenannten „lipid rafts“ auf (Triantafilou *et al.*, 2006). Hierunter versteht man in die Lipidmembran eingelagerte cholesterinhaltige Mikrodomänen, die Glykoproteine wie das CD36 oder auch Sphingolipide anreichern. Da sie in der zweidimensionalen Flüssigkeit der Lipidmembran schwimmen, wurden sie als rafts, also Flöße, bezeichnet. Kommt es nun zu Kontakt mit diacylierten Lipopeptiden wie FSL-1 oder LTA (Lipoteichoic acid), werden diese an CD36 gebunden, der daraufhin das bereits vorgebildete Heterodimer TLR2/6 in die „lipid rafts“ rekrutiert. Dort kommt es dann zur „Cluster-Bildung“ von CD36 und dem gebundenen PAMP mit dem TLR2/6-Heterodimer, so dass die bereits beschriebene MyD88-abhängige Signalkaskade (**Abbildung 4**) in Gang gesetzt wird. Unabhängig von der Signalkaskade kommt es des Weiteren zur Internalisation des

Clusters und zu dessen Transport zum Golgi-Apparat (**Abbildung 5**), dessen Bedeutung in diesem Zusammenhang aber noch unklar ist.

CD14 wie auch CD36 vereinfachen die Bindung der Liganden an die TLR2-Heterodimere, verstärken deren Antwort (Hoebe *et al.*, 2005; Lubick & Jutila, 2006) und veranlassen deren Internalisation, wobei CD36 nur bei dem Heterodimer von TLR2/6 eine Rolle zu spielen scheint. CD14 agiert mit beiden Formen der TLR2-Heterodimere (Nilsen *et al.*, 2008).

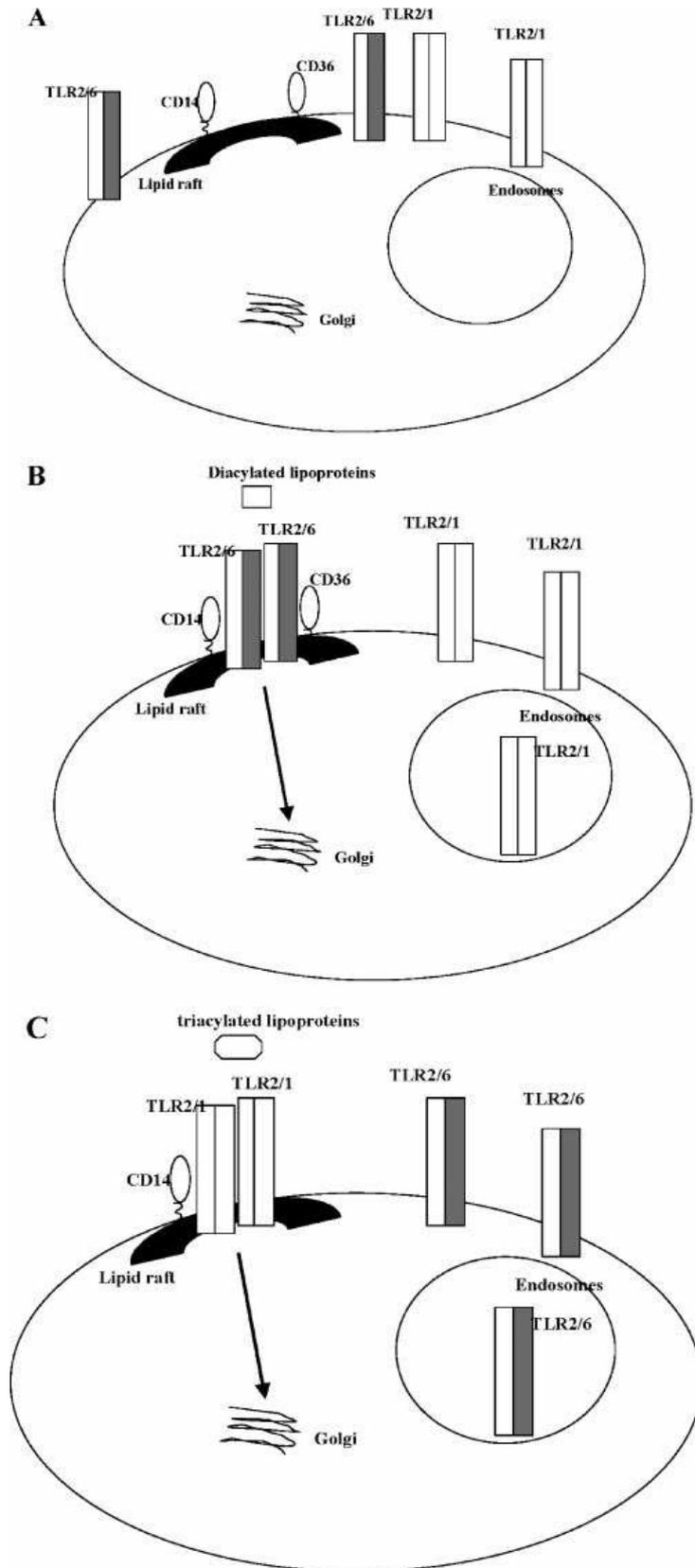


Abbildung 5: Rekrutierung der TLR2-Heterodimere in die „lipid rafts“ durch die durch diacylierte Lipopeptide aktivierten CD36 und CD14-Rezeptoren (Triantafidou *et al.*, 2006) und der anschließende Transport zum Golgi-Apparat.

3.2. TLR 4 => LPS

Der TLR4 ist der erste zu dem *Drosophilla* homologen Toll-Rezeptor beschriebene TLR (Medzhitov *et al.*, 1997) und ist für die Erkennung der gram-negativen Zellenwandkomponente LPS verantwortlich. Er kommt auf Zellen des mononucleären Phagozytensystems vor. Der Rezeptor stimuliert nach dessen Kontakt mit LPS Makrophagen zur Bildung von Zytokinen (Takeuchi *et al.*, 1999), die dann sofort mit der Bekämpfung der eingedrungenen Bakterien beginnen. Wie Poltorak 1998 herausfand, hatten Mäuse des C3H/HeJ-Stammes, die eine hyporesponsive Reaktion nach LPS-Gabe zeigten, eine Punktmutation auf dem TLR4-Gen, was zu einer funktionellen Inaktivierung des TLR4-abhängigen Signalweges führte. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass TLR4 für die Erkennung von LPS essentiell ist (Poltorak *et al.*, 1998).

Zwischenzeitlich ist die LPS-bedingte Aktivierung des TLR4 gut bekannt.

Neben TLR4 sind weitere Moleküle wie CD14 (ein Glycosylphosphatidyl Inositol (GPI)-verankertes Glycoprotein) und MD2 für die Rezeptor-Komplex-Bindung notwendig. Im Serum wird LPS an ein LPS-bindendes Protein gebunden, das es daraufhin zu CD14-Monomeren transferiert und dort konzentriert (Wright *et al.*, 1990). Nun ist es möglich, dass das an CD14 gebundene LPS an dem TLR4/MD2-Komplex bindet (Takeda *et al.*, 2003). Der Lipid A-Anteil des LPS, bei der es sich um die biologisch aktive Komponente handelt, bindet direkt an das gelöste MD2 -Molekül, das für die Erkennung und für die Signalweiterleitung von LPS essentiell ist (Shimazu *et al.*, 1999). MD2 formt daraufhin einen Rezeptorkomplex mit TLR4, der die aktive signal-transduzierende Komponente darstellt. Der weitere Signalweg ist in **Abbildung 4** dargestellt.

3.3. Zytokine

Unter Zytokinen versteht man vom Körper in kleinen Mengen kontinuierlich produzierte, lösliche Polypeptide und Glykoproteine mit einer Größe von 8-26 kDa, die zur interzellulären Kommunikation des neuroendokrinen Systems sowie des Immunsystems beitragen. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen produziert, hauptsächlich aber von Zellen des Immunsystems wie neutrophilen Granulozyten, aktivierten Monozyten und Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Astrozyten, Mastzellen. Es sind aber auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Synovialzellen, Ependymzellen des Gehirns und Neurone in der Lage Zytokine herzustellen. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Regulation und Koordination der Immunantwort zu übernehmen, so dass ihre Produktion z.B. bei einer

bakteriellen Infektion induziert wird, ihre Blutkonzentration in einem Zeitraum von 30-90 min von 10^{-15} M auf 10^{-7} M ansteigt und die Produktion weiterer Zytokine nach sich zieht. Dies wird auch als Zytokinkaskade bezeichnet (Conti *et al.*, 2004). Ihre Wirkweise unterscheidet sich zu der von Hormonen, denn sie wirken hauptsächlich para- und autokrin, können aber auch endokrine Wirkung zeigen und besitzen ein großes Wirkungsspektrum (Ambiguität) sowie zahlreiche Zielzellen. Teilweise überlappen sich die Wirkungen von einzelnen Zytokinen, was man auch als Redundanz bezeichnet. Ihre Wirkung wird über hoch affine, spezifische Rezeptoren, welche sich auf der Zelloberfläche befinden, vermittelt und über eine nachfolgende Signalkaskade ins Zellinnere weitergegeben.

Da Zytokine strukturell stark variieren, werden sie nach Funktion in drei Gruppen eingeteilt. Typ-1 Zytokine wie TNF, IL-1, IL-6 und IFN beeinflussen das angeborene Immunsystem wie beispielsweise die Granulozyten oder Makrophagen, indem sie chemotaktisch und aktivierend wirken und die Zellen zur Phagozytose animieren. Die Typ-2 Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-5 und IL-13 wirken auf das erworbene Immunsystem, wie die T- und B-Lymphozyten, und führen hier z.B. zur Bildung von Plasmazellen, zur Vermehrung der Zellen oder wirken aber hemmend. Typ-3 Zytokine wie CSF, IL-3 und IL-7 sind wiederum an der Haematopoese beteiligt. Einzelne Zytokine sind im Zusammenhang bei entzündlichen Reaktionen von besonderer Bedeutung und werden anschließend noch genauer behandelt.

Es spricht einiges dafür, dass LPS-induziertes Fieber durch Zytokine ausgelöst wird (Conti *et al.*, 2004). Erstens tritt eine Erhöhung der relevanten Zytokine im Blut nahezu zeitgleich mit der Entwicklung des Fiebers auf (Conti *et al.*, 2004). Nach der LPS-Verabreichung ist TNF- α (Roth *et al.*, 1993; Jansky *et al.*, 1995) das erste Zytokin, das im Blutstrom erscheint, gefolgt von IL-1 (Jansky *et al.*, 1995) und hohen Werten von IL-6 (Roth *et al.*, 1993). Von diesen drei, als Fieberauslöser nach LPS-Stimulation in Frage kommenden Zytokinen, ausgehend, kann nur IL-6 während des Fieverlaufs in ausreichend signifikanten Konzentrationen gemessen werden. Zudem zeigen die gemessenen IL-6-Konzentrationen die beste Korrelation mit der febrilen Temperaturveränderung des Körpers (LeMay *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1993).

Als weiteres Indiz, dass Zytokine als Fieberinduktoren wirken, gilt der Nachweis, dass die systemische Injektion oder Infusion einzelner proinflammatorischer Zytokine zur Fieberentwicklung führt, wie für IL-1 β (Anforth *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998b), TNF- α (Dinarello *et al.*, 1986; Goldbach *et al.*, 1996) und IL-6 (Blatteis *et al.*, 1990; Harre *et al.*, 2002) gezeigt wurde. Peripher verabreicht fallen die Fiebereffekte unterschiedlich aus. So ist die Temperaturerhöhung nach IL-6-Gabe moderater als bei IL-1 β oder TNF- α . In diesem

Zusammenhang wird noch kontrovers diskutiert, ob die Ergebnisse einer systemischen Zytokingabe mit den Vorgängen nach LPS-Verabreichung vergleichbar sind oder nicht.

Des Weiteren führt die Antagonisierung oder Neutralisierung der LPS-induzierten Zytokine zu einer deutlichen Reduktion des resultierenden Fiebers (Conti *et al.*, 2004). Es wurden IL-1 β -Rezeptorantagonisten (Luheshi *et al.*, 1996; Roth & De Souza, 2001), TNF- α -neutralisierende synthetisch hergestellte, lösliche TNF- α -Rezeptoren (Roth *et al.*, 1998a; Roth & De Souza, 2001) oder aber IL-6-neutralisierende IL-6-Antikörper (Cartmell *et al.*, 2000; Rummel *et al.*, 2006) verwendet, die jeweils eine signifikante Reduktion des LPS-induzierten Fiebers nach sich zogen. So konnte besonders die späte Fieberphase unterdrückt werden. TNF- α scheint hier allerdings speziesspezifisch unterschiedliche Auswirkungen zu haben (Kluger, 1991; Roth & De Souza, 2001).

Als weitere Untermauerung der Annahme, dass Zytokine als endogene Pyrogene fungieren, dienen Versuche, in denen zytokinefide KO-Mäuse Verwendung fanden (Conti *et al.*, 2004). Bei IL-1 β -KO-Mäusen ist LPS-Fieber reduziert, wenngleich nicht vollständig unterdrückt (Kozak *et al.*, 1995b; Kozak *et al.*, 1998). Die Versuchsdurchführenden schlossen hieraus, dass IL-1 β zum LPS-induzierten Fieber beiträgt, aber nicht zwingend notwendig ist. Im Gegenzug konnte festgestellt werden, dass IL-6 maßgeblich für die LPS-induzierte Fieberentwicklung verantwortlich ist, da IL-6-KO-Mäuse keinerlei Temperaturerhöhung nach LPS-Stimulation zeigten.

Nun werden die relevanten Zytokine nochmals ausführlicher behandelt.

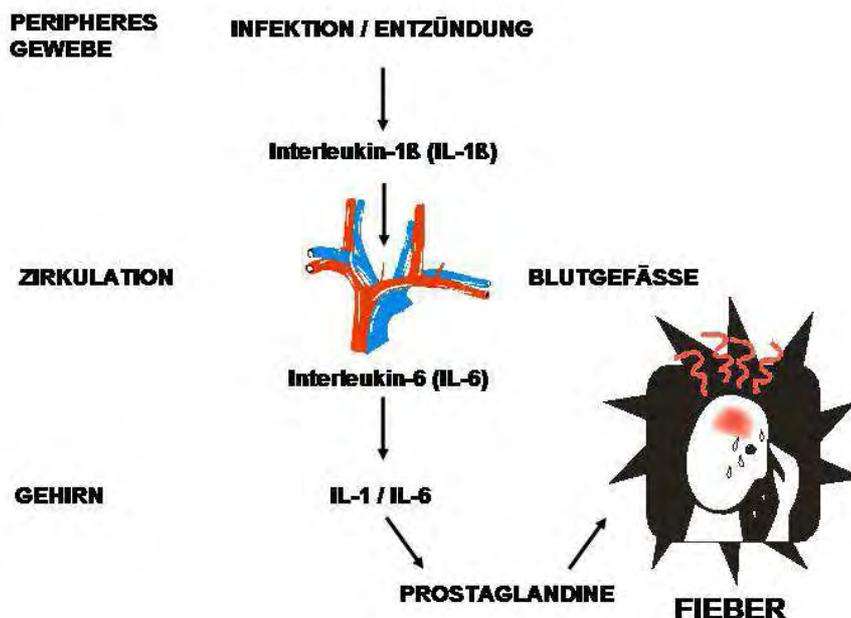


Abbildung 6: Schematische Darstellung der allgemeinen Hypothese der Fieberentstehung

3.3.1. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

Bei dem von Carswell benannten Tumornekrosefaktor- α handelt es sich um ein Zytokin, welches nach erfolgter bakterieller Infektion freigesetzt wird und neben seinen inflammatorischen Effekten auch eine hämorrhagische Nekrose von Hautsarkomen bei Mäusen bewirkt, was zu seiner Namensgebung führte (Carswell *et al.*, 1975). Er wurde vor seiner endgültigen Namensgebung aufgrund seiner Beteiligung an der Gewichtsabnahme bei infektiösem und tumorösem Geschehen auch als Cachectin bezeichnet (Beutler *et al.*, 1985). Bei Infektionen wird die Aufnahme der Triglyceride in die Adipozyten über die Deaktivierung eines Enzyms durch Cachectin verringert, so dass diese nicht aufgefüllt werden und somit eine Abnahme der Fettmasse resultiert.

Er ist einer der ersten Mediatoren einer akuten Entzündung, welche durch das LPS gramnegativer Bakterien (Kluger, 1991), durch Muramyl-dipeptid (MDP) grampositiver Bakterien (Roth *et al.*, 1997) oder aber durch die synthetische doppelsträngige RNA Poly I:C (Voss *et al.*, 2006) induziert und hauptsächlich von mononukleären Phagozyten freigesetzt wird. Auch Mastzellen, aktivierte T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen sind in der Lage, TNF- α zu produzieren und abzugeben. TNF wird zuerst als membrangebundenes Pro-Peptid (pro-TNF) mit einem Molekulargewicht von 26 kDa synthetisiert und im Anschluss daran durch eine membrangebundene Metalloproteinase, dem „tumor necrosis factor alpha converting enzyme“ (TACE), in eine Untereinheit von 17 kDa gespalten und freigesetzt. Die zuvor genannte TACE ist ebenfalls in der Lage, die Freisetzung von TNF-Rezeptoren von der Zelloberfläche zu katalysieren, welche als TNF-bindende Proteine fähig sind, die Wirkung des Zytokins wieder abzuschwächen (Bemelmans *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 1998a). Genauere Nachforschungen ergaben, dass eine ganze Superfamilie von 20 TNF-Protein-Homologen existiert, die an 29 verschiedenen Rezeptoren binden können. Die Rezeptoren, an denen die Homologe agieren, können in drei große Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe der Rezeptoren enthält im zytoplasmatischen Anteil die so genannte Death-Domain (DD), welche nach Aktivierung eine Kaskade in Gang setzt, die schließlich die Apoptose der Zelle initiiert. Die zweite Gruppe enthält im zytoplasmatischen Teil eine oder mehrere „TRAF-interacting motifs“ (TIM), welche nach dem Binden von TNF zur Rekrutierung von „TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren“ (TRAF) führt. Die dritte Gruppe der TNF-Rezeptoren enthält keinerlei funktionelle intrazelluläre Domänen oder „Motifs“ und kann somit keine intrazellulären Signale auslösen, steht aber durch ihre TNF-Bindungskapazität in Konkurrenz zu den anderen Rezeptorgruppen (Aggarwal, 2003) und wirkt durch die Verminderung der TNF-Konzentration herabregulierend.

TNF kommt bei der Initiierung der Zytokin-Kaskade, die bei einer infektionsbedingten Immunantwort aktiviert wird, eine zentrale Rolle zu. Während eines entzündlichen Prozesses ist es eines der ersten Zytokine, die in der Zirkulation auftreten, gefolgt von IL-1 β und IL-6 (Andersson *et al.*, 1992; Jansky *et al.*, 1995). Er besitzt die Fähigkeit, pyretische wie antipyretische Effekte auszulösen. Eine TNF-Injektion zieht die Entwicklung von Fieber nach sich, so dass seine pyrogene Wirkung außer Frage steht (Dinarello *et al.*, 1986). Dinarello konnte ebenfalls den direkten Nachweis erbringen, dass TNF die IL-1-Synthese induziert (Dinarello *et al.*, 1986). Sobald man TNF durch passive Immunisierung entfernt, kommt es auch zu einer Verringerung der IL-1 β - und IL-6-Werte und somit zur Reduktion der Fieberantwort (Cooper *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1998a). Behandelt man Ratten wiederum mit geringen, nicht pyrogen-wirkenden Dosen von TNF, zeigen die Tiere nach anschließender LPS-Stimulation eine reduzierte Fieberantwort. Die zusätzliche Gabe von löslichen TNF-Rezeptoren, auch TNF-binding protein (TNF-bp) genannt, führt wiederum zur Steigerung der fieberhaften Temperaturerhöhung (Klir *et al.*, 1995) und spricht für die antipyretische Wirkung des TNF. Synthetisch hergestelltes humanes TNFbp ist in der Lage, TNF von Menschen, Pavianen (Solorzano *et al.*, 1998), Ratten (Tollner *et al.*, 2000) und Meerschweinchen (Roth *et al.*, 1998a) zu neutralisieren. Die Gabe von TNFbp und LPS konnte beim Meerschweinchen deutlich die zweite Fieberphase abschwächen und den Plasmaspiegel an IL-6 absenken (Roth *et al.*, 1998a). Die durch LPS hervorgerufene Reduktion der Futter- und Wasseraufnahme konnte durch Neutralisation des TNFs bei Ratten deutlich abgeschwächt werden. Zudem konnten die Tiere eine Hypothermie schneller überwinden (Tollner *et al.*, 2000), obwohl das nachfolgende Fieber höher ausfiel. Des Weiteren verstärkt TNF und vermindert der lösliche TNF-Rezeptor die Hypothermie, die sich zu Anfang einer LPS-Stimulation in hoher Dosierung einstellt (Kozak *et al.*, 1995a). Nach Stimulation mit Muramyldipeptid (MDP) fällt die anfängliche Fieberantwort nach Behandlung mit TNF-bp höher aus (Roth *et al.*, 1998a). Dies weist darauf hin, dass TNF neben seiner pyretischen Aktivität auch einen antipyretischen Effekt erzielen kann. Diese antipyretische Wirkung rührt von der Aktivierung der corticotrophen Achse her, was zur Freisetzung von corticotropin-releasing Factor (CRF) aus dem Hypothalamus, somit zu Produktion von ACTH im Hypophysenvorderlappen und der anschließenden Cortisonbildung in der Nebennierenrinde führt (Nadeau & Rivest, 1999). Da Cortison ein starker Phospholipase A-Hemmer ist, kommt es zur verminderten Bildung von Prostaglandin, welches für die Fieberantwort verantwortlich ist.

3.3.2. Interleukin-1 β (IL-1 β)

Bei IL-1 handelt es sich um ein Peptid von 17 kDa, von dem die zwei Formen α und β existieren, und das früher auch unter dem Namen „leucocyte activating factor“ (LAF) bekannt war (Rothwell, 1991). Es existieren zwei verschiedene Rezeptortypen, an denen das hier relevante IL-1 β binden kann. Der Typ 1 Rezeptor (IL-1RI) gehört zur Familie der Toll-Rezeptoren (Dinarello & Savage, 1989) und stellt sich als Heterodimer dar. Der Komplex besteht aus einem IL-1-Protein bindenden Rezeptor (IL-1R) und einem akzessorischem IL-1R-Protein (IL-1RacP), welches für die Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich ist (Sims *et al.*, 1994). Schließlich kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor Kappa B (NF κ B), die zur Transkription der Zielgene führt. Der Typ 2 Rezeptor (IL-1RII) agiert als „Ködermolekül“, da es IL-1 β mit hoher Affinität bindet, ohne aber eine Signalkaskade auszulösen (Re *et al.*, 1996; Mantovani *et al.*, 2001).

Die Injektion von IL-1 β führt bei Nagern, Kaninchen und Menschen zur Fieberentwicklung und zur Bildung von IL-6, was deutlich zeigt, dass es als endogenes Pyrogen agiert. Dies wurde zusätzlich durch Versuche mit dem zu IL-1 in Konkurrenz stehenden „human recombinant interleukin-1 receptor antagonist“ (IL-1ra) untermauert. Hierbei handelt es sich um ein Mitglied der IL-1-Familie, welches den IL-1-Effekt am Typ 1 Rezeptor antagonisiert (Roth, 2006). Eine Vorbehandlung mit IL-1ra reduziert deutlich die durch LPS (Luheshi *et al.*, 1996; Roth & De Souza, 2001) oder andere Pyrogene (Fortier *et al.*, 2004) ausgelöste Fieberantwort, konnte diese allerdings nicht vollständig unterbinden. Des weiteren führte die Vorbehandlung mit IL-1ra zu einer verminderten IL-1-, TNF- und IL-6-Freisetzung im Hypothalamus sowie im Hippokampus (Laye *et al.*, 2000). Natürlicherweise wird IL-1ra vermehrt in den entzündlich veränderten Regionen produziert (Cartmell *et al.*, 2001), und seine Plasmakonzentrationen sind während der Akute-Phase-Reaktion durch LPS höher als die von IL-1 selbst (Fischer *et al.*, 1992; Dinarello, 1996).

Zur genaueren Untersuchung der Wirkung von IL-1 und dessen Rezeptoren wurden auch Versuche mit knockout-Mäusen herangezogen. Verwendete man IL-1-KO-Mäuse, konnte eine durch LPS ausgelöste Fieberantwort nur abgeschwächt, jedoch nicht unterdrückt werden (Kozak *et al.*, 1995b; Kozak *et al.*, 1998). Dies weist darauf hin, dass IL-1 an der durch LPS ausgelösten Fieberantwort beteiligt, aber für diese nicht essentiell ist. IL-1R- (Labow *et al.*, 1997) und IL-1RacP-KO-Mäuse (Cullinan *et al.*, 1998) zeigten keinerlei IL-1-induziertes Fieber.

Eine Gabe von IL-1 β -Antikörpern in den Hypothalamus (Gourine *et al.*, 1998) oder ein Vorbehandlung mit Cyclooxygenase-Hemmern (Li *et al.*, 2001) unterband ebenfalls IL-1 β -induziertes Fieber.

Es wurde nachgewiesen, dass IL-1 die Expression von EP3-Rezeptoren, die Prostaglandin-E2 binden, reguliert und somit dessen Wirkung steigert (Ushikubi *et al.*, 1998). Des weiteren ist IL-1 in der Lage die Bildung und Freisetzung von anderen Pyrogenen (IL-6) (Luheshi *et al.*, 1996) oder aber antipyretisch wirkenden Interleukinen (IL-10) (Foey *et al.*, 1998) aus Makrophagen, Endothelzellen und Mikroglia in Gang zu setzen und so die Fieberentwicklung zu beeinflussen.

Neben der Induktion weiterer endogener Pyrogene besitzt IL-1 β viele biologische Funktionen. Es vermittelt unter anderem die Anorexie, den Gewichtsverlust und die eingeschränkte soziale Aktivität beim sogenannten „sickness behavior“ während der Akute-Phase-Reaktion. Bei Versuchen mit C3H/HeJ-Mäuse, die eine Mutation des TLR-4-Gens zeigen (Hoshino *et al.*, 1999), konnten nach Stimulation mit LPS keinerlei Krankheitsanzeichen festgestellt werden. Nach Injektionen von rekombinantem IL-1 β hingegen reagierten sie vergleichbar mit den Kontrolltieren mit reduzierter Futteraufnahme, Gewichtsverlust sowie reduziertem Sozialverhalten (Johnson *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass nicht LPS direkt, sondern IL-1 β für das „sickness behavior“ verantwortlich ist.

Wie auch TNF agiert IL-1 nicht nur als endogenes Pyrogen, indem es die Bildung von PGE über die COX-Aktivierung auslöst und die PGE-Rezeptoren reguliert, sondern wirkt ebenso als Stimulator auf Neurone, welche den neuroendokrinen Corticotropin-releasing factor (CRF) freisetzen (Berkenbosch *et al.*, 1987; Sapolsky *et al.*, 1987). Dies zieht eine Aktivierung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) nach sich, was wiederum zur Cortisol- bzw. Corticosteronfreisetzung über die Nebenniere führt. Diese wirken bekanntlich stark antiinflammatorisch, so dass Interleukin-1 indirekt auch antipyretische Eigenschaften aufweist.

3.3.3. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist zusammen mit IL-1 β eines der wichtigsten endogenen Pyrogene im homoeothermen Organismus. Seine Werte steigen bei einer Fieberentwicklung im Blut stark an und scheinen mit dessen Verlauf zu korrelieren. Während eines Fiebers können sowohl im Serum als auch in der cerebrospinalen Flüssigkeit erhöhte IL-6-Werte ermittelt werden (Ueno *et al.*, 1989; Cocceani *et al.*, 1993). Air-Pouch-Modelle, die eine lokale subkutane Entzündungsreaktion experimentell simulieren, zeigten, dass eine Stimulation mit LPS durch

Injektion in den Air-Pouch in einer Erhöhung der bioaktiven IL-6-Werte im Plasma resultierte (Miller *et al.*, 1997), die einen Anstieg der Körpertemperatur nach sich zog. Dieser konnte durch eine Vorbehandlung mit IL-6-Antiserum unterbunden werden (Cartmell *et al.*, 2000). Eine Injektion von hoch dosiertem IL-6 alleine zeigte in diesem Modell keine Temperaturerhöhung. Diese kam nur zustande, wenn IL-1 β parallel injiziert wurde (Luheshi *et al.*, 1996; Cartmell *et al.*, 2000). IL-6-ko-Mäuse zeigten weder nach intraperitonealer Stimulation mit geringen LPS-Dosierungen (50 μ g/kg), sowie IL-1 β , noch nach intracerebroventrikulärer IL-1 β -Gabe eine Fieberentwicklung (Chai *et al.*, 1996). Die intracerebroventrikuläre IL-6-Gabe löst hingegen eine den Kontrollen vergleichbare Fieberantwort aus (LeMay *et al.*, 1990; Chai *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass IL-6 eine zentrale Rolle in der Fieberinduktion durch exogene (LPS) wie endogene Pyrogene (IL-1 β) einnimmt, und dass IL-6 dem peripher sowie auch dem zentral verabreichten IL-1 β nachgeschaltet ist.

Bei IL-6 handelt es sich um ein lösliches Glycoprotein bestehend aus 184 AS und mit einem Molekulargewicht von 26kDa (Bazan, 1990). Ursprünglich wurde es aufgrund seiner stimulierenden Aktivität gegenüber B-Zellen „B-Zell-stimulierender-Faktor-2“ (BSF-2) (Poupart *et al.*, 1987) genannt und konnte aus Monozyten isoliert werden (Hirano *et al.*, 1985). Es wurde jedoch bald klar, dass dieses Zytokin neben den B-Zellen auch Einfluss auf T-Zellen, Keratinozyten, Hepatozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoklasten sowie Zellen des haematopoetischen Systems nimmt. Im Gehirn wird es von Gliazellen und Neuronen gebildet (Frei *et al.*, 1989; Maimone *et al.*, 1993). Weitere Synonyme sind auch Interferon β -2, Hybridoma or Plasmacytoma growth factor, Hepatocyte-stimulating factor, cytotoxic T-cell differentiation factor, sowie Macrophage granulocyte-inducing factor 2 A.

Neben der Fieberinduktion ist IL-6 auch mit für das Wachstum und die Differenzierung der B-Zellen, sowie der Synthese der IgG verantwortlich. Es nimmt Einfluss auf die Myelomproliferation, die Ko-Stimulation von Thymozyten, die Reifung der Megakaryozyten, die neuronale Differenzierung und steigert die IL3-abhängige Stammzell-Proliferation.

Der IL-6 Rezeptor kommt membranständig wie auch in gelöster Form vor und besteht aus zwei Untereinheiten. Zum einen aus der α -Kette, welche das Zytokin bindet und zum anderen aus dem Proteinanteil gp130, der für die Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich ist (Kishimoto *et al.*, 1992; Taga, 1992). Die Assoziation von IL-6 mit der α -Ketten-Untereinheit führt zur Bildung eines hoch affinen Komplexes mit dem gp130-Protein, welches die spezifische Signaltransduktion auslöst (Taga *et al.*, 1989). Neben dem IL-6 ist das

gp130-Protein ebenso für die Signalweiterleitung nach Stimulation mit dem „ciliary neurotrophic factor (CNTF), dem „leukemia-inhibitory factor“(LIF), dem „oncostatin M“ (OSM), dem Cardiotrophin-1 (CT-1) sowie dem IL-11 verantwortlich (Taga, 1992, 1997; Taga & Kishimoto, 1997).

Gp130 führt zur Aktivierung von drei Mitgliedern der Janus Kinase-Familie, und zwar JAK1, JAK2 und TYK2. Im Anschluss daran kommt es dann zur Phosphorylierung der tyrosinhaltigen Region des cytoplasmatischen Anteils von gp130. Es folgt die Rekrutierung und Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren „signal transducers and activators of transcription family“ (STAT1 und STAT3) und einer Tyrosin-Phosphatase (SHP-2). Die STAT- Transkriptionsfaktoren formen Homodimere, wandern in den Kern und aktivieren die Zielgene.

4. Beeinflussung des Gehirns durch endogene Pyrogene

Bezüglich der Freisetzung endogener Pyrogene in die Blutbahn stellt sich die Frage, wie nun die Signalübermittlung in das durch die Blut-Hirn-Schranke abgeschirmte Gehirn vonstatten geht. Die Blut-Hirn-Schranke stellt die natürliche Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem peripheren Blutkreislauf dar. Ihre Aufgabe besteht darin, die Homöostase im Gehirn aufrecht zu halten und es vor dem Eindringen schädlicher Stoffe und Substanzen zu bewahren. Blutgefäße weisen häufig fenestrierte Kapillaren auf, was einen guten Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe erlaubt. Im Gehirn hingegen liegt der überwiegende Teil der Kapillaren in nicht-fenestrierter Form vor. Hier sind zwischen den einzelnen Endothelzellen „tight junctions“, auch *Zonae occludentes* genannt, ausgebildet, welche sich dicht mit den „tight junctions“ der Nachbarzelle verbinden und so ausschließlich Ionen, deren Molekülmasse 90 Da nicht überschreiten und deren Radius kleiner als 0,2nm ist, den Durchtritt ermöglichen. Die Ausbildung dieser Barriere wird durch die die Endothelzellen umgebenden Astrozyten induziert und verstärkt. Doch wie findet nun die Signalübertragung ins Gehirn statt? Hierzu wurden bereits mehrere Hypothesen aufgestellt.

- *Humorale Übertragung*

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass endogene Pyrogene wie TNF α (Gutierrez *et al.*, 1993), IL-1 β (Banks & Kastin, 1991; Banks *et al.*, 1991; Banks *et al.*, 1993), IL-6 (Banks *et al.*, 1994) oder deren lösliche Rezeptoren (Gutierrez *et al.*, 1994) über spezielle Carrier-

gestützte Transportmechanismen transendothelial ins Gehirnnere transportiert werden, oder die Zytokine per Diffusion durch die Basallamina gelangen (Mercier *et al.*, 2003). Diese Art der Transportmöglichkeiten ist allerdings durch die Sättigbarkeit der Transporter und den notwendigen Gradienten als alleinige Aufnahmemöglichkeit unwahrscheinlich, um im signifikanten Ausmaß für die Zytokinerhöhung im Gehirn verantwortlich zu sein.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Zytokine durch Gebiete ins Gehirn vordringen, in denen die Blut-Hirn-Schranke fehlt bzw. Lecks aufweisen und somit ein Übertritt erfolgen kann.

Die Circumventrikulären Organe (CVOs) sind Regionen des Gehirns, die mit dem cerebroventrikulären System in Verbindung stehen, eine starke Vaskularisierung sowie fenestrierte Kapillaren und somit ein Leck in der Blut-Hirn-Schranke aufweisen (siehe **Abbildung 7**). Die „tight junctions“ sind hier nicht zwischen den einzelnen Zellen der CVOs anzutreffen, sondern sind zum Ventrikel oder zum angrenzende Gewebe hin ausgerichtet, so dass die Diffusion relativ großer Moleküle in die CVO-Areale vonstatten gehen kann (Oldfield & McKinley, 1995). Bei den Säugetieren sind bekanntermaßen 9 CVOs ausgebildet. Diese werden nochmals in sekretorische und sensorische CVOs unterteilt. Unter den sekretorischen CVOs versteht man die *Neurohypophyse* (NL), das *Organum subcommisurale* (SCO), die *Glandula pinealis* (PIN, Epiphyse) und die *Plexus choriodei* der Ventrikel. Als sensorische CVOs fungieren das *Organum vasculosum der Lamina terminalis* (OVLT), das *Subfornicalorgan* (SFO), die *Eminentia mediana* (ME) sowie die *Area postrema* (AP) (McKinley MJ, 1990; Oldfield & McKinley, 1995; Fry & Ferguson, 2007). Hier kommt dem *Organum Vasculosum der Lamina Terminalis* (OVLT), welches sich im rostralen Teil der präoptischen Region des anterioren Anteils des Hypothalamus (POA) befindet, eine besondere Bedeutung zu. Blatteis führte Läsions-Studien am Meerschweinchen durch, in denen er die anteriore Wand des dritten Ventrikels zerstörte (welche unter anderem das OVLT beherbergt), woraufhin es den Versuchstieren nach Pyrogenstimulation mit LPS nicht mehr möglich war, eine Fieberantwort auszubilden (Blatteis *et al.*, 1983). Man nimmt an, dass die zirkulierenden Zytokine, besonders IL-1 β , an Rezeptoren der Endothelzellen der CVOs binden, dort die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B nach sich ziehen, was dann zur Transkription bestimmter Gene für Prostaglandine oder weitere Zytokine führt (Rivest *et al.*, 2000). Stitt hingegen zerstörte in seinen Studien nur den ventrorostralen Anteil des OVLT bei Kaninchen und Ratten, welche nach Stimulation mit LPS eine Temperaturerhöhung zeigten (Stitt, 1985). Diese widersprüchlichen Studien sind durch das Ausmaß der OVLT-Läsion zu erklären, so dass eine Unterbindung der Fieberentwicklung nur

bei vollständiger Entfernung des OVLTs vorzuliegen scheint. Weitere Studien mit Schafen (Blatteis *et al.*, 1987) und Meerschweinchen bestätigten, dass eine vollständige Entfernung des OVLT zum Ausbleiben der Fieberentwicklung nach LPS-Stimulation führt. Neben den Läsionsstudien konnten diverse Rezeptoren endogener Pyrogene in den Hirnarealen der CVOs nachgewiesen werden. So konnten zwei Arbeitsgruppen im Gehirn die konstitutive Ausbildung von IL-1-Rezeptoren im Gefäßsystem der CVOs sowie in anderen Zelltypen der AP nachweisen (Cunningham *et al.*, 1992). Hieraus schließt man, dass IL-1 im OVLT und im SFO nicht direkt mit Neuronen interagieren kann, da seine Rezeptoren nur in den Gefäßen, nicht aber in anderen Zelltypen exprimiert sind. Die TNF α -Rezeptoren werden in zwei Subtypen, den p55- und den p75-Rezeptor, unterteilt. Der p55-Rezeptor wird konstitutiv in allen CVOs exprimiert (Nadeau & Rivest, 1999). Auch der IL-6-Rezeptor sowie seine Untereinheit gp130 werden konstitutiv in den sensorischen CVOs exprimiert (Vallieres & Rivest, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass LPS-Stimulationen in den Gebieten der CVOs und des Plexus chorioideus zur Ausbildung von IL-6-Rezeptoren führt.

Die im Blutgefäßsystem zirkulierenden Zytokine können mit den im Gefäßsystem der CVOs exprimierten Rezeptoren interagieren, somit die Produktion weiterer sekundärer Signalmoleküle veranlassen und die thermosensitive Neurone, die in die fieberrelevanten Gehirnstrukturen projizieren, in ihrer Aktivität modifizieren. Also dienen die CVOs zur Umwandlung zytokinvermittelter chemischer Signale in neuronale Signale, die dann in den hypothalamischen Kontrollzentren zur Fieberentwicklung führen.

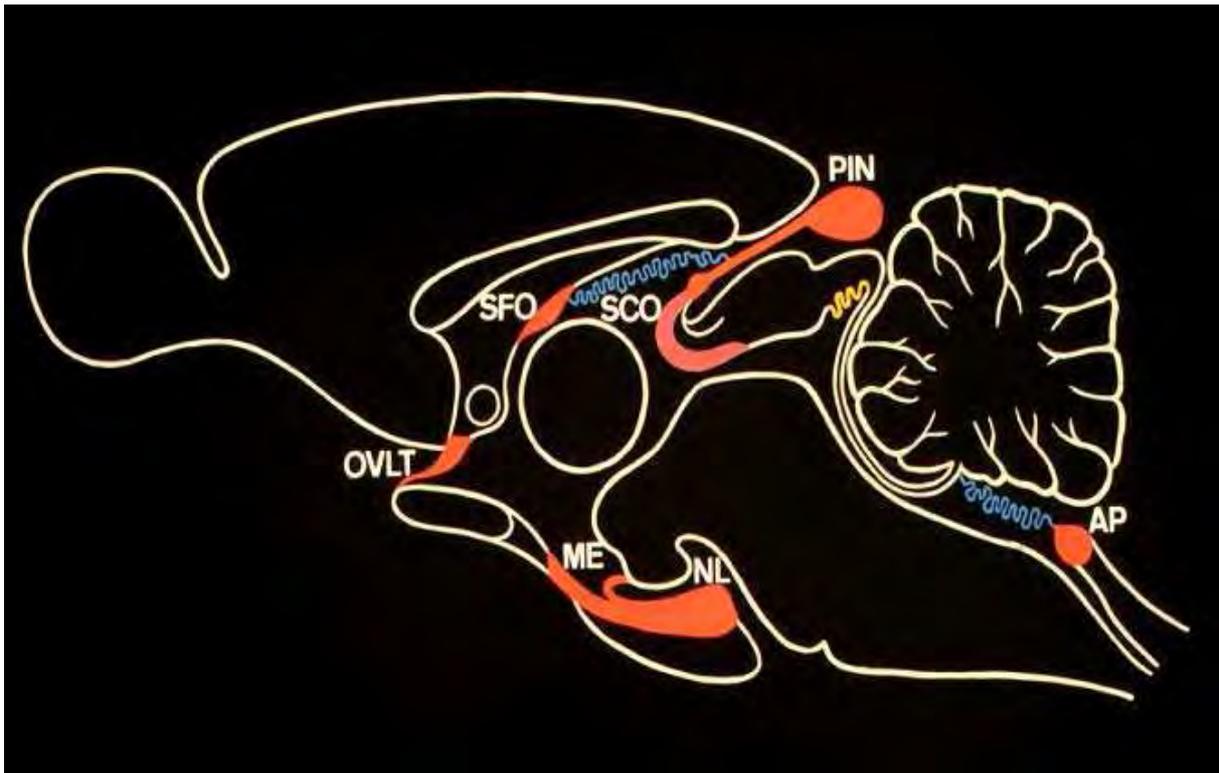


Abbildung 7: Schematische Sagittalansicht eines Rattenhirns. Die zirkumventrikulären Organe (CVOs) sind rot dargestellt. Die drei sensorischen CVOs sind das Organum vasculosum laminae terminalis (OVL), das Organum subfornicale (SFO), beide in der Lamina terminalis – der rostralen Begrenzung des dritten Ventrikels – gelegen und die Area postrema (AP) im Bereich des vierten Ventrikels.

- *Nervale Übertragung*

Neben der humoralen Übertragung durch Zytokine stellt die neuronale Übertragung eine weitere Variante der Fieberinduktion dar. Hier wäre es über Afferenzen sensorischer Neurone, die durch exogene Pyrogene wie LPS stimuliert werden, möglich, die inflammatorische Information ins Gehirn weiter zu transportieren, die dort zu einer intracerebralen Mediatorausschüttung führen könnte. Diese Überlegung entstand auf Grund der Tatsache, dass in der frühen Phase der durch intraperitoneal verabreichten LPS verursachten Temperaturerhöhung noch keine messbaren Zytokinwerterhöhungen in der Blutzirkulation zu messen sind, und somit diese frühe Fieberphase nicht humoral verursacht sein kann. Besonders dem *Nervus vagus* wird in diesem Zusammenhang eine große Bedeutung zugeschrieben. So konnte bei vagotomierten Tieren ein Fehlen des „Sickness behavior“ festgestellt werden (Bluthe *et al.*, 1996). Die durch LPS induzierte Aktivierung der HPA-Achse (Gaykema *et al.*, 1995), die Hyperalgesie (Watkins *et al.*, 1994), sowie das vermehrte Schlafbedürfnis der Tiere (Hansen & Krueger, 1997) konnte durch eine Vagotomie unterdrückt werden. Auch eine Unterdrückung der Fieberantwort konnte bei

Meerschweinchen (Sehic & Blatteis, 1996; Goldbach *et al.*, 1997) und Ratten (Romanovsky *et al.*, 1997) beobachtet werden. Dies scheint aber Dosis- (Romanovsky *et al.*, 1997) sowie von der Art der LPS-Verabreichung (Goldbach *et al.*, 1997) abhängig zu sein. Goldbach *et al.* zeigten eine signifikante Unterdrückung des Fiebers beim vagotomierten Meerschweinchen nach i.p.- Verabreichung von LPS. Bei i.m.-Gabe des LPS konnten hingegen keine Unterschiede zwischen vagotomierten und nicht vagotomierten Tieren festgestellt werden. Vagotomie-Studien zeigten jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse. Watkins *et al.* zeigten, dass bei vagotomierten Tiere nach intraperitonealer IL-1-Applikation eine verstärkte Fieberantwort im Gegensatz zu nicht vagotomierten Tieren auftrat (Watkins *et al.*, 1995). Luheshi konnte keine signifikante Suppression des LPS-Fiebers bei vagotomierten Tieren feststellen (Luheshi *et al.*, 2000).

Blatteis stellte zur neuronalen Fieberinduktion eine Hypothese auf, die besagt, dass es nach LPS-Stimulation in den Kupferzellen der Leber zur Aktivierung des Komplementfaktors C5a kommt, der die Kupferzellen zur PGE₂-Synthese stimuliert und zu einer schnellen Freisetzung von PGE₂ führt. Dieses kann dann an entsprechenden Rezeptoren der Afferenzen des Nervus vagus binden, woraufhin diese aktiviert werden und ihre Signale in die Medulla oblongata weiterleiten. Die dort angelangte Erregung wird auf die anteriore präoptische Region übertragen, was zu einer intrahypothalamischen Freisetzung von Noradrenalin und somit zu einer weiteren neuronalen Aktivierung und schlussendlich zur Stimulation der Thermogenese führt (Blatteis, 2006, 2007).

Der Nervus vagus scheint bei polyphasischem Fieber sowie der Hypothermie keine signifikante Rolle zu spielen, ist aber ggf. bei der Entwicklung von monophasischem Fieber beteiligt (Blatteis, 2006).

Neben dem Nervus vagus könnten auch kutane afferente sensorische Nerven an der Signalweiterleitung ins Gehirn beteiligt sein. Zumindest unter bestimmten experimentellen Bedingungen lässt sich nämlich bei Meerschweinchen, die durch Injektion von LPS in eine subkutane Kammer hervorgerufene Fieberantwort durch Gabe eines Lokalanästhetikums in das Entzündungsareal abschwächen (Ross *et al.*, 2000). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich Hautafferenzen am Transport inflammatorische Signale zum Gehirn beteiligen können.

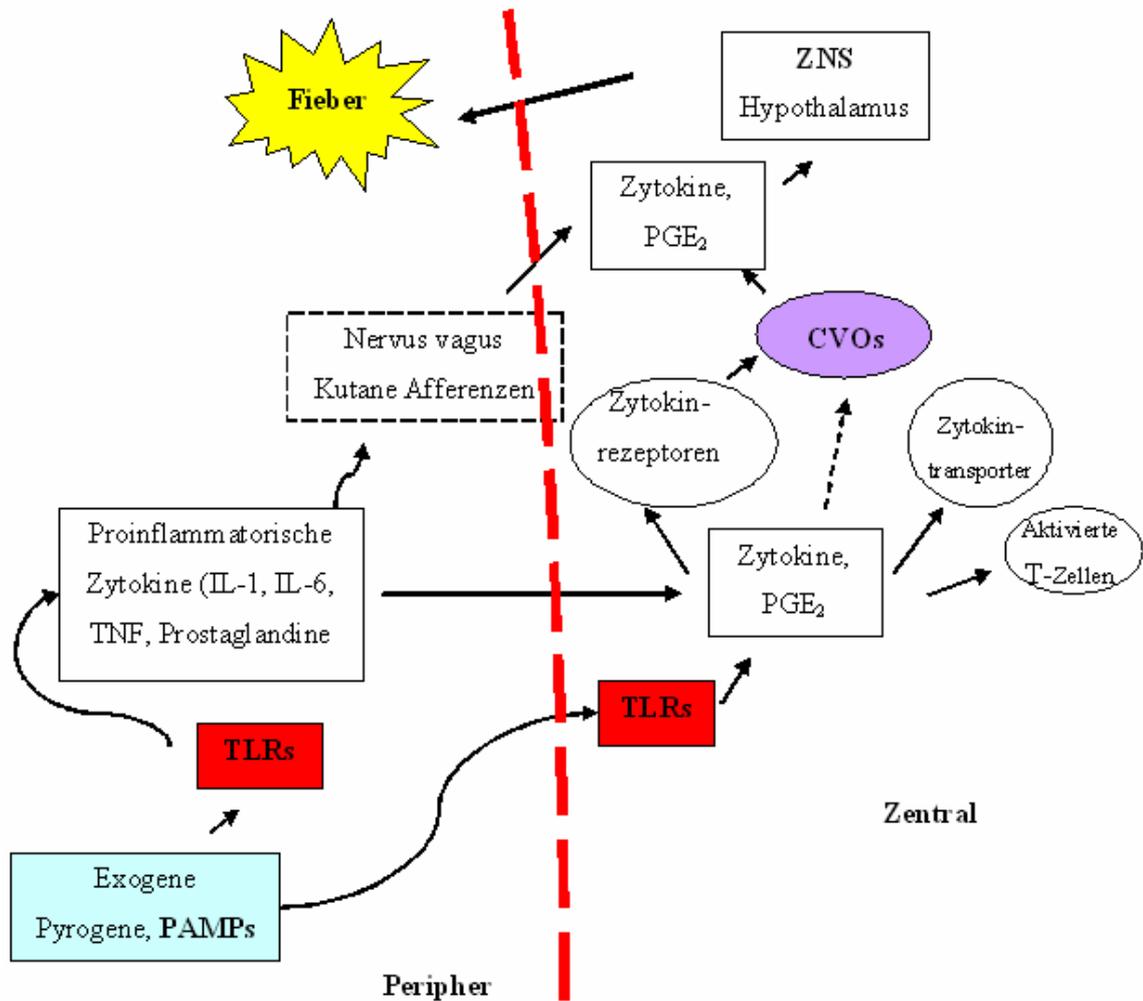


Abbildung 8: Zusammenfassung der Hypothesen zur Fieberentstehung: PAMPs werden in der Peripherie von TLRs erkannt. Es kommt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen. Diese gelangen ins Gehirn und überwinden dort über verschiedene Mechanismen die Blut-Hirn Schranke. Es kommt außerdem zu einer lokalen Produktion dieser Mediatoren. Sie können zudem über einen nervalen Weg Signale zum ZNS übermitteln. PAMPs können wahrscheinlich auch direkt an TLRs im ZNS in Bereichen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke (CVOs) binden.

5. Finale Fiebermediatoren im ZNS

Seit langem ist bekannt, dass Prostaglandinen und speziell Prostaglandin E₂ eine zentrale Schlüsselrolle als Fiebermediatoren zukommt. Dieses Wissen beruht auf mehreren Beobachtungen.

Während des Fieberverlaufs werden im Blut sowie im Gehirn (Sehic & Blatteis, 1996; Davidson *et al.*, 2001) erhöhte PGE₂-Werte gemessen, die mit der Temperaturentwicklung relativ gut korrelieren, was auf die Rolle von PGE₂ in der Fieberinduktion hinweist.

Unterdrückt man die Prostaglandinsynthese mit COX-Hemmern wie Indomethacin, so unterdrückt man ebenfalls auch die Fieberentwicklung nach LPS-Stimulation (Kluger, 1991). Genauere knock-out-Versuche zeigten, dass nur bei COX-2-defizienten Mäusen das LPS-induzierte Fieber verhindert werden konnte, wohingegen COX-1-defiziente Mäuse eine Fieberantwort ausbildeten (Li *et al.*, 1999). Prostaglandin-E-Synthetase(PGES)-defiziente Mäusen konnten nach LPS-Stimulationen ebenfalls kein Fieber entwickeln (Engblom *et al.*, 2003).

Milton führte Versuche durch, in denen er verschiedene Prostaglandine direkt in den dritten Ventrikel von Katzen und Kaninchen verabreichte und dabei eine deutliche Fieberentwicklung messen konnte (Milton & Wendlandt, 1971). Scammell verabreichte PGE₂ direkt in die Region des POA und konnte dort mittels FOS-Expression die direkte neuronale Aktivierung durch PGE₂ nachweisen (Scammell *et al.*, 1996). Des weiteren führte er Versuche durch, in denen er Cyclooxygenase-Hemmer in die präoptische Region injizierte, und dadurch LPS-induzierte Fieber unterdrücken konnte, was die Bedeutung des PGE₂ als Fiebermediator beweist (Scammell *et al.*, 1998). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der systemischen Verabreichung von COX-Hemmern beobachtet (Milton, 1998; Roth *et al.*, 2002).

Versuche, die sich mit den Prostaglandinrezeptoren beschäftigten, brachten weitere aufschlussreiche Erkenntnisse. Knock-out-Versuche, bei denen Mäuse verwendet wurden, denen der EP3-Rezeptor fehlte, zeigten keine Fieberentwicklung nach zentraler sowie peripherer LPS- oder IL-1 β - Stimulation (Ushikubi *et al.*, 1998; Oka *et al.*, 2003a). Eine Beteiligung des EP3-Rezeptors an der Fieberentwicklung ist somit sehr wahrscheinlich. Oka konnte nachweisen, dass die Verabreichung eines spezifischen EP1-Rezeptoragonisten zur dosisabhängigen Temperaturerhöhung, deren zeitlicher Verlauf mit der der PGE₂-bedingten Temperaturerhöhung übereinstimmt, führt (Oka *et al.*, 2003b). Auch ein spezifischer EP3-Agonist führte zur Temperaturerhöhung, der zeitliche Verlauf stimmte aber nicht mit dem des PGE₂-induzierten Fiebers überein. Die spezifische Stimulation des EP4-Rezeptors führte zu einer Senkung der Körpertemperatur. Somit wäre es möglich, dass sowohl EP1-, EP3- wie auch EP4-Rezeptoren an der Fieberentwicklung beteiligt sind. Knock-out-Versuche mit EP1- oder EP3-defizienten Mäusen verdeutlichten nochmals die Beteiligung verschiedener EP-Rezeptorsubtypen an der Fieberinduktion, zeigten jedoch deutlich die vorrangige Stellung des EP3. So zeigten EP1-defiziente Mäuse eine Dosis-abhängige Veränderung der Fieberantwort. Bei einer niedrigen Dosis von 10 μ g/kg LPS konnte initial eine abgemilderte Fieberantwort beobachtet werden, in deren weiteren Verlauf sich jedoch eine normale Fieberentwicklung

zeigte. Bei Gabe von 100µg/kg LPS konnte bei diesen Mäusen kein Fieber beobachtet werden. Bei den EP3-defizienten Mäusen wurde hingegen sogar eine dosis- und zeitabhängige Verminderung der Körpertemperatur und keinerlei Fieberantwort nach Gabe von LPS festgestellt (Oka *et al.*, 2003a).

Die Zytokine bewirken in der Peripherie sowie im Gehirn nach Bindung an ihre Rezeptoren die Bildung bzw. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT3 oder NFκB, die dann für bestimmte Zielgene kodieren und zur Bildung weiterer Botenstoffe führen. So induziert und reguliert NFκB die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der Prostaglandin-E-synthetase (PGES), die dann im weiteren Verlauf zur PGE₂-Bildung führen. Aus Membranphospholipiden wird mit Hilfe der Phospholipase-A Arachidonsäure gebildet, aus der dann durch enzymatische Einwirkung der COX-2 Prostaglandin H₂ (PGH₂) gebildet wird. PGH₂ wird durch die PGES dann weiter zu PGE₂ umgebaut, das dann an seinen spezifischen Prostaglandinrezeptor Subtyp EP3 binden kann, der in der präoptischen Region des Hypothalamus (POA), dem Nucleus tractus solitarius (NTS) und der ventrolateralen Medulla stark exprimiert ist. Neben dem EP3 sind noch die weiteren Subtypen 1 und 4 im Gehirn exprimiert (Oka *et al.*, 2000), die allerdings, wie bereits erwähnt, eine untergeordnete Rolle in der Fieberinduktion spielen. Die Prostaglandinsynthese konnte im Gehirn selbst nachgewiesen werden (Sehic & Blatteis, 1996). Es ist aber auch ein Übertritt der in der Peripherie gebildeten Prostaglandine ins Gehirn möglich, ein Vorgang, der unter inflammatorischen Bedingungen sogar verstärkt stattfindet (Davidson *et al.*, 2001)

EP3-Rezeptoren konnten an thermosensorischen Neuronen nachgewiesen werden (Sugimoto *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2000). Eine selektive genetische Deletion des EP3-Rezeptors in der präoptischen Region führt zu einer Aufhebung des prostaglandinvermittelten Fiebers (Lazarus *et al.*, 2007). PGE₂ verursacht in der ventromedialen präoptischen Region eine Herabsetzung der Impulsrate warmsensitiver Neurone (Ranelis & Griffin, 2003). Diese projizieren in nachgeschaltete Temperaturregulationszentren (Nakamura *et al.*, 2004) und führen dort zu einer Sollwertverstellung der Körpertemperatur, was zur gesteigerten Wärmeproduktion und Fieberentwicklung führt (Hori *et al.*, 1988; Xin & Blatteis, 1992).

6. Die verwendeten Tiermodelle

Um die Bedeutung des TLR2 und des CD36 im Rahmen experimenteller inflammatorischer Reaktionen nachzuweisen, wurden zwei verschiedene Tiermodelle verwendet. Zum einen wurden TLR2-ko-Mäuse eingesetzt, um die Erkennung diazylierter

Lipopeptide wie MALP-2 und FSL-1 sowie die Signalweiterleitung durch ihn nachzuweisen. Um die Bedeutung des CD36 zu hinterfragen, wurden spontan hypertensiven Ratten (SHR) verwendet, die eine CD36-Defizienz aufweisen. Beiden Tiermodellen wurden Radiotransmitter implantiert, um deren Körpertemperatur und deren motorische Aktivität unter basalen Bedingungen sowie nach erfolgter Stimulation mit den unterschiedlichen Pyrogenen überprüfen zu können. Bei den Ratten erfolgte des Weiteren eine Aufzeichnung des Futter- und Wasserverbrauchs sowie der Gewichtsentwicklung. Somit konnten möglich auftretende Anorexie und Adipsie als charakteristische Komponenten des „sickness behaviors“ festgestellt werden. Die Ermittlung der Zytokinwerte erfolgte über Verwendung spezifischer Bioassays.

6.1. Die TLR2-ko-Maus

Um Knockout-Mäuse herstellen zu können, macht man sich die Fähigkeit von Säugerzellen zu nutze, identische DNA-Bereiche via homologer Rekombination austauschen zu können. Diese homologe Rekombination dient beispielsweise zur Neukombination des Erbguts während der Meiose und findet sowohl zwischen Chromosomenpaaren, wie auch im Falle der Genmanipulation, zwischen einem Chromosom und einem rekombinanten künstlich eingebrachten DNA-Molekül statt. Dieser sogenannte Vektor enthält der genetischen Zielsequenz homologe DNA-Regionen um eingebaut werden zu können und wird in pluripotente embryonale Stammzellen eingebracht. Um die Zellen selektieren zu können, die den Vektor eingebaut haben, enthält der Vektor zusätzlich eine Antibiotikaresistenz, im Fall der TLR2-ko-Mäuse eine Resistenz gegen Neomycin. Nach Anreicherung der Zellen werden nun nur diese in Mäuseembryonen verbracht, welche gegen Neomycin resistent sind, und somit eine Inaktivierung des gewünschten TLR2-Gens durch Aufnahme des Vektors vorweisen. Werden die veränderten pluripotenten Stammzellen nun wieder in Mäuseembryonen im Blastozystenstadium injiziert, so integrieren sie sich in die embryonale Zellmasse und tragen zum Aufbau aller Gewebe einschließlich der Keimbahn bei. Da die Inaktivierung normalerweise nur eines der beiden Allele betrifft, sind die Zellen der entstandenen Mäuse heterozygot für den Gendefekt, das heißt es bilden sich sogenannte Chimären. Um jetzt die Tiere ermitteln zu können, welche den Gendefekt aufweisen, besteht die Möglichkeit, Stammzellen andersfarbiger Mäuse zu verwenden, so dass sich der Anteil beider Zelltypen an der Chimäre an der Fellfärbung abschätzen lässt, da die Blastozysten aus einem Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe (C57/BL-6 Maus), die ES-Zellen dagegen aus einem Stamm mit brauner Färbung (Agouti-Maus) gewonnen werden. In gleichem Verhältnis,

in dem das Fell braune und schwarze Flecken ausbildet, sind beide Zelltypen auch in allen anderen Geweben einschließlich der Keimbahn vertreten. Um nun Tiere zu erhalten, welche ausschließlich Körperzellen mit heterozygotem Gendefekt tragen, wird die Chimäre mit einer C57BL/6J Maus gekreuzt. Alle Nachkommen, welche das Erbgut der genetisch veränderten ES-Zellen tragen, weisen eine braune (Agouti-)Fellfarbe auf. Tiere mit dem Erbgut der Blastozyste dagegen sind schwarz. In den Agouti-Tieren erfolgt der genetische Nachweis des Defekt-Gens. Die heterozygoten Tiere können dann miteinander gekreuzt werden, um homozygot-defiziente („Knockout“-)Mäuse zu erhalten (Braun & Willnow, 1996; Werts *et al.*, 2001).

Die so gewonnen Tiere wurden in einer Vielzahl von Versuchen verwendet, um die genauen Aufgaben des TLR2 erforschen zu können. Dieser Rezeptor ist in der Lage, eine Vielzahl mikrobieller Bestandteile zu erkennen. So ist bekannt, dass der TLR2 für die Erkennung von *Borrelia burgdorferi* (Wooten *et al.*, 2002) durch das angeborene Immunsystem benötigt wird. Er spielt zusammen mit dem TLR4 eine Rolle in der Erkennung der durch Lipoteichonsäure induzierten Lungenentzündung (Dessing *et al.*, 2008) und ist für die Erkennung von Peptidoglykanen wie z.B. die von *Staphylococcus aureus* verantwortlich (Schwandner *et al.*, 1999; Kielian *et al.*, 2005a; Kielian *et al.*, 2005b). Es liegen auch Untersuchungen mit dem Mykobakterium *tuberculosis* vor, welche zeigen, dass der TLR2 für die Funktionsfähigkeit des angeborenen Immunsystems zur Bekämpfung der Mykobakterien wichtig zu sein scheint (Reiling *et al.*, 2002; Drennan *et al.*, 2004; Quesniaux *et al.*, 2004). Bei TLR2-ko-Mäusen kann das angeborene Immunsystem keine adäquate Antwort gegen in hohen Dosen verabreichte Mykobakterien ausbilden (Reiling *et al.*, 2002). Auch eine immunmodulatorische Aufgabe wurde im Zusammenhang einer Infektion mit *Mykobakterium tuberculosis* festgestellt (Drennan *et al.*, 2004).

Die hier verwendeten TLR2-ko-Mäuse wurden uns von Herrn Dr. Kirschning des mikrobiologischen Institutes der Universität München zur Verfügung gestellt.

6.2. Die CD36-defiziente spontan hypertensive Ratte

Die zu diesem Versuch verwendeten spontan hypertensiven Ratten (SHR), wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts in Japan gezüchtet, um geeignete Versuchstiere zur Erforschung des spät auftretenden, vererbaren Bluthochdrucks zur Verfügung zu haben. Hierzu verwendete man ab dem Jahre 1938 Wistar Ratten, die zunächst im veterinärphysiologischen Institut der Universität von Tokio, ab 1944 dann im wissenschaftlichen Department der Universität von Hokaido und ab 1951 in der medizinischen Fakultät der Universität von

Kyoto gehalten und gezüchtet wurden. Die Zucht gründete auf einem Wistar-Männchen, welches ab der 7. Lebenswoche an erhöhtem Blutdruck von 150-175 mmHg litt. Dieses Männchen verpaarte man mit einem Wistar-Weibchen mit einem leicht über dem Durchschnitt liegenden erhöhten Blutdruck von 130-140 mmHg. Aus der F1-Generation wählte man dann wiederum nur die Tiere zur weiteren Verpaarung aus, die ebenfalls an andauerndem erhöhtem Blutdruck litten. Dieses Procedere wurde bis zur F6-Generation weiter fortgeführt, in der dann bereits nach der 15. Lebenswoche über 50 % der gewonnenen Tiere unter einer Hypertension litten und bei denen der Blutdruck zum Teil 200mmHg noch überschritt. Die hier herausgezüchteten Ratten wurden als „spontaneously hypertensiv rats (SHR)“ betitelt (Okamoto & Aoki, 1963).

Die SH-Ratten zeigen im Vergleich zu ihren genetischen Kontrolltieren, den WKY, phänotypische Auffälligkeiten, von denen einige im Anschluss beschrieben werden sollen.

Die **Hypertension** der SH-Ratten ist anhand vieler Versuche (Okamoto & Aoki, 1963; Pravenec *et al.*, 2000; Iemitsu *et al.*, 2003) sowie durch eigene Blutdruckmessungen nachgewiesen. Sie entsteht durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen, die zentral wie auch in der Peripherie zu beobachten sind. Die Ausbildung der GABA_B-Rezeptoren im Hypothalamus ist reduziert. Diese Rezeptoren wirken inhibitorisch auf bestimmte neuroendokrine Mechanismen, indem sie die Freisetzung von ACTH und Vasopressin hemmen und somit blutdrucksenkend wirken. Bei den SHR fällt diese Herabregulierung der Transmitterfreisetzung weg, so dass es aufgrund erhöhter ACTH- und Vasopressingehalte zur Erhöhung des Blutdrucks kommt (Ichida & Kuriyama, 1998). Neben diesen Veränderungen tritt eine erhöhte Genexpression der Angiotensin2-Typ1-Rezeptoren im paraventrikulären Nucleus (PVN) des Hypothalamus auf, der an der Blutdruckregulierung beteiligt ist. Dies korreliert positiv mit dem erhöhten Blutdruck (Reja *et al.*, 2006). Neben diesen Rezeptoren tritt auch ein höheres Aufkommen an Noradrenalin und Adrenalin-Rezeptoren zentral wie in der Peripherie auf, was ein stärkeres Ansprechen auf sympathische Reize nach sich zieht (Reja *et al.*, 2002). Die Ratten zeigen des weiteren ein vermehrtes Wachstum der glatten Muskelzellen der Gefäßwände, was zu einem erhöhten Gefäßwiderstand und somit zu erhöhtem Blutdruck beiträgt (Su *et al.*, 2002). Der CD36-Defekt (s.u.) wurde auch lange als Ursache der Hypertension vermutet (Pravenec *et al.*, 2000), was aber im Nachhinein nicht bewiesen werden konnte (Pravenec *et al.*, 1999; Pravenec *et al.*, 2003).

Neben dem erhöhten Blutdruck treten bei den Ratten mehrere Auffälligkeiten in ihrem Fett- und Zuckerstoffwechsel auf. Diese gleichen dem humanen Insulin-Resistenz-Syndrom, bei dem ein **Typ 2 Diabetes**, Übergewicht kombiniert mit **Hyperlipidämie**,

Fettstoffwechselstörungen und Bluthochdruck auftreten (Aitman *et al.*, 1999; Pravenec *et al.*, 2001; Pravenec & Kurtz, 2002). Auf der Suche nach der Ursache der Veränderungen bei den SHR wurde eine chromosomale Deletion auf einem Locus des Chromosom 4 im Intron 4 der Ratten festgestellt, der für diese Veränderungen verantwortlich zu sein scheint (Aitman *et al.*, 1999; Glazier *et al.*, 2002). Durch diese Deletion kommt es zu einer gestörten Rekombination der Gene, die eine **CD36-Defizienz** verursacht. Der CD36-Rezeptor ist ein transmembranär gelegenes Glykoprotein, das in erster Linie als Transporter langkettiger Fettsäuren dient und die Aufnahme der Fettsäuren im Myokard, der Skelettmuskulatur sowie im Fettgewebe vereinfacht (Coburn *et al.*, 2001). Durch die verringerte Aufnahme langkettiger Fettsäuren kommt es zu einem Energiedefizit, was sekundär die Glukoseaufnahme in die Zelle steigert, was zu einer Hyperinsulinämie und einer Myokardhypertrophie führt (Hajri *et al.*, 2001). Durch eine Diät, die einen großen Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren und wenigen langkettigen enthält, konnten diese Erscheinungen unterbunden werden (Hajri *et al.*, 2001). Der Bluthochdruck blieb jedoch weiterhin bestehen, was nochmals darauf schließen lässt, dass die CD36-Defizienz nicht für die Hypertension verantwortlich ist.

Über die **Körpertemperatur** der SHR findet man unterschiedliche Angaben in der Literatur. Einige Untersuchungen ergaben, dass SHR im Vergleich zu den WKY von Grund auf eine höhere Körpertemperatur aufwiesen (Collins *et al.*, 1987; Price & Wilmoth, 1990). Die metabolische bedingte Wärmegewinnung der SHR ist höher und die Wärmeabgabe vergleichbar zu den WKY. Die zitterfreie Wärmebildung durch das braune Fettgewebe scheint bei diesen Temperaturunterschieden keine Rolle zu spielen (Hayashi *et al.*, 1988). Im Gegenteil zeigen SHR eine verminderte Fähigkeit der Wärmegewinnung durch das braune Fettgewebe (Kirby *et al.*, 1999), was unter Umständen auch zu einer geringeren Fieberentwicklung im Krankheitsfall führen kann (Bhatnagar *et al.*, 1993). Auch unter Stress reagieren die SHR mit einer abweichenden Temperaturerhöhung zu ihren genetischen Kontrollen den WKY-Ratten. Beim Handling der Ratten kommt es zu einer stressinduzierten, transienten Erhöhung der Körpertemperatur, die zum Teil bei den SHR stärker ausfällt. Diese Unterschiede sind jedoch herkunftsabhängig, da die SHR von Charles River zu den WKY vergleichbare Werte zeigten, wohingegen SHR der Taconic-Farm mit einer vergleichsweise höheren Temperatursteigerung reagieren. Dieser Unterschied rührt wahrscheinlich von unterschiedlichen Aufzuchtweisen der Rattenerzeuger her, da die Tiere im Ruhezustand keinerlei Temperaturunterschiede zueinander aufwiesen und nur im Stressfall unterschiedlich reagieren (Morley *et al.*, 1990). Wie bereits erwähnt, zeigen die SHR eine erhöhte Genexpression der Angiotensin2-Typ1-Rezeptoren im Hypothalamus. Saiki bringt die

gesteigerte Temperaturerhöhung wie auch die stärkere Tachykardie der SHR bei Stressreaktionen mit den Angiotensin1-Rezeptoren in Zusammenhang, da eine Blockade dieser Rezeptoren zur Verminderung der stressinduzierten Temperaturerhöhung wie auch zur Reduktion der Herzfrequenz führt (Saiki *et al.*, 1997).

7. Ziele und zentrale Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

7.1. Kritische Rolle von TLR2 bei der Fieberreaktion nach Stimulation mit mycoplasmalen Lipopeptiden

Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch MALP-2 und FSL-1 über die direkte Interaktion mit den beiden Mitgliedern der Familie der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR6 als Heterodimer zu erfolgen scheint (Okusawa *et al.*, 2004). Dies ist jedoch nicht unumstritten. Einige Autoren postulieren, dass zelluläre Aktivierung durch mykoplasmale Lipopeptide auch durch jeweils einen der beiden TLRs (TLR2 oder TLR6) erfolgen kann (Takeuchi *et al.*, 2001; Morr *et al.*, 2002; Buwitt-Beckmann *et al.*, 2005). Systematische *in vivo* Untersuchungen zu dieser Frage, speziell was die Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome betrifft, liegen bislang noch nicht vor und wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Vertiefende Erkenntnisse über die Bedeutung von TLR4 und CD14 bei der Vermittlung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome nach Stimulation des angeborenen Immunsystems mit LPS gramnegativer Bakterien wurden mit Hilfe von Tieren (Mäusen) mit einem genetischen Defekt (Mutation) eines dieser beiden Signalmoleküle gewonnen (Poltorak *et al.*, 1998; Ulevitch & Tobias, 1999). Auch zur Untersuchung einer kritischen Bedeutung von TLR2 und CD36 bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch mykoplasmale Lipopeptide stehen geeignete Tiermodell zur Verfügung. So wurden TLR2-defiziente („knockout“) Mäuse bereits erfolgreich zur Untersuchung von Mechanismen einer grampositiven Meningitis eingesetzt (Koedel *et al.*, 2003).

7.2. Rolle von CD36 bei der Fieberreaktion nach Stimulation mit mycoplasmalen Lipopeptiden

Bei der TLR2/6-Aktivierung durch FSL-1 oder MALP-2 spielt nach neusten Befunden (Hoebe *et al.*, 2005; Triantafilou *et al.*, 2006) das Zelloberflächenmolekül CD36 eine ähnliche

Rolle wie CD14 bei der TLR4-Aktivierung durch LPS, da CD36 als „Sensor für Diacylglyceride“ wie FSL-1 oder MALP-2 zu fungieren scheint (Hoebe *et al.*, 2005).

Auch für eine Erfolg versprechende Untersuchung zur Bedeutung von CD36 bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch mykoplasmale Lipopeptide gibt es mit der SH-Ratte ein geeignetes Tiermodell. Die genetisch mutierten, sogenannten „spontan hypertensiven Ratten“ (SHR) zeichnen sich nicht nur durch einen stark erhöhten systemischen Blutdruck im Vergleich zu den als Wildtyp fungierenden Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) aus. So zeigen die SHR eine Defizienz im CD36 Molekül, das nicht nur als Rezeptor für Kollagen und Thrombospondin fungiert, sondern auch in der Leber bei der Aufnahme von Fettsäuren beteiligt ist (Aitman *et al.*, 1999). Wegen der bereits oben erwähnten Funktion von CD36 als „Sensor für Diacylglyceride“ kann sich das Fehlen des CD36 bei den SHR signifikant auf die über TLR2/6 vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems dieser Ratten durch MALP-2 und FSL-1 auswirken. Systematische Untersuchungen hierzu gibt es bislang noch nicht und waren Gegenstand dieser Arbeit.

7.3. Untersuchte Fragestellungen

Zentrale Ziele, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, war die Bearbeitung und Aufklärung folgender Fragestellungen:

Zunächst sollte eine Analyse der möglichen essentiellen Bedeutung von TLR-2 bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome nach systemischer Stimulation mit den mycoplasmalen Lipopeptiden FSL-1 und MALP-2 erfolgen. Hierzu wurden TLR-2-defiziente Mäuse im direkten Vergleich zu Kontrollmäusen (C57/BL-6) verwendet, um zu klären, ob TLR-2 für die durch die Stimulation mit FSL-1 und MALP-2 induzierten zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptome unerlässlich ist. Im Vergleich zu den TLR-2/6-Agonisten wurde auch der TLR-4-Agonist LPS verwendet. Als physiologische und immunologische Endpunktparameter dienen hierbei die Entwicklung der Körpertemperatur, die motorische Aktivität und die endogene Bildung /Freisetzung von Zytokinen.

Im zweiten Schritt folgte die Analyse einer möglichen essentiellen Bedeutung von CD36 bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome nach systemischer Stimulation mit den mycoplasmalen Lipopeptiden FSL-1 und MALP-2. Durch die Verwendung von CD36-defizienten Ratten (SHR) im direkten Vergleich mit den entsprechenden genetischen Kontrolltieren (WKY) soll geklärt werden, ob dieses Adaptermolekül (entsprechend dem CD14 bei der LPS-induzierten Signaltransduktion) nach

Stimulation mit FSL-1/MALP-2 für die Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome unerlässlich ist. Auch LPS als primärer TLR-4-Agonist wurde hier vergleichend angewendet. Als physiologische, immunologische und funktionell-neuroanatomische Endpunktparameter dienten hierbei ebenfalls die Entwicklung der Körpertemperatur, der motorischen Aktivität sowie zusätzlich die Futter- und Wasseraufnahme („sickness behavior“), die endogene Bildung/Freisetzung von Zytokinen und Prostaglandinen (PGE₂) und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 im Gehirn.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Versuchstiere

1.1.1. Ratten

Bei den hier verwendeten Versuchstieren handelt es sich zum einen um spontan hypertensive Ratten (SHR) und deren genetische Kontrollen, dem Wildtyp entsprechenden Wistar Kyoto Ratten (WKY). Die SHR entstammten der institutseigenen Zucht des Physiologischen Instituts (Fachbereichs der Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität in Giessen) und wurden dann im veterinärphysiologischen Institut in die eigene Zucht übernommen. Bei den Kontrolltieren wurden zwei Zuchtpaare bei Charles River Laboratories (D-Sulzfeld) bestellt und für eine institutseigene Zucht eingesetzt. Somit konnte dem Bedarf entsprechend nachgezüchtet werden.

Die in den Versuchen verwendeten Tiere waren männlich und hatten ein Operationsgewicht von 200-230 g. Sie wurden bis zum Absetzen vom Muttertier in transparenten Polycarbonatkäfigen (Typ IV) bei einer Raumtemperatur von $23\pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchte von 50% und einem künstlichen Beleuchtungsschema (7:00-19:00Uhr hell, 19:00-7:00 dunkel) gehalten. Nach Erreichen des Gewichtes von ca. 110g wurden die Tiere bei ansonst gleichen Haltungsbedingungen geschlechtergetrennt umgruppiert und in Käfigen des Typ III zu je ca. 5 Tieren untergebracht. Als Futter verwendete man Rattenzuchtfutter der Firma Altromin, von der auch die verwendete Einstreu stammte. Futter wie Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Die Tierversuche wurden vor Versuchsbeginn per Antrag beim RP Hessen genehmigt (Projektnummern GI 18/2 Nr. 59/2003 und GI 18/2 Nr. 15/2007).

1.1.2. Mäuse

Die in einer Teilstudie verwendeten TLR2-knock-out(KO)-Mäuse wurden uns von Herrn Dr. Carsten Kirschning (Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München) zur Verfügung gestellt. Die C57/BL6-Kontroll-Mäuse wurden teils von der Professur für Tierschutz und Ethologie der Justus-

Liebig-Universität Giessen zur Verfügung gestellt und teils bei Charles River Laboratories bezogen. Für den Versuch wurden männliche und weibliche Tiere mit einem Gewicht von 20-30 g verwendet. Zur Unterbringung verwendete man transparente Polycarbonatkäfige (Typ IV), welche mit Einstreu der Firma Altromin versehen waren. Futter (Aufzuchtsfutter der Firma Altromin) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Auch bei diesen Tieren wurde ein künstliches Beleuchtungsprotokoll (7:00-19:00Uhr hell, 19:00-7:00 dunkel) gefahren. Die relative Luftfeuchte lag bei 50% und die Umgebungstemperatur bei $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Die Tierversuche wurden vor Versuchsbeginn per Antrag beim RP Hessen genehmigt (Projektnummer GI 18/2 Nr.15/2007).

1.1.3. Klimakammer

Für die telemetrischen Untersuchungen wurden die Tiere nach der Implantation der Sender (siehe **Abbildung 9**) in temperaturkonstante mit einer steuerbaren Beleuchtung ausgestattete Räume verbracht. Bei den Ratten handelte es sich um einen Raum mit telemetrischer Anlage, die aus den Empfängerplatten und dem zugehörigen Computer bestand. Die Temperatur wurde hier auf 25°C eingestellt. Das Beleuchtungsschema wurde nach einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden gefahren, wobei das Licht morgens um 7 Uhr angestellt wurde und um 19 Uhr erlosch.

Bei den Mäuseversuchen fanden sämtliche telemetrische Versuche in einer Klimakammer des Typs 10'US/+5 to +40 DU der Fa. Weiss Umwelttechnik, D-Reiskirchen-Lindenstruth, statt. Diese maß 2,15x 2,15x 2,65 m (Länge x Breite x Höhe) und bot Platz für sechs Versuchstiere. Die Temperatur wurde auf 30° Celsius eingestellt, die Luftfeuchtigkeit auf 50%. Auch in der Klimakammer wurde ein Tag/ Nacht- Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingestellt, der Tagrhythmus begann auch hier um 7 Uhr morgens. Damit die Mäuse sich an diese Bedingungen gewöhnen konnten, insbesondere an den Hell/ Dunkel- Zyklus mit den dadurch bedingten Schwankungen der Körpertemperatur und um ihnen die Rekonvaleszenz nach der Operation zu ermöglichen, wurden sie direkt nach der Implantation der Sender in die Klimakammer gesetzt und sechs bis sieben Tage nicht weiter gestört. Um den stressinduzierten Temperatur- und Aktivitätsanstieg während des Experiments so gering wie möglich zu halten, wurden die Tiere lediglich an das Wiegen und Füttern gewöhnt.

1.2. Verwendete Geräte

Aqua bidest Anlage Milli-Q Plus (Millipore, D-Eschborn)

Autoklav Systec 2540 EL (Systec, D-Wettenberg)

Brutschrank NuairTM Us-Autoflow (Nuair, Plymouth, MN, USA)

Eismaschine Icematic F120 (CastelMAC S.p.A. Castelfranco Veneto, Italien)

Elisa Reader Digiscan (Asys Hitech, A-Eugendorf)

Gefrier-Microtom 1205 (Jung, D-Heidelberg)

Hämozytometer nach Thoma (H. Kretschmer, D-Gießen)

Heißluftsterilisator ED 115/E2 (Binder GmbH, D-Tuttlingen)

Klimakammer 10`US/+5 to +40 DU (Fa. Weiss Umwelttechnik, D-Reiskirchen-Lindenstruth)

Lamina Herasafe (Kendro Laboratory Product GmbH, D-Hanau)

Lötkolben LS Digi 60 W (Conrad Electronic SE, D-Hirschau)

Perfusionsanlage (W.G. Kerkhoff Institut, D-Bad-Nauheim)

Pipetten (in verschiedenen Größen: 100, 500, 200, 100, 100-1000, 10-1000, 2-10, 0,5-2 µl) (Eppendorf AG, D-Hamburg)

Telemetrieanlage zur stressfreien Aufzeichnung von Körpertemperatur und motorischer Aktivität bei Kleinsäugetern (Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA)

Tischrühr- und Heizgerät PCT Basic (IKA Labortechnik, D-Staufen)

Tischzentrifuge MicroV (Fisher Scientific, D- Schwerte)

Schermaschine Typ GH 004 (Aesculap, D-Tuttlingen)

Schüttler Rotomix Type 50800 (Barstead International, Dubuque, Iowa, USA)

Waage zum Abwiegen der Trockensubstanzen: Mettler P1210N (Mettler Toledo, D-Gießen)

Waage zum Abwiegen der Ratten: Satorius universal (Satorius AG, D-Göttingen)

Wärmematte für OP's (MarMed GmbH, D-Clöbe)

Ultraschall-Wasserbad, Bandelin Sonorex RK 100 (H. Kretschmer, D-Gießen)

1.3. Ge- und Verbrauchsmaterial

1.3.1. Medikamente

Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®, Pfizer GmbH, D-Karlsruhe)
Heparin-Natrium 25000 ratiopharm® (ratiopharm GmbH, D- Ulm)
Meloxicam (Metacam®-Suspension zum Eingeben, Boehringer Ingelheim
Vetmedica GmbH, D- Ingelheim-Rhein)
Medetomidin (Cepetor®KH, cp-pharma GmbH, D-Burgdorf)
Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 10%, Phamacia Upjohn, D-Ulm)
Lidocainhydrochlorid (Xylocain® 2%, AstraZeneca GmbH, D-Wedel)
Pentobarbital (Nacoren®, Merial GmbH, D-Hallbergmoos)
Vidrisic®-Augengel (Dr. Mann Pharma, D-Berlin)

1.3.2. OP und OP-Vorbereitung

Cutasept® Händedesinfektionsmittel (Bode Chemie, D-Hamburg)
Nahtmaterial, resorbierbar: Surgicryl, USP 3/0, EP 2 (SIM AG,
B-Hünningen)
Operationsbesteck (Aesculap AG&Co.KG, D-Tuttlingen)
Silkafix® 2,5cm×9,2m (Lohmann Rauscher International GmbH&Co.KG, D-
Regensburg)
Sterile Einmalspritzen, 1ml BD Plastipak® (Becton Dickinson S.A.,
ES-Madrid)
Sterile Einmalkanülen 0,45×12mm, 26G×½“ Sterican® (Braun Melsungen
Ag, D-Melsungen)
Skalpelloklingen (Rüttgers GmbH&Co.KG, D-Solingen)
Veet Enthaarungscreme (Reckitt Benckiser, D-Mannheim)
Zellstoff ungebleicht 40×60cm (ZVG Zellstoff Vertriebs GmbH,
D-Troisdorf)
Zellstofftupfer Pur-Zellin® (Paul Hartmann, AG, D-Heidenheim)

1.3.3. Intraperitoneale Sender

1.3.3.1. Rattensender

Um die Abdominaltemperatur sowie die lokomotorische Aktivität kontinuierlich und stressfrei messen zu können, wurde den Versuchstieren ein Sender zur telemetrischen Erfassung intraperitoneal implantiert.

Bei den Ratten handelte es sich hierbei um einen zylinderförmigen, 23×8 mm großen Transmitter (T-4000 E-Mitter® der Firma Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA), welcher ein Volumen von 1,33 cm³ einnahm. Die Energieversorgung der batterielosen Sender wurde mittels Induktion durch eine Kupferspirale gewährleistet. Die Temperaturerfassung erfolgte über einen wärmeempfindlichen Transistor mit negativem Temperaturkoeffizienten (NTC), welcher ein Radiofrequenzsignal (in Herz (Hz)) proportional zur Temperaturänderung verstellte. Die Impulsrate stieg bei Temperaturerhöhung und sank bei deren Erniedrigung. Die Stärke des Impulses ließ wiederum Rückschlüsse auf die Bewegung der Tiere zu, da sich diese bei Bewegung änderte. Die Signale wurden von unter den Käfig positionierten Empfängerplatten (ER-4000 Receiver, Respironics Inc-MiniMitter, Bend. Or, USA), mit den Maßen 56×29×7 cm, registriert und an ein System zur Datenübertragung (VitalView, Respironics Inc-MiniMitter, Bend. Or, USA) übermittelt, welches die Ergebnisse aufzeichnete.

1.3.3.2. Mäusesender

Bei den Versuchsmäusen wurde eine andere Transmitterart der Firma MiniMitter Company Inc. (Sunriver OR, USA) verwendet. Die **XM-FH** Sender bezogen ihre Energie nicht über Induktion, sondern enthielten hierzu eine Knopfzelle. Sie bestanden aus der Messelektronik, die von zwei Polyethylenzylindern umschlossen wurden. Um die Elektronik vor eindringender Feuchtigkeit zu schützen, wurden die so vorpräparierten Zylinder in flüssiges Paraffin getaucht, welches nach Erstarren einen sicheren Schutz vor Peritonealflüssigkeit bot und zu einer Reduktion der Anhaftung von Fibrin führte. Das Paraffin musste hierzu vorher in einem Wärmeschrank auf 70°C erwärmt und verflüssigt werden. Bei dieser Art von Sender war eine Eichung nach jedem Batterienwechsel notwendig, welche in einem temperaturüberwachten Wasserbad bei 37±0,1°C und 41±0,1°C durchgeführt wurde. Die ermittelten Sendefrequenzen wurde über eine Empfängerplatte, die über dem Wasserbad lag, an einen angeschlossenen PC übermittelt und durch das Programm Dataquest IV erfasst und dokumentiert.

Die Temperaturmessung erfolgte über einen Thermistor, d. h. einen wärmeabhängigen Widerstand, mit negativem Temperaturkoeffizienten. Dieser kontrollierte einen Oszillatorstromkreis, dessen Frequenz F der vom Thermistor gemessenen Temperatur T entsprach. F war eine nicht lineare Funktion von T , sie betrug etwa 400 Hz bei 37° C. Der Graph $F(T)$ vs. T war exponentiell, der Logarithmus der Frequenz hatte eine lineare Beziehung zur Temperatur ($\ln(F) = \beta + \alpha T$), d. h. eine ansteigende Temperatur äußerte sich in einer ansteigenden Impulsrate und umgekehrt. Es wurden zwei Referenzwerte der Frequenzen für 37 und 41° C für jeden Sender individuell angegeben, aus welchen die Temperaturen für alle übrigen Frequenzen mittels eines Algorithmus umgesetzt werden konnten. Der Transmitter diente gleichzeitig der Messung der Bewegungsaktivität, dazu diente ein eingebautes Trägheitselement. Das von ihm produzierte Signal variierte in der Stärke abhängig von der Entfernung und Ausrichtung des Trägheitselementes zum Empfänger. Deshalb konnten Bewegungsänderungen des Tieres als Signaländerungen von der Empfängerplatte (RA-1000), welche sich unter dem Käfig befand, registriert werden. Diese Veränderungen wurden genutzt, um die Aktivität des Tieres als Index „activity counts“ im Versuchsprotokoll festzuhalten. Die Empfängerplatte entsprach mit ihren Maßen von 30x 22,5x 3 cm der Grundfläche des Käfigs. An den PC wurden die Signale über einen DP- 24 Dataport weitergeleitet, welcher als Analog- Digital- Wandler den aktuellen Temperaturwert in die Spannungsgröße (Volt) übertrug und über einen Verstärker weiterleitete. Über solche Dataports (Dietscan) gelangten auch die Daten aus den kontinuierlich messenden Waagen zur Futter- und Wasseraufnahme an den PC, wo sie in 5 Minuten Intervallen aufgezeichnet wurden.

1.3.4. Bioassay

Spatel (Roth, D-Karlsruhe)

Gewebskulturflaschen, steril mit Filter: 50 ml, 75 ml, 250 ml, 550 ml

(Greiner Bio-One GmbH, A-Kremsmünster)

Gewebskulturplatte, steril, mit Abdeckplatte, 96K (Greiner Bio-One GmbH, A-Kremsmünster)

PS-Röhrchen, steril: (Greiner Bio-One GmbH, A-Kremsmünster)

Serologische Pipetten, steril: 2ml, 5 ml, 10 ml (Sarstedt AG&Co, D-Nümbrecht)

1.3.5. Immunhistochemie

Deckgläschen 24×60mm Stärke 1 (Menzel GmbH, D-Braunschweig)

Faltenfilter ø 240mm (Schleicher&Schnell GmbH, D-Dassel)

Färbetrog 9,5×8×5 cm (Brand GmbH & Co.KG, D-Wertheim)

Glasgefäß Durchmesser 16 cm mit Polycarbonateinsätzen (W.G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim)

Labortücher Kimtech Science (Kimberly-Clark Europe Limited, GB-Reigate)

Nitril-Einmalhandschuhe (Roth GmbH&Co., D-Karlsruhe)

Objektträger 76×26 mm (im Institut gelatinebeschichtet) (Menzel GmbH, D-Braunschweig)

Petrischalen (Glas) 11 cm (MAGV, D-Rabenau)

pH-Indikatorpapier (Merck, D-Darmstadt)

Pinsel (Rotmarderhaar)

Pinzetten (H. Hauptner und R. Herberholz GmbH & Co.KG, D-Solingen)

Pipettenspitzen (in verschiedenen Größen :10,100, 1000, Greiner Bio-One GmbH, A-Kreuzmünster)

Röhrchen steril 15 ml und 50 ml (Sarstedt GmbH, D-Nümbrecht)

Reaktionsröhrchen 5 ml (Sarstedt GmbH, D-Nümbrecht)

Serologische Pipetten 1, 5 und 10 ml (Sarstedt GmbH, D-Nümbrecht)

1.3.6. Verwendete Substanzen für die in vivo- Versuche

- PBS

Bei PBS handelt es sich um sterile „Phosphate Buffered Saline“ (PAA, D-Clöbe), welche während der Versuche zum Auffüllen der Injektionslösungen von LPS und FSL-1 auf ein einheitliches Volumen von 1 ml verwendet wurde. In der Lösung liegt ein pH von 7-7,5 und eine Osmolalität von 240-340 mOsmol/kg vor. Sie enthält KCl 0,2, KH₂PO₄ 0,2, NaCl 8 und Na₂HPO₄ 1,15g/l.

- FSL-1

Das Fibroblasten stimulierende Lipopeptid-1 (C₈₄H₁₄₀N₁₄O₁₈S) (siehe Abbildung 3) ist synthetisch hergestellt und wurde für die Versuche von der Firma EMC microcollections GmbH, D-Tübingen bezogen. Das als farbloses Pulver vorliegende FSL-1 wurde in einer Stocklösung von 1mg/ml in PBS angesetzt und den Tieren in einer Dosierung von 100 µg/kg

(Ratten) bzw. 1000µg/kg (Mäuse) intraperitoneal verabreicht. Vor den Injektionen wurden die Aliquote für ca. 5 min in ein Ultraschallbad verbracht, um eine optimale Lösung der Substanz gewährleisten zu können. Die Lagerung der Aliquote wurde bei -20°C vorgenommen.

FSL-1 entspricht der N-terminalen Sequenz des 44-kDa Lipoproteins LP44 von *Mycoplasma salivarium* (Nakamura *et al.*, 2002) und lag als Racemat der RS- und RR-Stereoisomere vor.

- MALP-2

Das Macrophagen aktivierende Lipopeptid 2, welches in den Versuchen verwendet wurde, stellte uns Herr Prof. Dr. P.F. Mühlradt (Biotec-Gründerzentrum, D-Braunschweig) zur Verfügung. Von dem in kristalliner Form vorliegenden MALP-2 wurde je 1mg in 1 ml Cremophor EL (BASF AG, D-Ludwigshafen) und 1 ml Dulbecco's PBS (PAA, D- Cölbe) gelöst und daraufhin mit weiteren 8 ml PBS verdünnt, so dass eine Konzentration von 100µg/ml vorlag. Um eine bessere Lösung des MALP-2 zu gewährleisten, wurde die Lösung vor dem Aliquotieren für einige Minuten in ein Ultraschallbad verbracht. Die Aliquote wurden bei -20°C aufbewahrt.

MALP-2 ist ein 2 kDa schweres Lipopeptid, welches in *Mycoplasma fermentans* sowie *Mycoplasma hyorhinitis* vorkommt. Natürlicherweise liegt ein R-Stereoisomer vor. Die synthetisch hergestellte Variante stellt sich allerdings als S-Stereoisomer dar. Das Lipopeptid enthält zwei Fettsäureketten, die durch Esterbindungen an Glycerol-Lysin gebunden sind (Abbildung 2).

- LPS

Als LPS bezeichnet man Lipopolysaccharide, welche in den Zellwänden gramnegativer Bakterien vorkommen. Das hier verwendete LPS wurde von der Firma Sigma (USA-St.Louis, Mo.) bezogen und entstammt E.coli-Bakterien vom Serotyp O111:4B. Das als Pulver vorliegende Material wurde mit 0,9%iger NaCl in einer Konzentration von 1mg/ml gelöst und darauf folgend ebenfalls mit NaCl auf 100µg/ml verdünnt. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -20°C.

LPS besteht aus mehreren strukturellen Anteilen, neben einem Polysaccharidanteil und einer O-spezifische Seitenkette, gibt es noch das Lipid-A. Dieses ist für die pyrogene Wirkung verantwortlich und verankert das LPS in der äußeren Membran der Bakterien (Abbildung 1).

1.3.7. Verwendete Substanzen für den IL-6 Bioassay und das Passagieren der B9-Zelllinie

Tabelle 2

Reagenzien	Zusammensetzung	Hersteller
Wachstumsmedium	45ml RMPI Medium 3,8 ml FCS (Fetales Kälberserum) 0,5 ml Glutamin [0,5 ml hr IL-6 (500IU/ml)] 125 µl Mercaptoethanol 65µl Gentamycin	IL-6: National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potter Bar, UK alles andere: Life Technologies, GB- Paisley
Assay Medium	45 ml RMPI Medium 4 ml FCS (Fetales Kälberserum) 0,5ml Glutamin 125 µl Mercaptoethanol 65 µl Gentamycin	Life Technologies, GB- Paisley
IL-6 Standard	500µl IL-6 [500IU/ml]	Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), GB- Potters Bar
Qualitätskontrollen	QK 1: 500µl IL-6 [10 IU/ml] QK 2: 500µl IL-6 [30 IU/ml]	
MTT (3[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)- Lösung	0,1 g MTT in 20 ml PBS	Sigma Chemicals, St.Louis, MO, USA
Isopropanol/HCL-Lösung	4 ml 2N HCl 196 ml Isopropanol	Merck, D-Darmstadt

1.3.8. B9-Zelllinie

Die B9-Zelllinie wurde 1986 von Lansdrop et al. (Lansdrop, 1986) entwickelt. Um diese zu gewinnen, wurde Balb/c-Mäusen Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentacane) intraperitoneal injiziert und anschließend Milzzellen dieser Tiere entnommen. Folgend wurden die Zellen mit Hybridplasmozytomzellen (Sp2/0Ag14) fusioniert, woraufhin die Hybridoma-Zelllinie B 13.29 entstand. Von dieser Linie wurde der Subklon B9 hergestellt, welcher auch hier im IL-6-Assay Verwendung fand. Die Sensivität dieser Zellen auf IL-6 ist so groß, dass schon die produzierte IL-6-Menge eines stimulierten Monozyten ausreicht, um gemessen werden zu können (Aarden et al. 1987).

1.3.9. Verwendete Substanzen für den TNF Bioassay und das Passagieren der WEHI-Zelllinie

Tabelle 3

Reagenzien	Zusammensetzung	Hersteller
Assay-Medium	500 ml RMPI Medium 55 ml FCS (Fetales Kälberserum) 5 ml Penicillin-Streptomycin 5 ml Glutamin	Rothwell Park Memorial Institute Medium 1640, Fa. Life Technologies, GB-Paisley
TNF-Standard	50 µl TNF [100pg/ml]	Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), GB-Potters Bar
Qualitätskontrolle	QK 1: 500 µl TNF [10pg/ml] QK 2: 500µl TNF [25pg/ml]	
MTT (3[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Lösung	0,1 g MTT in 20 ml PBS	Sigma Chemicals, St.Louis, MO, USA
Actinomycin D (Zytostatikum)	Stocklösung 1 mg/ml	Sigma Aldrich, D-Steinheim
Isopropanol/HCL-Lösung	4 ml 2N HCl 196 ml Isopropanol	Merck, D-Darmstadt

1.3.10. WEHI-Zellen

Zur TNF-Bestimmung wurden WEHI-Zellen verwendet. Diese wurden im **Walter Elisabeth Hall Institut** entwickelt, was auch zur Namensgebung führte. Es handelt sich um eine murine Fibrosarkom-Zelllinie des Typs 164 Subklon 13, welche in der American Tissue Culture Collection unter der Bezeichnung CRL 1751 geführt wird. Hier wurde BALB/c-Mäusen kanzerogenes Methylcholanthren subkutan injiziert, was zu Fibrosarkombildung führte. Die verwendeten Subklone reagieren mit Zelltod auf TNF- α (Espevik & Nissen-Meyer, 1986).

1.3.11. Verwendete Substanzen für den PGE₂-ELISA

Tabelle 4

Reagenzien	Zusammensetzung	Hersteller
PGE ₂ HS-EIA Konjugat	PGE ₂ mit alkalischer Phosphatase konjugiert, Konservierungsmittel, blauer Farbstoff	High Sensitivity Prostaglandin E ₂ Immunoassay Kit Assay Designs, USA- Ann Arbor
PGE ₂ Standard	50.000pg/ml PGE ₂	
PGE ₂ HS-EIA Antikörper	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen PGE ₂ , gelber Farbstoff	
Assaypuffer	Puffer mit Proteinen und Natriumazid als Konservierungsmittel	
Waschpuffer	10-fach konzentrierter Puffer mit Detergenz	
pNPP Substrat	p-Nitrophenylphosphat in Puffer	
Stop Lösung	Trinatriumphosphat in Wasser	

1.3.12. Verwendete Substanzen und Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 5

Reagenz	Hersteller
Erstantikörper anti-STAT3: Rabbit polyclonal IgG sc-482	Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg
Zweitantikörper anti-rabbit: Biotinylierter goat IgG BA-1000	Vector, Linaris Biolog. Produkte, D- Wertheim
PBS	Eigene Herstellung
Normal Horse Serum B-15-122	PAA Laboratories GmbH, A-Pasching
Triton X-100, T-9284	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
Blockungspulver NEL 700	NEN Life Science Products, D-Köln
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase	Vector, Linaris Biolog. Produkte, D- Wertheim
Biotinyliertes Tyramin	Vector, Linaris Biolog. Produkte, D- Wertheim
ABC-Komplex Vectastain-ABC-Elite-Kit Standard, PK-6100	Vector, Linaris Biolog. Produkte, D- Wertheim
3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, D-Darmstadt
Ethanol	Schmidt, D-Dillenburg
Kresylviolett	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
Histoclear	Ward's Natural Science, Rochester, USA
Entellan	Merck, D-Darmstadt

Des weiteren wurden für die Perfusion 0,9%ige NaCl, 4%iges Paraformaldehyd (PFA), 20%ige Saccharoselösung und für die Waschschritte der Immunhistochemie Phosphatpuffer benötigt. Die Lösungen wurden selbst hergestellt und die Trockensubstanzen von der Firma Merck (D-Darmstadt) bezogen. Im Einzelnen wurden 9 g NaCl abgewogen und in einem Liter bidestiliertem Wasser in Lösung gebracht. Das PFA wurde unter dem Abzug hergestellt, indem 40 g Trockensubstanz in einem Liter Phosphatpuffer bei 60 °C gelöst, filtriert und dann in einem Eisbad herunter gekühlt wurden. Bei der Saccharoselösung wurden 30 g Saccharose in 150 ml bidestiliertem Wasser gelöst.

Zum Herstellen des Phosphatpuffers mussten vorab zwei Stocklösungen angesetzt werden. Für die Stocklösung A (0,2M) benötigte man 35,6 g Natriumdihydrogensulfat-

Monohydrat (Na_2HPO_4) (177,99 g/Mol), welches in einem Liter Aqua bidest. gelöst wurde. Die Stocklösung B (0,2M) bestand aus 27,6 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (NaH_2PO_4) (137,99 g/Mol) und einem Liter Aqua bidest. Um fünf Liter des gebrauchsfertigen Puffers herzustellen, wurden nun 700 ml von Stock A mit 1200 ml von Stock B vermischt und mit 3100 ml Aqua bidest. aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier überprüft und lag zwischen 7,2-7,4.

1.3.13. Verwendete Computerprogramme

Adobe Photoshop Version 5.5 (Adobe Systems GmbH, D-Unterschleißheim)

EndNote 6.0.2 (Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, Ca, USA)

Metamorph, Version 5.05 (Diagnostics Instruments-Visitron Systems, D-Puchheim)

Sigma Plot, Version 8.0 (Jandel Scientific, Core-Madera, CA, USA)

Stat View® (Abacus Concepts, Berkley, CA, USA)

VitalView Data Acquisition System Version 3.1 (Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA)

Windows Microsoft Excel, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)

Windows Microsoft Word, Version 6.0 (Microsoft Corporation, D-München)

2. Methoden

2.1. Blutdruckmessung bei den SH- und WKY-Ratten

Die Blutdruckmessung sowie die Erfassung der Herzfrequenz fanden nicht invasiv mittels TSE Blutdruck-Monitor (TSE GmbH, D-Bad Homburg) am nicht anästhesierten Tier im physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen (Prof.Dr.K.D.Schlüter) statt. Die Anlage bestand aus einer Druckmanschette mit integriertem, aufpumpbarem Innenring und optischen Pulssensor, einem röhrenartigen Fixationskäfig, einer Heizbox, einer Kontrolleinheit und der dazu gehörigen Software für den Computer. Die Pulsmessung erfolgte über einen hoch sensitiven, optischen Pulssensor, der die Lichtdurchlässigkeit des Gewebes an der Schwanzbasis maß. Die durch den Blutdruck veränderten, unterschiedlichen Durchmesser der Arterien führten zu unterschiedlicher Lichtdurchlässigkeit des Gewebes und somit unterschiedlichen Ergebnissen. Hierzu wurde mittels LED-Leuchte infrarotes Licht durch den zu messenden Bereich gegeben, welches auf der entgegengesetzten Seite vom Sensor gemessen und in elektrische Signale umgewandelt wurde. Die Messung erfolgte unter

Einsatz der Druckmanschette, indem der aufblasbare Innenring der Manschette durch den in der Kontrolleinheit erzeugten Druck verengt und somit die Durchblutung erschwert wurde, bis sie schlussendlich stoppte. Der dafür nötige, korrespondierende Druck wurde als systolischer Blutdruck festgehalten. Die Herzfrequenz wurde durch den gemessenen Puls errechnet.

Für den Versuchsansatz wurden je 8 SH- und WKY-Ratten herangezogen. Die Ratten wurden in die Fixationsröhre geschoben, an deren hinteren Ende eine Aussparung war, durch die der Schwanz der Tiere nach außen gezogen wurde. Im Anschluss wurde die Manschette an der Basis des Schwanzes angebracht und die Ratten in die Wärmebox verbracht, wo die Messungen bei kontrollierten 37°C stattfanden. Dort wurde der Schwanz zur weiteren Fixierung im hinteren Ende an der Unterlage befestigt. Eine Wärmebox war nötig, um eine Kälte-bedingte Vasokonstriktion zu vermeiden und somit eine falsch erhöhte Blutdruckmessung ausschließen zu können. Vor den eigentlichen Messungen wurde diese Prozedur an mehreren Tagen wiederholt und Probemessungen durchgeführt, um die Tiere an den Ablauf zu gewöhnen und Stress bedingte Blutdruckschwankungen zu vermeiden. Nach der Eingewöhnungszeit wurden dann 5 Messungen pro Versuchstier durchgeführt, aus denen man Mittelwert sowie Standardfehler ermittelte. Der Blutdruck wurde in mmHg angegeben.

2.2. Operation

2.2.1. Narkose

2.2.1.1. Narkose der Ratten

Vor Narkoseeinleitung wurde den Tieren das Analgetikum Meloxicam in einer Dosierung von 0,15 mg/kg per os verabreicht. Anschließend wurden 0,25-0,5 mg/kg Medetomidin und 60,0-75,0 mg/kg Ketamin als Mischspritze intraperitoneal injiziert, wodurch eine kurzzeitige Anästhesie und Analgesie erreicht wurde.

Nach erfolgter Operation wurde den Ratten als Teilantagonisierung der Narkose Atipamezol in einer Dosierung von 1,0 mg/kg intramuskulär injiziert, welches die sedative Wirkung des Medetomidin aufhob. Die Aufwachphase wurde somit auf ca. eine viertel Stunde verkürzt.

2.2.1.2. Narkose der Mäuse

Bei den Mäusen erfolgte, wie auch bei den Ratten, eine Prämedikation mit Meloxicam in einer Dosierung von 0,15 mg/kg. Es wurde oral verabreicht. Die Narkosemedikation wurde mittels Ketamin und Xylazin vorgenommen. Hierzu wurde 1 ml von 10%igem Ketamin mit 0,25 ml Xylazin (2%) vermischt und mit 5 ml steriler Kochsalzlösung verdünnt. Mäuse mit einem Operationsgewicht von 25-30 g erhielten 250µl der vorgemischten Lösung.

Die gebrauchsfertige Mischlösung konnte für 4 Wochen im Kühlschrank gelagert und verwendet werden.

2.2.2. Implantation des Senders

Das Operationsfeld der Ratten wurde in einem Bereich von 3 cm cranial und 3 cm caudal des Nabels mit einer Breite von ca. 4 cm geschoren und anschließend mit Enthaarungscreme behandelt. Um möglichst keimarme Bedingungen zu schaffen, desinfizierte man die haarfreie Zone noch drei mal mit Cutasept®-Lösung, welches man je ca. 1 Minute einwirken ließ. Die Inzision der Haut erfolgte vom Umbilicus beginnend ca. 1 cm nach caudal. Folgend wurde das Unterhautgewebe mittels Schere stumpf von der Bauchmuskulatur gelöst, um danach die Bauchhöhle entlang der Linea alba zu eröffnen. Hierzu wurde die Muskulatur mit einer chirurgischen Pinzette gefasst, nach oben gezogen und mit einer Skalpellklinge eine kleine Inzision in der Linea alba vorgenommen. Diese wurde anschließend unter Schutz einer eingeführten Pinzette mit einer Schere vergrößert, bis der einzubringende Sender durch die Öffnung passte. Nach dem Einlegen des Senders wurde die Wunde in zwei Schichten vernäht, die Muskulatur fortlaufend, die Haut aus Sicherheitsgründen mit Einzelheften. Als Faden wurde ein resorbierbarer Surgicryl USP 3/0 verwendet.

Bei den Mäusen wurde der operative Eingriff, der Größe angepasst, auf die gleiche Art und Weise vorgenommen.

Die Operation der Tiere wurde ca. eine Woche vor geplantem Versuchsbeginn vorgenommen, so dass die Tiere genügend Zeit hatten sich von dem operativen Eingriff zu erholen und sich an die neue Umgebung adaptieren konnten.

2.2.3. Telemetrische Aufzeichnung der Körpertemperatur und der Aktivität

Um die Körpertemperatur wie auch die Aktivität erfassen zu können, wurde eine telemetrische Anlage verwendet. Hierzu wurden die Tiere in Käfigen auf Empfängerplatten positioniert, welche die Daten der Sender im 5-min-Rhythmus empfangen. Die Daten wurden an einen Computer übermittelt und mit dem zugehörigen Computerprogramm VitalView® aufgezeichnet. Im Raum der Telemetrie wurde ein künstliches Beleuchtungsschema im 12 Stunden Intervall gefahren, indem das Licht morgens um 7 Uhr angeschaltet und abends um 19 Uhr gelöscht wurde. Die Umgebungstemperatur lag bei den Ratten bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ und bei den Mäusen bei $30\pm 1^\circ\text{C}$ entsprechend den unterschiedlichen Thermoneutraltemperaturen der beiden Spezies. Das Computerprogramm wurde bereits einige Tage vor Versuchsbeginn gestartet, um die Funktion der Sender zu überprüfen und den Genesungsverlauf der Tiere zu kontrollieren. Die relevanten Datenaufzeichnungen begannen um 7 Uhr am Injektionstag, um Basalwerte vor der jeweiligen Manipulation erhalten zu können. Die Injektionen erfolgten gegen 9 Uhr nach dem Wiegen des Tieres mit einer Dosierungen von $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (LPS), bzw. $1000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (MALP-2, FSL-1) der eingesetzten Pyrogene intraperitoneal, wobei die zugegebene Menge auf zwei Gaben links und rechts der Medianen verteilt wurde, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung innerhalb der Bauchhöhle zu erreichen. Vor den Injektionen wurden Cremophor, MALP-2 und FSL-1 für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gelegt, damit eine vollständige Lösung der Inhaltsstoffe gewährleistet war. Damit eine bessere Verteilung der Reagenzien intraperitoneal erreicht wurde und zudem ausgeschlossen werden konnte, dass die Reaktionen der Tiere mit dem Injektionsvolumen in Zusammenhang stehen, wurden FSL-1 und LPS mit PBS bzw. MALP-2 mit Cremophor auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Gewicht und Injektionszeitpunkt wurden festgehalten, um eine spätere Auswertung zu ermöglichen. Der Versuch lief über zwei volle Tage und endete somit um 9 Uhr morgens des dritten Versuchstages. Während dieser Zeit wurden die Körpertemperatur sowie die Aktivität durch den Computer aufgezeichnet. Das Gewicht der Ratten wurde jeden morgen um 9 Uhr per manuellem Wiegen der Tiere ermittelt.

Neben den Aktivitäts- und Temperaturdaten der Ratten wurden auch der Futter- und Wasserverbrauch während der Versuchstage gemessen. Hierzu begann man am Tag vor der Injektion um 9 Uhr das Futter und die Trinkflaschen manuell zu wiegen und fuhr damit bis zum Versuchsende fort. Aus der Differenz konnte dann der tägliche Verbrauch ermittelt werden.

Nach Beendigung der telemetrischen Untersuchung und einer mindestens zweiwöchigen Erholungsphase wurden die Tiere zur Blutprobengewinnung oder für immunhistochemische Untersuchungen herangezogen, um die Versuchstierzahl möglichst gering zu halten.

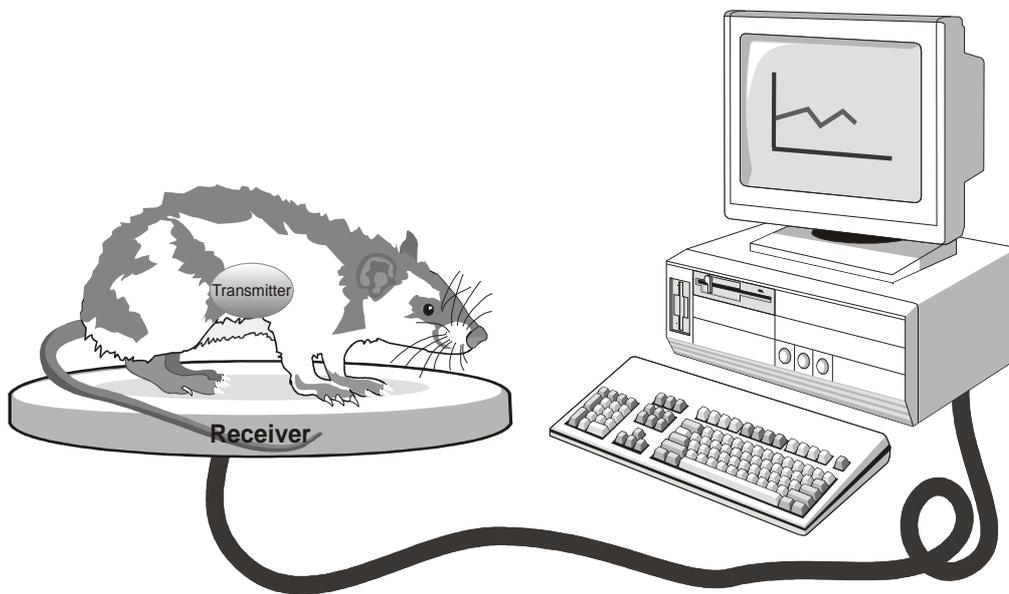


Abbildung 9: schematische Darstellung der telemetrischen Datenaufzeichnung

2.2.4. Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben

Um die benötigten Blutproben zu gewinnen, wurde den Tieren 60, 120 bzw. 180 Minuten vor der Euthanasie die zu untersuchende Substanz intraperitoneal injiziert. Vor der Blutentnahme wurden 1 ml-Spritzen mit einer 23- G-Kanüle versehen und der Konus dieser mit Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm) gefüllt, um ein anschließendes Gerinnen der Blutprobe zu vermeiden. Zur Tötung wurde den Ratten 160-430 mg/kg Narcoren intraperitoneal verabreicht. Sobald keine Reflexe mehr vorhanden waren, wurde der Brustkorb eröffnet, um direkt aus der linken Kammer des noch schlagenden Herzens ca. 1 ml Blut zu entnehmen.

Die gewonnenen Proben wurden daraufhin in einer Mikrozentrifuge bei 7,5 G 5 Minuten lang abzentrifugiert und das abpipettierte Plasma (ca. 500µl) in Eppendorfgefäße umgefüllt. Diese konnten dann bei -40° C bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt werden.

2.2.5. Plamaprobeanalyse

2.2.5.1. Nachweismethoden für Zytokine

Zur Quantifizierung von Zytokinen in biologischen Flüssigkeiten oder Geweben werden hauptsächlich zwei Methoden verwendet: ein immunologischer Nachweis von Zytokin-Proteinen mittels ELISA Techniken (Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay) oder zytokinspezifische Zellkultur-abhängige Bioassays.

Die verfügbaren ELISAs für Zytokine sind in der Handhabung sehr einfach und schnell. Bei ihnen werden speziesspezifische Antikörper eingesetzt. Allerdings hat diese Methode auch einige Nachteile, sie detektiert zum Beispiel nicht nur biologisch aktive Zytokine, sondern auch inaktive Anteile. Zudem sind Zytokine und somit auch die verwendeten Antikörper speziesspezifisch und aufgrund fehlender oder sehr geringer Kreuzreaktivität limitiert. Eine andere Möglichkeit der Quantifizierung von Zytokinen ist ihrer Eigenschaft zu verdanken, bei bestimmten Zellen biologische Reaktionen auszulösen. Mittels zytokinspezifischer Zellkultur-abhängiger Bioassays kann dieses biologisch aktive Material nachgewiesen werden, und zwar mit einer hohen Sensitivität. Sie ermöglichen die Messung eines gegebenen Zytokins bei unterschiedlichen Spezies.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Messung der Zytokine die im Institut für Veterinärphysiologie etablierten Bioassays eingesetzt.

2.2.5.2. IL-6 Bioassay

Um den Probengehalt an aktivem IL-6 zu ermitteln, wurde seine hochspezifische und dosisabhängige Wirkung auf die Hybridomazelllinie B9 genutzt. IL-6 wirkt auf B9-Zellen proliferativ (Aarden *et al.*, 1987) und ruft somit deren Zellzahlzunahme hervor. Auf Grund der Zellzahlzunahme können dann Rückschlüsse auf die Konzentration des in der Probe enthaltenen biologisch aktiven IL-6 gezogen werden. Das inaktive IL-6 wird bei der Messung nicht erfasst (Gearing *et al.*, 1994). Um die Komplexität des Versuches zu reduzieren, wurde die Zellzahl nicht mittels numerischer Zählung, sondern durch photometrischen Nachweis mitochondrialer Enzymaktivität ermittelt. Hierzu wurde der Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zugegeben (Abbildung 11), der in den Mitochondrien lebender Zellen zu dunkelblauen Formazankristallen umgesetzt wird und nach anschließender Zellyse mit Hilfe eines ELISA-Readers (Digiscan, Asys Hitech, A-Eugendorf) photometrisch nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 3 IU IL-6 pro ml Probe (Ross *et al.*, 2003).

Die Durchführung des Assays erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Reinbank (Lamina Herasafe, Kendro Laboratory Product GmbH, D- Hanau). Zu Beginn des Versuches mussten die B9-Zellen und ihre Zellsuspension von dem im Wachstumsmedium enthaltenen IL-6 befreit werden, um eine mögliche Verfälschung der Messergebnisse auszuschließen. Dazu wurden die Zellen passagiert und die übrige Zellsuspension bei 2300 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen mit Assay-Medium resuspendiert. Diesen Vorgang wiederholte man zweimal. Anschließend wurden 50µl der Suspension auszugsweise mit der Zählkammer nach Thoma ausgezählt, um den Verdünnungsfaktor für die Zellsuspension ermitteln zu können. Die Suspension sollte auf ca. 5000 Zellen/100µl eingestellt sein. Dies wurde unter zu Hilfenahme folgender Formel erreicht: Verdünnungsfaktor = Zellzahl / Kammerfaktor × ausgezählte Zellen.

Die nun gereinigte und verdünnte Zellsuspension wurde, nach dem in **Abbildung 10** gezeigten Schema, in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen überführt. Hierzu wurden als Qualitätskontrolle (QK) in A2 und B2 je 200 µl der QK 1 (enthält 10 IU/ml hrIL-6), sowie 200 µl der QK 2 (enthält 30 IU/ml hrIL-6) in A3 und B3 pipettiert. Als Standard (enthält 50IU/ml hrIL-6) wurden 200 µl in B1 pipettiert. A4 bis A8 sowie B4 bis B8 wurden mit Probenmaterial befüllt. Nachfolgend wurden Verdünnungsreihen des Standards, der Qualitätskontrollen und der Proben hergestellt, in dem man je 100 µl des Vorfeldes in das darauf folgende pipettierte und mit weiteren 100 µl des Assaymediums versetzte. Von diesem Gemisch wurden dann wieder 100 µl entnommen und in das folgende Feld gegeben. Auf diese Art und Weise wurden nun die folgenden Felder mit weiteren Verdünnungsschritten bestückt. Hieraus folgend entstanden bei der Standardlösung Verdünnungen von 1:2 bis 1:256. Das letzte Feld wurde hier nur mit Medium bestückt. Bei den Qualitätskontrollen wie auch bei den Plasmaproben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wodurch eine Endverdünnung von 1:16 zustande kam. Beim letzten Verdünnungsschritt wurden 100 µl der Suspension verworfen, so dass in allen Feldern das gleiche Volumen vorlag.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	B	50 IU	1:1 25 IU	1:2 12,5 IU	1:4 6,25 IU	1:8 3,13 IU	1:16 1,56 IU	1:32 0,78 IU	1:64 0,39 IU	1:128 0,19 IU	1:256 0,1 IU	1:512 Medium
2	QK1	QK1	1:1 A2	1:1 B2	1:2 C2	1:2 D2	1:4 E2	1:4 F2	1:8 G2	1:8 H2	1:16 I2	1:16 J2
3	QK2	QK2	1:1 A3	1:1 B3	1:2 C3	1:2 D3	1:4 E3	1:4 F3	1:8 G3	1:8 H3	1:16 I3	1:16 J3
4	Proben	Proben	1:1 A4	1:1 B4	1:2 C4	1:2 D4	1:4 E4	1:4 F4	1:8 G4	1:8 H4	1:16 I4	1:16 J4
5	Proben	Proben	1:1 A5	1:1 B5	1:2 C5	1:2 D5	1:4 E5	1:4 F5	1:8 G5	1:8 H5	1:16 I5	1:16 J5
6	Proben	Proben	1:1 A6	1:1 B6	1:2 C6	1:2 D6	1:4 E6	1:4 F6	1:8 G6	1:8 H6	1:16 I6	1:16 J6
7	Proben	Proben	1:1 A7	1:1 B7	1:2 C7	1:2 D7	1:4 E7	1:4 F7	1:8 G7	1:8 H7	1:16 I7	1:16 J7
8	Proben	Proben	1:1 A8	1:1 B8	1:2 C8	1:2 D8	1:4 E8	1:4 F8	1:8 G8	1:8 H8	1:16 I8	1:16 J8

Abbildung 10: Schematische Darstellung einer für einen IL-6-Assay beschickten Mikrotiterplatte und der zur Analyse verwendeten Verdünnungsreihe.

Die so präparierte Mikrotiterplatte wurde nun für 72 Stunden in einem Brutschrank inkubiert und anschließend jede Vertiefung mit je 25 µl MTT versehen. Nach weiteren 4 Stunden im Brutschrank wurde das gelbe MTT-Tetrazoliumsalz mittels dem in den Mitochondrien der Zellen vorkommenden Enzym, der Succinyl-Dehydrogenase, zu dunkelblauen MTT-Formazankristallen umgesetzt (Abbildung 11). Anschließend wurden nun pro Vertiefung je 125 µl des Überstandes vorsichtig abpipettiert, so dass die am Boden befindlichen Zellen möglichst dort verblieben. Nach weiterer Zugabe von 100 µl einer Isopropanol-HCl-Mischung wurden die Zellwände zerstört, so dass die gebildeten MTT-Formazankristalle freigesetzt und gelöst wurden. Nach weiteren 12 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde nun die optische Dichte der einzelnen Felder mit Hilfe des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

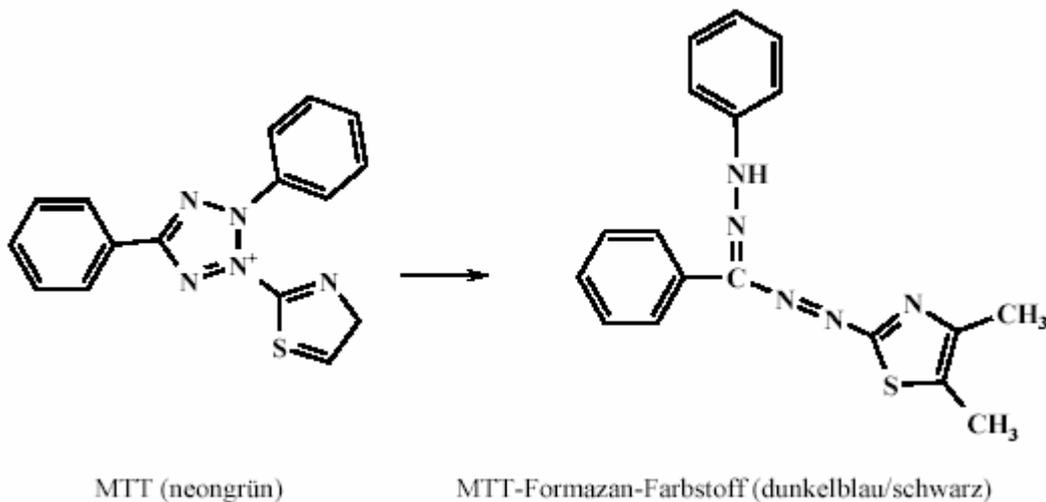


Abbildung 11: Strukturformeln von MTT-Tetrazolium und dem nach Umsetzung entstandenen Reaktionsprodukt MTT-Formazan.

2.2.5.3. TNF α -Bioassay

Auch bei der Bestimmung von TNF α wurde ein Bioassay herangezogen. Im Gegensatz zur IL-6-Bestimmung wurden die hier verwendeten WEHI-Zellen aber nicht durch Zytokineinwirkung zum Wachstum angeregt, sondern durch TNF α abgetötet. Auch in diesem Fall ist die spezifische Wirkung, hier eben die zytotoxische Wirkung des TNF α auf die WEHI-Zellen, dosisabhängig. Bei diesem Versuchsansatz liegt die Nachweisgrenze für biologisch aktiven TNF α bei 6 pg TNF α /ml (Ross *et al.*, 2003).

Das Vorgehen entsprach hier dem Versuchsablauf der IL-6-Messung (Abschnitt 2.1.5.2 IL-6 Bioassay) und kann dort entnommen werden. Als einzige Abweichung ist zu beachten, dass die Zellsuspension hier auf eine Dichte von 50000 WEHI-Zellen/100 μ l eingestellt und den fertigen Verdünnungsreihen noch je 4 μ l Aktinomycin D zugesetzt wurde. Das Aktinomycin D stoppte zum einen das weitere Zellwachstum und zum anderen wurde die Sensibilität der WEHI-Zellen gegenüber dem TNF α erhöht. Die Inkubationszeit lag bei diesem Assay bei 24 Stunden.

Auch hier wurde MTT als Nachweis lebender Zellen verwendet, nur dass hier die Menge an aktiven TNF α umso höher war, je weniger MTT-Formazan gebildet wurde. Die Bestimmung erfolgte ebenfalls mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550nm.

2.2.5.4. PGE₂-ELISA

Die quantitative PGE₂-Bestimmung wurde mit Hilfe eines indirekten Kompetitions-ELISA (Enzym Linked Immuno-Sorbent Assay) durchgeführt. Der für die Reaktion notwendige monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen PGE₂ gerichtet war, wurde durch einen weiteren Anti-Maus-Antikörper, der auf der Mikrotiterplatte des ELISA verankert war, am Untergrund fixiert, so dass er während der Waschschriffe nicht abgespült wurde. Neben der zu messenden Probe wurde ein Konjugat, welches ebenfalls enzymgekoppeltes PGE₂ enthielt, zugegeben. Das vorhandene PGE₂ der Probe musste somit mit dem des Konjugates um die Bindungsstellen an den Antikörpern konkurrieren. Das im Konjugat enthaltene PGE₂ war mit einem Enzym, der alkalischen Phosphatase, gekoppelt, welches einen zugesetzten Farbstoff umsetzte und zu einer Gelbfärbung der Probe führte. Je mehr probeneigenes PGE₂ enthalten war, desto weniger enzymgekoppeltes PGE₂ konnte an die Antikörper binden, was dazu führte, dass letzteres durch die Waschschriffe entfernt wurde und durch die daraus resultierende geringere Umsetzung des Farbstoffes zu einer geringeren Gelbfärbung führte. Die Gelbfärbung wurde mittels ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Die

Nachweisgrenze des hier verwendeten ELISAs lag bei 8,26 pg/ml. Des Weiteren war eine Kreuzreaktion von 70% mit PGE₁, 16,3% mit PGE₃ und 1,4% mit PGF_{1α} möglich.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Blank	Std 1	Std 5	P 1	P 5	P 9	P13	P17	P21	P25	P29	P33
2	Blank	Std 1	Std 5	P 1	P 5	P 9	P13	P17	P21	P25	P29	P33
3	TA	Std 2	Std 6	P 2	P 6	P10	P14	P18	P22	P26	P30	P34
4	TA	Std 2	Std 6	P 2	P 6	P10	P14	P18	P22	P26	P30	P34
5	NSB	Std 3	Std 7	P 3	P 7	P11	P15	P19	P23	P27	P31	P35
6	NSB	Std 3	Std 7	P 3	P7	P11	P15	P19	P23	P27	P31	P35
7	Bo	Std 4	Std 8	P 4	P 8	P12	P16	P20	P24	P28	P32	P36
8	Bo	Std 4	Std 8	P 4	P 8	P12	P16	P20	P24	P28	P32	P36

Abbildung 12: Schematische Darstellung des Beschickungsschemas der Mikrotiterplatte

Die schematische Darstellung der Beschickung der Mikrotiterplatte wird in **Abbildung 12** genauer dargestellt. Die Platte wurde in unterschiedliche Wells eingeteilt, welche nach einem vorgegebenen Schema befüllt wurden. Vor der ersten Inkubation wurde als erster Schritt in die Felder NSB und BO 150 bzw. 100 µl Assay-Puffer pipettiert. Im Folgenden wurde mit Hilfe der Standardlösung eine Eichreihe mit den Konzentrationen in absteigender Reihenfolge von 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 bis schussendlich 7,81 pg/ml hergestellt und davon je 100µl in die vorgesehenen Vertiefungen gegeben. Die Proben wurden 1:5 mit Assay-Puffer vorverdünnt und je 100µl in die zugewiesenen Felder pipettiert. Anschließend wurden 50 µl der blauen Konjugatslösung allen Wells zugegeben, sowie in die Felder von BO, denen des Standards und der Proben noch weitere 50 µl des Detektions-Antikörpers zupipettiert. Die Vertiefungen der Totalen Aktivität (TA) sowie die Leerwertfelder wurden im ersten Versuchsschritt nicht bearbeitet. Nun folgte eine Inkubation von 18-24 Stunden bei 4°C. Nach der Inkubationszeit wurden die Wells je 3 mal mit 400 µl Waschpuffer gereinigt, anschließend den TA-Feldern 5 µl Konjugat zugefügt und allen Wells 200 µl Substrat zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation von einer Stunde im Wärmeschrank bei 37°C. Schließlich wurde die Stopplösung zugegeben, um die Reaktion zum Stillstand zu bringen. Die photometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem ELISA-Reader.

Die „Blank“-Vertiefungen dienten als Nullwert. In den NSB-Vertiefungen wurden unspezifische Bindungen überprüft, da der Antikörper ausgespart wurde. Die Bo-Felder wurden zur Überprüfung der maximalen Bildung des Farbstoffes herangezogen, indem sich das PGE₂ aus dem Konjugat ohne Konkurrenz zu dem PGE₂ aus den Messproben an den Detektions-Antikörper binden konnte und zu vollen enzymatischen Umsetzung des Farbstoffs

führte. In den TA-Feldern (Total Activity) wurde ebenfalls die maximale Bildung des Farbstoffes überprüft. Hier fehlten allerdings im Gegensatz zu den BO-Feldern die kompletten Arbeitsschritte des ersten Versuchstages, somit konnten Beeinflussungen der Färbung aufgrund von nicht an der Farbreaktion beteiligten Lösungen ausgeschlossen werden.

2.2.6. Immunhistochemische Untersuchung der Gehirnschnitte

2.2.6.1. Perfusion

Die Tiere wurden 120 min post injectionem mit einer Überdosis Narcoren (0,1-0,25 ml/100 g Körpergewicht = 16-43 mg/100g) in eine tiefe Narkose gelegt, wobei die Narkosetiefe durch Kneifen der Tiere in den Zwischenzehenraum mit einer Pinzette überprüft wurde.

Die Perfusionsanlage bestand aus einem Pumpensystem, welches den nötigen Druck aufbaute und über Schläuche mit den abgedichteten Flaschen der Perfusionslösungen in Verbindung stand. Mittels eines Dreiwegehahns wurde der Fluss sowie die Art der Perfusionslösung in das Schlauchsystem reguliert. Des Weiteren wurde eine Wanne mit aufliegendem Gitter verwendet, um die Tiere zu fixieren und die austretende Perfusionslösung aufzufangen.

Nachdem die erwünschte Narkosetiefe erreicht war, wurden die Tiere in Rückenlage auf der Wanne fixiert, die Bauchhöhle caudal des Sternums eröffnet und der Schnitt zügig nach ventral verlängert, so dass man eine gute Aufsicht auf das Diaphragma hatte. Mit einer Schere wurde das Diaphragma beiderseits vom Rippenbogen gelöst und ohne Lunge oder Herz zu perforieren die Rippen im ventralen Drittel durchtrennt. Um das Herz deutlich darzustellen, wurde nun das Sternum mit Hilfe eines Nadelhalters cranial des Tieres fixiert, was eine gute Übersicht über den Thorax erlaubte. Nach Einreißen und Ablösen des Herzbeutels vom Herzen wurde mit einer auf eine Spritze aufgesetzten heparinisierten Kanüle ca. 1 ml Blut entnommen, welches nach Aufbereitung für die Zytokinmessung verwendet wurde. Anschließend wurde mit einer kleinen Operationsschere ein ca. 2 mm großes Loch in den mittleren Bereich des linken Ventrikels präpariert, durch das anschließend eine Knopfkanüle eingebracht wurde, welche mit dem Perfusionssystem in Verbindung stand. Mit einer weiteren Schnittinzision wurde nun der rechte Vorhof eröffnet und gleichzeitig das Ventil zur gekühlten Kochsalzlösung (0,9 %) geöffnet. 250 – 350 ml der Lösung wurden mit einem Druck von 110 – 120 mmHg bei den WKY-Ratten bzw. 140-160 mmHg bei den SH-Ratten

durch den Kreislauf des Tieres gespült. Die Dauer richtete sich nach der Zeit bis die aus dem Herz austretende Flüssigkeit farblos war. Als weiterer Indikator für eine ausreichende Entblutung galt die Farbe der Leber, die gleichmäßig blass erscheinen musste. Dann wurde das Ventil auf die gekühlte Fixierungslösung Paraformaldehyd (PFA 4 %) umgestellt. Es waren 250 – 300 ml der Lösung zur ausreichenden Fixierung nötig. Eine erfolgreiche Durchführung der Perfusion war begleitet vom Steifwerden des Tierkörpers und fester werdender Konsistenz der Leber.

2.2.6.2. Gehirnentnahme für die Immunhistochemie

Dem nun perfundierten Tier wurde auf Höhe des 3. Halswirbels der Kopf abgetrennt. Es folgte eine Schnittinzision vom Os nasale bis hin zum caudalen Ende des Schädels, wonach die Haut nach craniolateral abgezogen wurde. Anschließend wurde der Musculus masseter und das umliegende Bindegewebe mit Hilfe einer Knochenzange entfernt. Die folgende Entfernung der Wirbelkörper und der Schädeldecke wurde vom caudal nach cranial fortgesetzt. Dazu ging man mit der Knochenzange vorsichtig ins Foramen magnum ein, ohne das darunter liegende Kleinhirn zu verletzen und arbeitete sich in Richtung Großhirn vor. Nachdem die Schädeldecke bis zum Bregma entfernt worden war, wurden die Meningen durchtrennt und vom Gehirn abgelöst. Der Schädel wurde nun um 180° gedreht, so dass die ventral liegenden Hirnnerven sichtbar wurden. Diese wurden mit einer kleinen Op-Schere durchtrennt und mit einem Spatel das Riechhirn durchstoßen. Die Hypophyse wurde dabei meist passiv abgerissen.

Das Gehirn wurde im Anschluss noch ca. 1 Stunde in kaltem PFA nachfixiert, um dann in einer 20%igen Saccharoselösung über Nacht im Kühlschrank entwässert zu werden. Die Entwässerung war für die folgende Gefrierschnitt-Methode notwendig, um das Hirn vor Gefrierartefakte zu bewahren.

2.2.6.3. Anfertigen der Gehirnschnitte

Das Schneiden des Gehirns wurde an einem Gefriermikrotom (Modell 1205, Jung, D-Heidelberg) durchgeführt. Hierzu wurde das in Saccharoselösung entwässerte Gehirn von der überschüssigen Lösung befreit, Kleinhirn von Großhirn mit einem Skalpell getrennt und die zu schneidende Hirnhälfte mit einem Gefrier-Einbettmedium (Tissue-Tec®, Leica Instruments GmbH, D-Nussloch) auf dem Objekthalter aufgeblockt. Bei der Großhirnhälfte wurde der caudale Anteil auf den Objekthalter und die ventrale Hirnseite von der Klinge weg

ausgerichtet. Das Kleinhirn wurde auf seiner rostralen Fläche mit der ventralen Fläche von der Klinge weg aufgefroren. Folgend wurde mit der Einleitung von CO₂ aus einer Gasflasche begonnen, woraufhin das Gefrier-Einbettmedium wie auch das Gehirn mit dem Abkühlen begannen. Um den CO₂-Ausstrom zu richten und somit das Einfrieren zu beschleunigen, wurde eine Plastikkappe über das Hirn und den Gasstrom gestülpt, so dass das CO₂ um das Gehirn verwirbelt wurde, was zu einer gleichmäßigen Abkühlung führte. Sobald das Objekt komplett durchgefroren war, wurden mittels einer handbetriebenen Klinge 40 µm dicke Schnitte angefertigt, welche sich bei optimaler Temperatur auf der Klinge aufrollten. Sie wurden mit einem Pinsel von der Klinge aufgenommen und in ein netzartiges Karussell mit 8 Sektoren verbracht, um dort in Phosphatpufferlösung rehydriert und aufgetaut zu werden.

2.2.6.4. Grundlage der Immunhistochemie

Die Nachweismethode der Immunhistochemie basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion, hier im speziellen von polyklonalen in Kaninchen erzeugten Antikörpern, welche gegen das gesuchte Antigen, den Transkriptionsfaktor STAT3, gerichtet sind. Die hochvariable F_{ab}-Region des Antikörpers erkennt hierbei spezielle antigen-wirkende Strukturen des Antigens, welche auch als Epitop bezeichnet werden und bindet diese reversibel. Um die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe nachweisen zu können, sind zwei Methoden möglich, zum einen durch die Avidin-Biotin-Methode mit anschließender Diaminobenzidin-Färbung (Hsu *et al.*, 1981), zum anderen durch die indirekte Immunfluoreszenz (Coons, 1958), bei der Mehrfachmarkierungen verschiedener Zelltypen möglich sind. Im Rahmen dieser Studie wurde ausschließlich die Avidin-Biotin-Methode eingesetzt.

2.2.6.5. Primärer Antikörper

Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler, im Kaninchen hergestellter Antikörper verwendet. Dieser war in der Lage, sowohl die unphosphorylierten Monomere und phosphorylierten Dimere des STAT3 im Cytoplasma sowie die Dimere im Kern zu erkennen. Der Antikörper reagierte mit einer bestimmten Peptidsequenz (AS 750-769) eines STAT3-Proteins, welche am Carboxy-terminalen Ende zu finden ist. Die Spezifität des Antikörpers in der Ratte wurde in institutseigenen Versuchen (Hubschle *et al.*, 2001a; Hubschle *et al.*, 2001b), sowie durch eine andere Arbeitsgruppe (Stromberg *et al.*, 2000) bestätigt.

2.2.6.6. Immunhistochemisches Protokoll

Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Waschschrte zwischen den einzelnen Inkubationen, sowie als Grundlage für die meisten Lösungsansätze verwendete man einen eigens hergestellten Phosphatpuffer (PBS). Das erste Blocken sowie die Waschschrte wurden in Karussells mit ca. 100 ml der entsprechenden Lösung durchgeführt. Für die Inkubationen wurden sterile 15 ml bzw. 50 ml Röhren verwendet.

Dem Protokoll entsprechend wurden die Hirnschnitte nach dem Schneiden direkt weiter bearbeitet, indem sie zur Rehydrierung 3 mal je 5 Minuten in Phosphatpuffer unter kontinuierlichem Schwenken gewaschen wurden. Währenddessen wurde die erste Blocking-Lösung bestehend aus 10 ml Normal-Horse-Serum, 300 µl Triton X-100 und 90 ml Phosphatpuffer hergestellt. Das Blocking, welches zur Absättigung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen dient, wurde im Karussell bei Raumtemperatur durchgeführt und dauerte 1 Stunde. Im Anschluss daran wurden die Schnitte ohne weiteren Waschschrte in die zweite 0,5%ige Blocking-Lösung transferiert, wo sie für 30 Minuten verblieben. Dieses Blocking wurde in 15ml-Gefäßen durchgeführt, die Lösung wurde in regelmäßigen Abständen aus 0,1M Blockungspulver hergestellt und in 10 ml Aliquote tiefgefroren gelagert, um nach Bedarf aufgetaut zu werden. Sie diente speziell der Maskierung unspezifischer Tyraminbindungsstellen und sicherte somit eine geringe Hintergrundfärbung nach den Amplifizierungsschritten. In der Inkubationszeit wurden 20 ml Antikörperstocklösung bestehend aus 200 µl NHS, 10 µl Triton X-100 und 20 ml PBS angesetzt. Um eine möglichst genaue Menge des Antikörpers zusetzen zu können, wurde im Fall des STAT3-AK 1 µl des Antikörpers mit 9 µl der Stocklösung vermischt und davon 8,3 µl in 10 ml der Stocklösung pipettiert. Somit entstand eine Verdünnung von 1:12000. Die restlichen 10 ml der Stocklösung wurden im Kühlschrank bei 4 °C für den nächsten Versuchstag gelagert. Die Antikörperinkubation erfolgte zur Mengenreduktion in sterilen 15 ml-Gefäßen und wurde bei Raumtemperatur für ca. 24 Stunden durchgeführt. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte 3 mal 5 Minuten unter ständigem Schwenken in PBS gewaschen. Die bereits hergestellte Antikörperstocklösung wurde mit 50 µl des Anti-Rabbit-Antikörpers versetzt, so dass sich eine Verdünnung von 1:200 ergab. Die Inkubation erfolgte wieder in 15ml-Gefäßen für 1 Stunde. Es folgten 3 Waschschrte von je 5 Minuten. In dieser Zeit wurden 5 ml einer Streptavidin-Phosphatpuffer-Verdünnung von 1:100 hergestellt und je 500 µl in 15ml-Probengefäße vorgelegt. Dieses gehört zu einem kommerziell erhältlichen Tyramin-Amplifizierungs-Kit und stellte den ersten Schrrte der Verstärkung der Signale dar. Avidin hat

eine große Affinität zu Biotin und lagert sich deshalb an die biotinylierten Stellen des sekundären Antikörpers (siehe hierzu **Abbildung 13**). Nach dem Verbringen der Schnitte in die Gefäße wurden diese zum Lichtschutz abgedeckt und eine Inkubationszeit von 30 Minuten abgewartet.

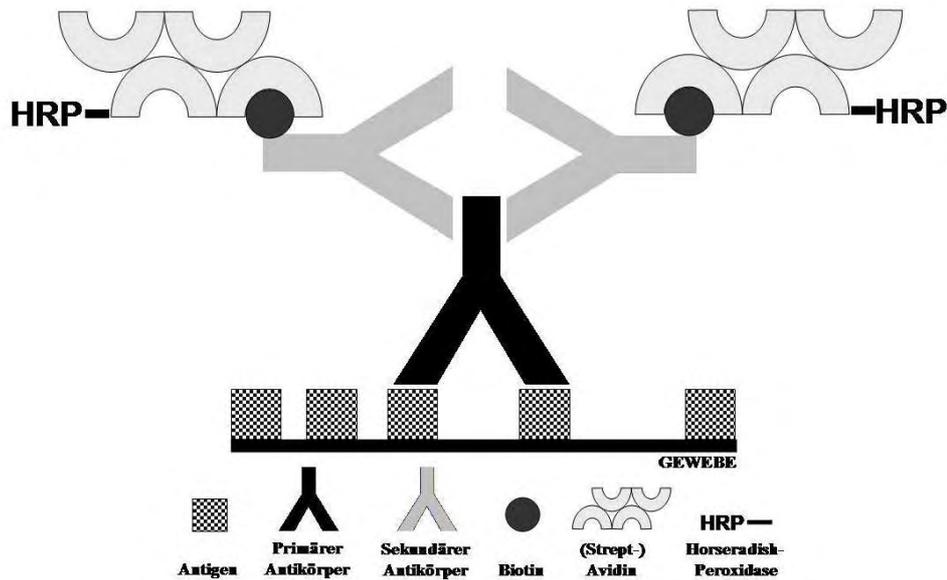


Abbildung 13: schematische Darstellung des ersten Amplifizierungsschrittes der Tyraminamplifizierung: Reaktion des Avidin-Biotin-Komplexes am sekundären Antikörper

Innerhalb dieser halben Stunde wurde bereits die ABC-Lösung aus 10 ml PBS und je 100 µl von den Bestandteilen A und B des Testkits angesetzt. A enthält Avidin, B biotinylierte Meerrettich-Peroxidase, welche zusammen Komplexe bilden und deshalb einige Zeit vor der Verwendung angesetzt werden. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Schnitte zum zweiten Schritt der Tyramin-Amplifizierung in eine Tyramin-Lösung, bestehend aus 5 ml PBS und 50 µl biotinyliertem Tyramin, gegeben und dort ebenfalls unter Lichtschutz für 10 Minuten inkubiert. Die Tyraminderivate wurden mit Hilfe der an der Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase aktiviert. Die entstandenen kurzlebigen Tyraminradikale gingen mit ihrem nukleophilen Moleküle kovalente Bindungen mit tyrosinhaltigen Protein- bzw. Peptidstrukturen ein (**Abbildung 14**). Aufgrund der vorangegangenen Maskierung von unspezifischen Tyraminbindungsstellen und der Tatsache, dass dieser Reaktionsschritt nur unter der katalytischen Einwirkung der Peroxidase abläuft, lagerten sich die Tyraminradikale nur in der direkten Umgebung der Peroxidase und somit der Antikörper an.

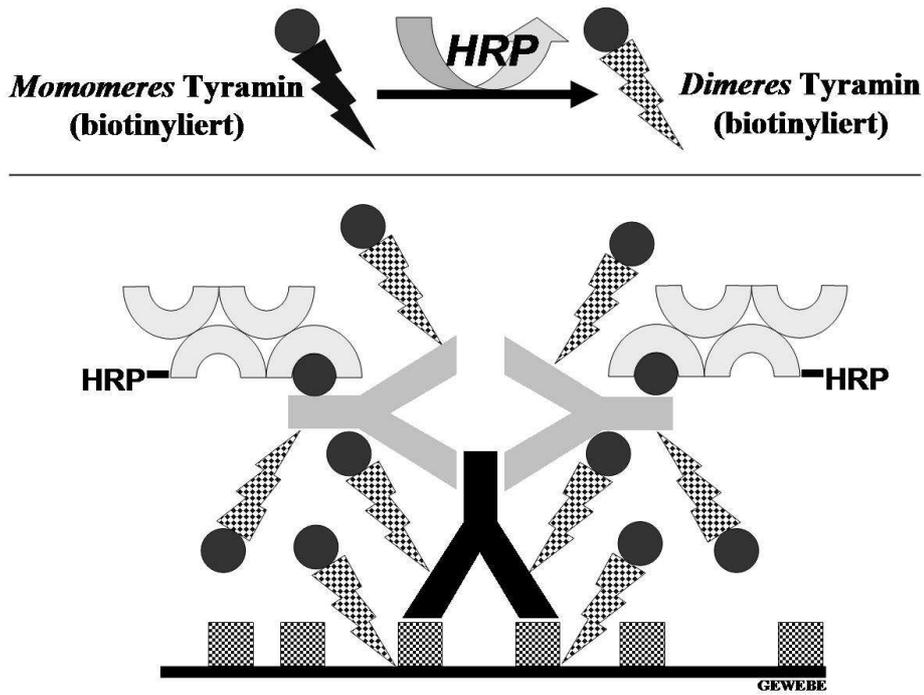


Abbildung 14: schematische Darstellung des zweiten Amplifizierungsschrittes der Tyraminamplifizierung: Reaktionsablauf nach Zugabe des Tyramin

Danach wurden wieder 3 Waschschrirte angeschlossen, nach denen die Schnitte in Tubes mit je 1 ml der ABC-Lösung überführt wurden. Die Einwirkungszeit betrug 1 Stunde. Das im ABC-Komplex enthaltene Avidin, hat wie bereits erwähnt, eine große Affinität zu Biotin und lagert sich somit an die freien Biotinmoleküle der zugegeben Tyraminmoleküle und bereits vorliegenden Avidin-Biotin-Komplexe an und führt deshalb zur weiteren Verstärkung des STAT3-Signals (**Abbildung 15**).

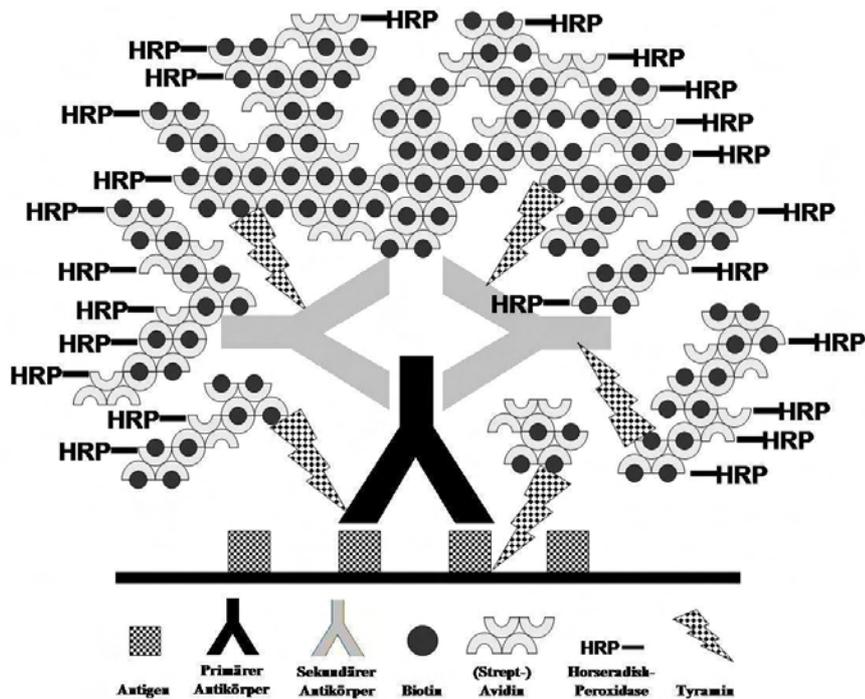


Abbildung 15: schematische Darstellung des dritten Amplifizierungsschrittes: Anlagerung der Avidin-Biotin-Komplexe an den biotinylierten Sekundärantikörper

Im Anschluss an weitere Waschschrte wurde noch die Diaminobenzidin (DAB)-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml der bereits aliquotierten, tiefgefrorenen Stocklösung (50 mg/ml) mit 100 ml PBS verdünnt. Die Schnitte wurden in der Lösung für 15 Minuten im Karussell in Dunkelheit vorinkubiert und dann mit Zugabe von 10 μ l 10%iger HCl nach ca. 4-6 Minuten wieder in PBS gegeben und 3 mal gewaschen. Der anfangs violette, lösliche Farbstoff fällt unter Einfluss des Enzyms HRP und HCl zu einem braunen Niederschlag aus. Durch die Vorinkubation wurde sichergestellt, dass sich der Farbstoff auch innerhalb der zur Verstärkung angelagerten Avidin-Biotin-Komplexe verteilen konnte. Die folgende Zugabe von HCl startete die Reaktion und führte zur Umsetzung des löslichen Farbstoffs in den unlöslichen Niederschlag, welcher sich im Bereich der HRP anlagerte und somit zur Detektion der STAT3-Signale führte. Es erfolgte das Aufziehen der Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger. Nach der Trocknung unter Lichtausschluss, die zwischen 12 und 24 Stunden dauerte, wurde noch eine Kresylviolett-färbung durchgeführt, welche die Zellkerne anfärbte, um so die Lokalisation der nukleären STAT3-Signale nachweisen zu können. Zuerst wurden die Objektträger in HistoClear für mindestens 45 Minuten gereinigt und entfettet, um dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydriert zu werden. Hierzu verwendete man 2 mal 100%igen, 90%igen, 70%igen und 50%igen Alkohol, in dem die Objektträger für je 2 Minuten pro Konzentration verweilten, im Anschluss kurz in Aqua

bidest. verbraucht wurden, auf Zellstoff abgetropft, um dann für 20-30 Sekunden in Kresylviolett getaucht zu werden. Nun folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit den gleichen Konzentrationen. Hier verblieben die Objektträger für je 30 Sekunden im Alkohol, nur im 100%igen Alkohol verblieben sie 2 Minuten. Danach transferierte man sie für 5 Minuten in HistoClear und im Anschluss in Xylol, wo sie bis zum Deckeln blieben. Zum Deckeln wurden 3 Tropfen Entellan auf dem Träger verteilt und folgend ein Deckgläschen unter Vermeidung von Lufteinschluss aufgebracht.

Tabelle 6

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
Waschen	PBS	3×5min
Abblocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen	10 ml normal horse serum 300 µl Triton X-100 90 ml 0,1M Phosphatpuffer (PBS)	1 Std.
Abblocken der unspezifischen Tyraminbindungsstellen	0,5% blocking-powder in PBS	30 min
Inkubation mit dem ersten Antikörper	1. Antikörper (1:12000) in Antikörperstocklösung (200 µl NHS+10 µl Triton X-100+10 ml PBS)	24 Std bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	3×5min
Inkubation mit dem zweiten Antikörper	2. Antikörper (1:200) in Antikörperstocklösung	1 Std.
Waschen	PBS	3×5min
1. Schritt der Tyraminverstärkung	50 µl Streptavidin 5 ml PBS	30 min in Dunkelheit
Waschen	PBS	3×5min
2. Schritt der Tyraminverstärkung	50 µl biotinyliertes Tyramin 5 ml PBS	10 min in Dunkelheit
Waschen	PBS	3×5min
ABC-Verstärkung	100 µl Reagenz A 100 µl Reagenz B 10 ml PBS	1 Std.
Waschen	PBS	3×5min

DAB-Färbung	1 ml DAB-Stocklösung (50mg/ml) 100 ml PBS 10 µl H ₂ O ₂	15min Vorinkubation 4-6 min
Waschen	PBS	3×5min
Aufziehen	gelatinebeschichtete Objektträger	nach Bedarf
Trocknen		12-24 Std.
Kresylviolett- Gegenfärbung	Histoclear Absteigende Alkoholreihe Aqua bidest. 0,1% Kresylviolettacetat in 0,25% Eisessig Aufsteigende Alkoholreihe Histoclear Xylol Entellan	mind. 45 min je 2 min 20-30 sec je 30 sec, 100% je 2 min mind. 5min bis zum Deckeln Deckeln

2.2.7. Auswertung der Daten und Statistik

2.2.7.1. Telemetrische Daten

Die Aufzeichnung der Temperatur- und Aktivitätsdaten erfolgte mit dem Computerprogramm VitalView in 5-Minuten-Intervallen. Die Daten wurden anschließend zur Auswertung in Excel übertragen, wo die Mittelwerte, die Standardabweichungen, sowie die Standardfehler (Standard Error of the Mean, S.E.M.) ermittelt wurden. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot. Für die Temperatur- und Aktivitätsmessung waren die Daten von 120 Minuten vor Injektionsgabe bis 2 Tage post iniektionem von Bedeutung. Hierzu wurden pro Versuchsgruppe zwischen 9 und 14 Tieren verwendet, aus denen der Mittelwert der Temperatur als Kurvendiagramm gegen die Zeit aufgetragen wurde. Bei der Auswertung der Aktivität des 24-Stunden-Wasser- und Futtermittelsverbrauchs sowie der Gewichtsänderung wurden ebenfalls Mittelwerte verwendet und als Balkendiagramme dargestellt. Bei der Darstellung der Aktivität wurde der Tag- und Nachtrhythmus berücksichtigt, da die Tiere in der Dunkelperiode wesentlich höhere Aktivität

zeigen als bei Licht, und getrennt voneinander präsentiert. Für die Temperaturdarstellung wurden zwei verschiedene Darstellungsformen gewählt, zum einen die 2-Tagesmessung im 5-Minuten-Intervall, zum anderen eine Darstellung der ersten 11 Stunden im 15-Minuten-Intervall.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms StatView (Abacus Concepts; Berkeley, USA) vorgenommen. Um die Signifikanz der zu vergleichenden Fieberkurven mit den Kontrollkurven zu ermitteln, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen durchgeführt. Es folgte der Scheffé-Test als post-hoc-Test auf dem 5%igen Niveau. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ lagen statistisch signifikante Unterschiede vor. Die übrigen Daten (12h-Aktivität, Futter-, Wasserverbrauch, Körpergewichte) wurden mittels einfaktorieller ANOVA und nachfolgendem Scheffé-Test verglichen. Auch hier wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikanter Unterschied definiert.

2.2.7.2. Mikroskopie

Die Auswertung der angefertigten immunhistologischen Hirnschnitte erfolgte mit einem Mikroskop des Typs BX50 (Olympus Optical, D-Hamburg). Es wurden mittels Durchlichtmethode Photographien in den Vergrößerungen 100, 200 und 400 angefertigt. Hierzu diente die Olympus Camedia C-3030-Kamera mit entsprechender Software. Von den zu untersuchenden Hirnregionen wurden von 3 Versuchstieren mindesten 3 verwertbare Photographien pro Hirnregion in den drei Vergrößerungen erstellt. Die Auswertung erfolgte in 200facher- Vergrößerung, indem die STAT-3-Signale gezählt wurden. Hierzu wurde die manuelle Zählhilfe des Programms Methamorph verwendet. Die Ergebnisse wurden mit SigmaPlot als Balkendiagramm graphisch dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit einfaktorieller ANOVA und anschließendem Scheffé-Test berechnet und lag mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ vor.

2.2.7.3. IL-6 Bioassay

Die bei den Assays gewonnenen Ergebnisse der Standardwerte wurde mittels Excel (Version 6.0) in eine Eichkurve überführt, in der auf der Ordinate die optische Dichte der Standardmessungen gegen die Konzentrationen der IL-6 Konzentration der Standardwerte auf der Abszisse aufgetragen wurde (**Abbildung 16**). Im linearen Teil der Kurve ist das Wachstum der Zellen dargestellt, welches konzentrationsabhängig ist. Das Wachstum ist direkt proportional zu den umgesetzten Formazankristallen, welche durch die Zunahme der optischen Dichte nachgewiesen werden. Zur Ermittlung der Probenkonzentrationen wurden nun diejenigen Verdünnungen der Proben verwendet, die in den Bereich der Regressionsgeraden fielen und mit Hilfe einer Regressionsgleichung und dem Verdünnungsfaktor errechnet.

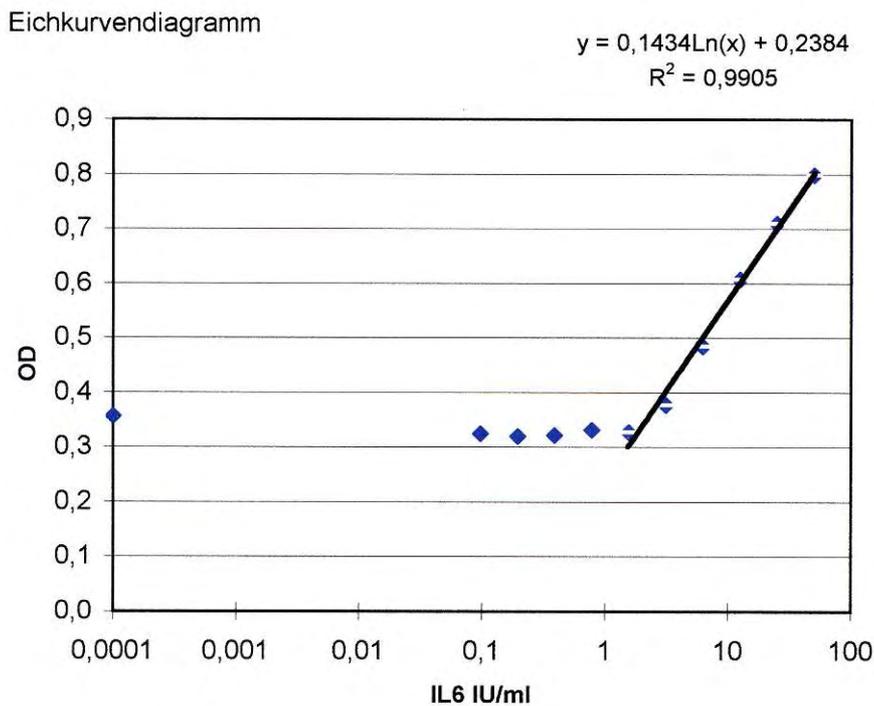


Abbildung 16: Beispielhafte Darstellung einer IL-6 Eichkurve. Die Regression im linearen Teil liegt annähernd bei 1.

2.2.7.4. TNF Bioassay

Entsprechend zu den IL-6-Auswertungen wurden auch zur Ermittlung der TNF-Konzentrationen Eichkurven und Regressionsgeraden erstellt. Im Gegensatz zu den IL-6-Messungen sank der Formazan-Gehalt auf Grund der niedriger werdenden Zellzahl bei gesteigerten TNF-Werten ab (Abbildung 17). Dem entsprechend nahm auch die optische Dichte bei steigendem TNF-Gehalt ab. Es wurden auch hier diejenigen Verdünnungen der Proben gewählt, die in den Bereich der Regressionsgeraden fielen und so mit Hilfe der Regressionsgleichung und dem Verdünnungsfaktor eine Errechnung der TNF-Konzentrationen der Proben durchgeführt.

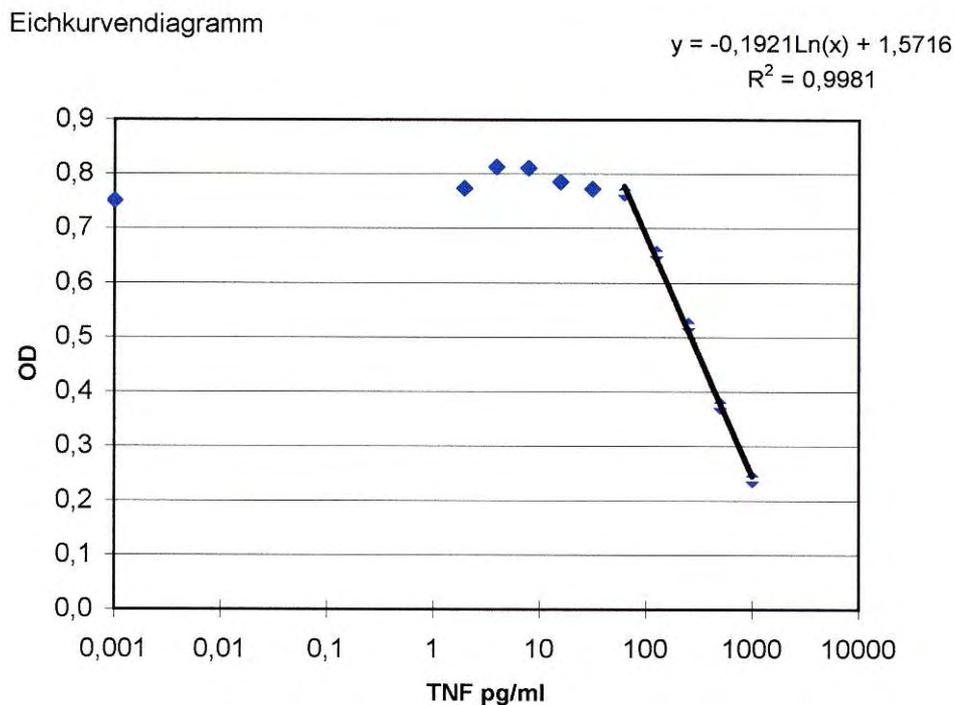


Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung einer Eichkurve des TNF-Assays.

2.2.7.5. PGE₂ ELISA

Auch hier wurde mittels Standardreihe eine Eichkurve erstellt. Über die optische Dichte konnten dann die Konzentrationen der Proben festgestellt werden. Ähnlich wie bei den TNF-Werten war der PGE-Gehalt umgekehrt proportional zur optischen Dichte, also niedrig bei hoher Dichte und hoch bei niedriger Dichte.

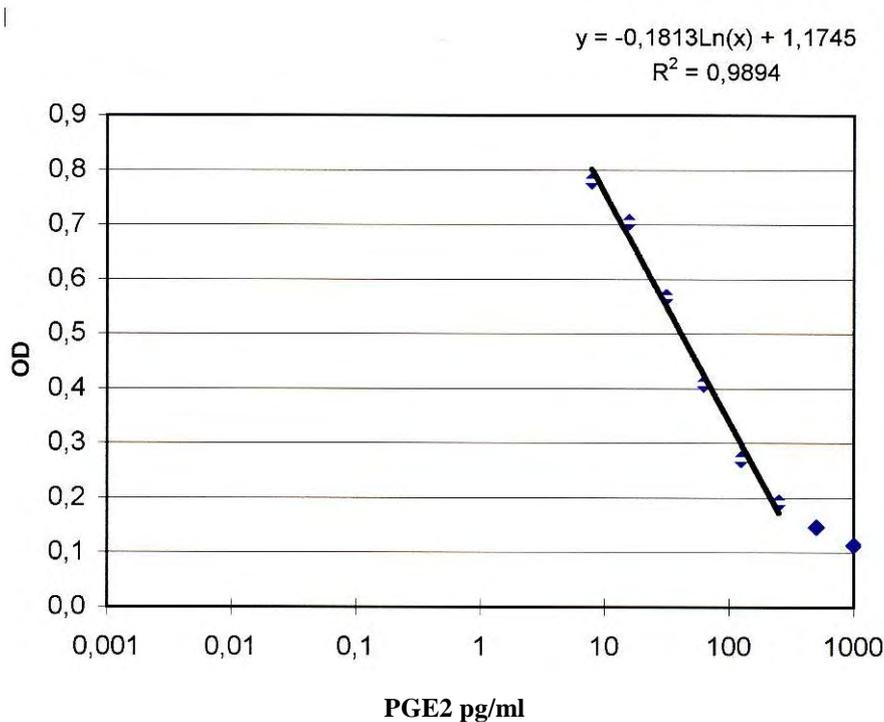


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung einer PGE-Eichkurve

Die Zytokingehalte wurden mit dem Programm SigmaPlot in Grafiken dargestellt und die Signifikanz mittels einfaktorieller ANOVA und folgendem Scheffé-Test als post-hoc-Test auf dem 5% Niveau überprüft. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ lagen statistisch signifikante Unterschiede vor.

Die gemessenen Zytokinwerte wurden wegen fehlender Normalverteilung für die statistischen Berechnungen zunächst logarithmiert.

III. Ergebnisse

1. Exogene Pyrogene: MALP-2, FSL-1 und LPS

MALP-2, FSL-1 wie auch LPS führen im Organismus nach Applikation zum sogenannten „sickness behavior“, was unter anderem von Anorexie, Adipsie, Gewichtsverlust und Fieber begleitet ist. Aus diesem Grund werden sie als exogene Pyrogene bezeichnet und in vielen wissenschaftlichen Arbeiten zur genaueren Aufklärung der Mechanismen der Fieberentwicklung herangezogen. LPS ist hier das mit Abstand am meisten verwendete und am genauesten erforschte exogene Pyrogen und stammt aus den Zellwänden gram negativer Bakterien. MALP-2 wie auch FSL-1 stammen von unterschiedlichen, Mykoplasmenstämmen (*Mycoplasma fermentans* sowie *M. hyorhina* und *Mycoplasma salivarium*) und werden ebenfalls als exogene Pyrogene verwendet. Im Gegensatz zu LPS sind hier die genauen Abläufe im Organismus noch nicht ausführlich charakterisiert, was im Rahmen dieser Studie fortgeführt werden sollte.

2. TLR2-ko- und C57/BL-6-Kontroll-Mäuse

2.1. MALP-2-Stimulation

2.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer Injektion von MALP-2. Vergleich zwischen TLR2-ko- und C57/BL-6- Mäusen

Temperaturentwicklung	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n= 11)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n=12)
C57/BL-6-Mäuse	Stresspeak mit anschliessendem signifikanten, monophasischem Fieber bei 210-300 min (p= 0,0386; F=5,2) (n= 9)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n=7)
TLR2-ko vs. C57/BL-6	zwischen TLR2ko und C57/BL-6-Mäusen signifikante Temperaturunterschiede im Bereich von 90-330 min (p= 0,0037; F=11,1)	Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen

Zur Erhebung der telemetrischen Daten wurden TLR2-ko-, sowie C57/BL-6-Kontroll-Mäuse mit einer Dosierung von 1000 µg/kg MALP-2 stimuliert, als Kontrolllösung diente Cremophor. Die Messungen begannen 120 min vor der Injektion und endeten 2 Tage nach dem Injektionszeitpunkt. Die Normaltemperatur der hier verwendeten Mäuse bewegte sich im

Temperaturspektrum von 36-38 °C und wies einen zirkadianen Rhythmus auf. Während des Tages wurde unter nicht stimulierten Bedingungen eine Temperatur von 37 °C nicht überschritten, wohingegen nachts ein Temperaturanstieg auf ca. 38 °C zu verzeichnen war. Diese Temperaturschwankungen korrelierten mit der Nachtaktivität der Mäuse. Im Versuch zeigte sich direkt im Anschluss an die Injektion ein erster Temperaturanstieg um ca. 1 °C, der sein Maximum von $38 \pm 0,3^\circ\text{C}$ nach ungefähr 30 min erreichte, um dann wieder langsam auf Normaltemperatur abzusinken. Dieser frühe Temperaturanstieg ist als Stressreaktion auf die Manipulation hin zu werten und trat bei den ko-Mäusen, wie auch bei den Kontrolltieren unabhängig davon auf, was den Tieren injiziert wurde. Nach Injektion von MALP-2 stellte sich bei den ko-Mäusen im Anschluss an die Stressreaktion wieder die normale Körpertemperatur ein. Die Kontrolltiere zeigten dagegen ein monophasisches Fieber mit Maximalwerten von $37,7 \pm 0,3^\circ\text{C}$, was sich über den ersten Versuchstag hinweg manifestierte und sich in der Nacht wieder dem normalen Temperaturrhythmus anglich. (siehe **Abbildung 19**).

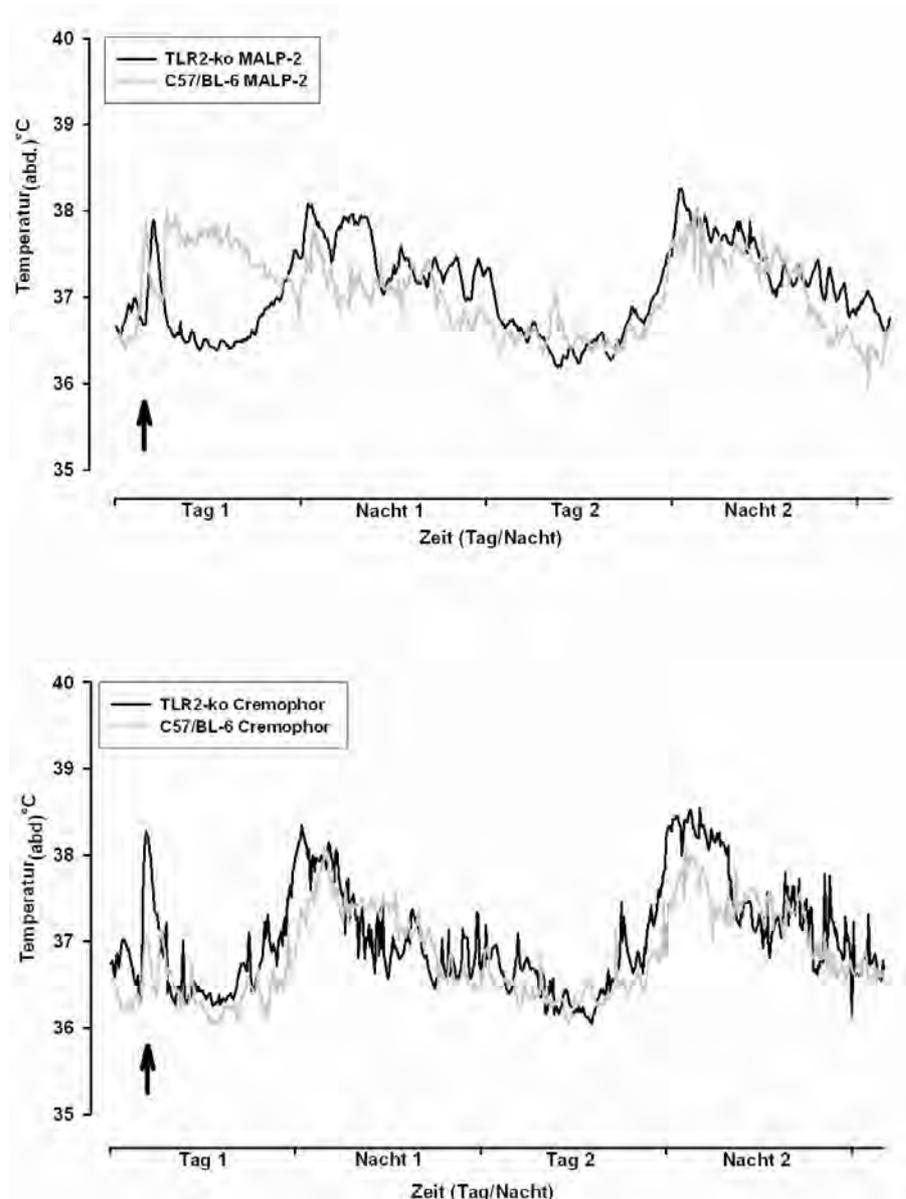


Abbildung 19: 2-Tagestemperaturverlauf nach MALP-2- bzw. Cremophor-Stimulation bei TLR2-ko- und C57/BL-6-Mäusen. Nach Cremophor-Stimulation zeigen beide Mäusestämme ähnliche Temperaturverläufe, indem sie bis auf den Stresspeak keine Erhöhung der Körpertemperatur zeigten. Eine MALP-2-Stimulation führte hingegen bei den C57/BL-6-Mäusen an Tag 1 zu einer deutlichen Fieberentwicklung, wohingegen diese Reaktion bei den ko-Mäusen ausblieb.

In der Kurzzeitdarstellung des Injektionstags zeigten die ko-Mäuse im Vergleich zur Pyrogenstimulation nach Kontrollinjektion des Lösungsmittels Cremophor keine signifikanten Unterschiede in der Temperaturentwicklung. Innerhalb der ersten 30 min zeichnete sich, wie bereits beschrieben, der sogenannte Stresspeak als Temperaturerhöhung ab, um innerhalb der ersten Stunde wieder auf die Ausgangstemperatur zurückzukehren. Bei den C57/BL-6-Mäusen manifestierte sich hingegen zwischen 120 und 300 Minuten eine

Temperaturerhöhung der Pyrogen-behandelten Tiere um $\pm 0,5$ °C, die sich im Bereich von 210-300 Minuten gegenüber den mit Cremophor behandelten Kontrollmäusen als signifikant herausstellte ($p= 0,0386$; $F= 5,2$) (**Abbildung 20**). Nach der Cremophor-Injektion war nur ein Stresspeak auszumachen.

Vergleicht man nun den Temperaturverlauf der ko-Mäuse mit den Kontrolltieren nach MALP-2-Stimulation, so ist im Bereich von 90 -330 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen den Tierstämmen zu verzeichnen ($p= 0,0037$; $F= 11,1$). Die C57/BL-6-Mäuse bildeten während dieser Zeit ein robustes, monophasisches Fieber aus, bei dem die Temperatur im Schnitt um $0,5^{\circ}\text{C}$ über der der ko-Mäuse lag, wohingegen bei den ko-Mäusen keine Erhöhung der Körpertemperatur auszumachen war.

Nach Cremophor-Stimulation waren zwischen TLR2-ko-Mäusen und den C57/BL-6 keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Bis auf die Stress-Induzierte Temperaturerhöhung waren keine Abweichungen von der Basaltemperatur zu verzeichnen.

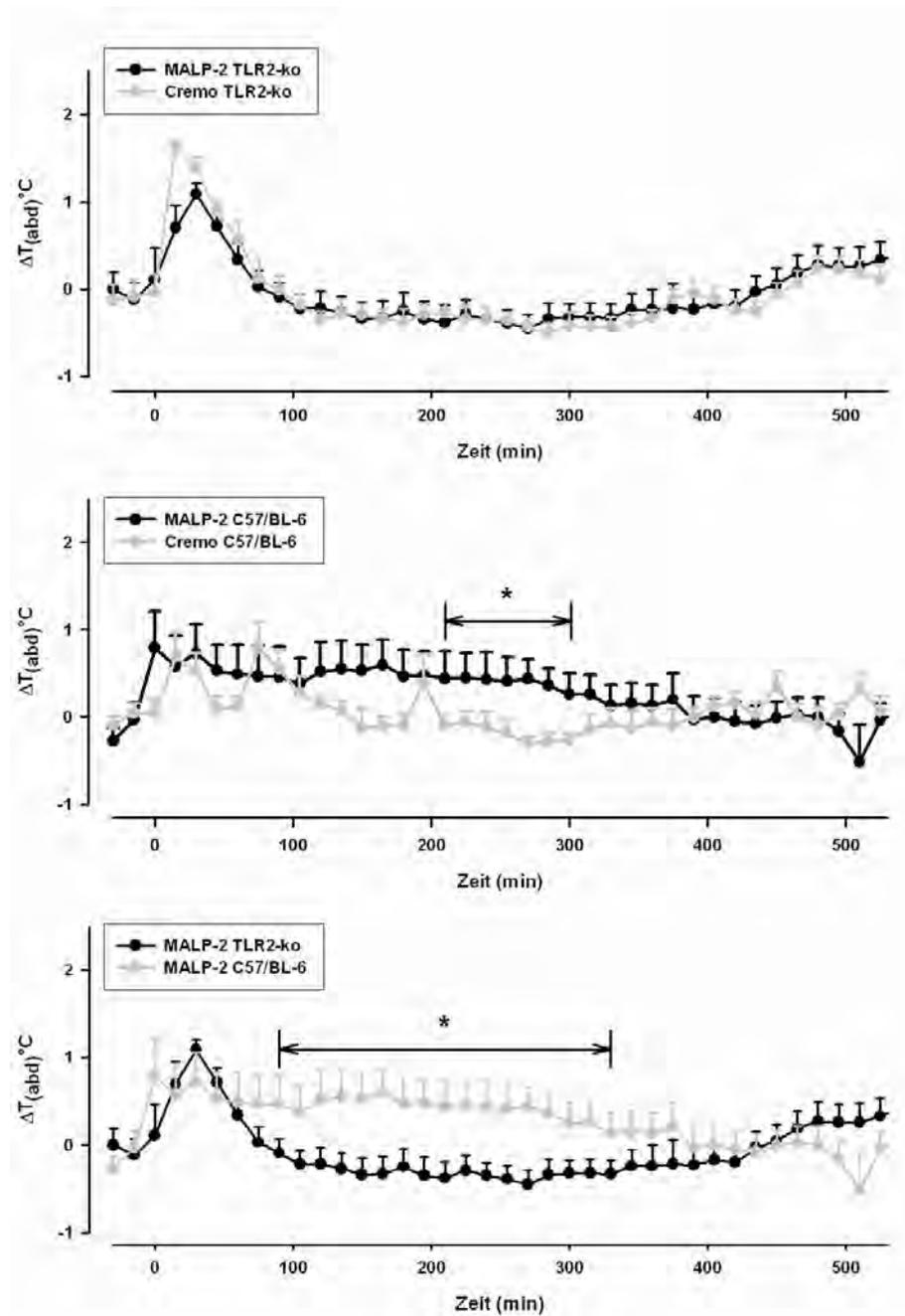


Abbildung 20: 500 min-Zeitausschnitt des Injektionstags nach MALP-2- bzw. Cremophor-Stimulation bei TLR2-ko- und C57/BL-6-Mäusen. Da die Grundtemperatur der beiden Mäusestämme variierte, werden die Temperaturen der Tiergruppen als Differenz in Grad Celsius \pm S.E.M. zur mittleren Temperatur angegeben, die während der 120 min vor der Injektion gemessen wurde. Der Zeitpunkt 0 zeigt den Injektionszeitpunkt an. Horizontale Balken mit Sternen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den jeweils dargestellten Gruppen an.

2.1.2. Aktivitätsänderung nach MALP-2-Stimulation

Aktivität	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
<p>TLR2-ko-Mäuse (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p>T1: 1519±315 (p= 0,0036; F= 10,7) N1: 4161±932 (p= 0,0171; F=6,7) T2: 1455±378 (p= 0,0147; F=7,1) N2: 4372±1773 (p= 0,0065; F= 9,1) (n= 12) jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen MALP-2- und Cremophor- Stimulation</p>	<p>T1: 4678 ±98 N1: 8590±1479 T2: 4011±940 N2: 12993±2834 (n=12)</p>
<p>C57/BL-6-Mäuse (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p>T1: 1883±513 N1: 2346±525 (p= 0,0066; F=10,1) T2: 1919±385 N2: 4222±801 (n= 9) nur in der ersten Nacht ein signifikanter Unterschied zwischen den Pyrogen- und Solvent-stimulierten Tieren</p>	<p>T1: 2352±290 N1: 6019±1129 T2: 2026±269 N2: 6180±1169 (n=7)</p>
<p>TLR2-ko vs C57/BL-6 (Aktivitätscounts/12 Std.)</p>	<p>Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen</p>	

Bei der Aktivitätsmessung wurden jeweils Tag und Nacht getrennt voneinander beurteilt. Die Graphik zeigt die gemittelte kumulierte Anzahl der Aktivitätscounts über jeweils 12 Stunden mit dem zugehörigen Standardfehler. Der Messzeitraum entspricht jeweils den Hell- und Dunkelphasen des Versuchs. Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, lagen die Messungen im Zeitraum der Dunkelphasen immer über denen der Lichtphasen. Bei den TLR2-ko-Mäusen konnten während des gesamten Versuchs signifikante Unterschiede zwischen den Pyrogen-behandelten Tieren zu den Cremophor-behandelten Tieren festgestellt werden. Diese Unterschiede bezogen sich auf die Absolutwerte der Aktivitätscounts. Das Muster erhöhter Nachtaktivität im Vergleich zu den niedrigeren Tageswerten wurde jedoch durch die MALP-2-Behandlung nicht beeinträchtigt (**Abbildung 21**, oben). Im Gegensatz dazu war die erhöhte Nachtaktivität der C57/BL-6-Mäuse in der Nacht nach der MALP-2-Injektion unterdrückt (**Abbildung 21**, Mitte). Dieser Befund spricht dafür, dass sich „sickness behavior“ in Form unterdrückter Nachtaktivität nach Stimulation mit MALP-2 nur bei den Kontrolltieren, nicht aber bei den TLR2-defizienten Tieren entwickelt. Bezogen auf die Absolutwerte der motorischen Aktivität ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen TLR2-ko- und C57/BL-6-Mäusen nach Stimulation mit MALP-2 errechnen, auch nicht in der 1. Nacht nach der Injektion (**Abbildung 21**, unten).

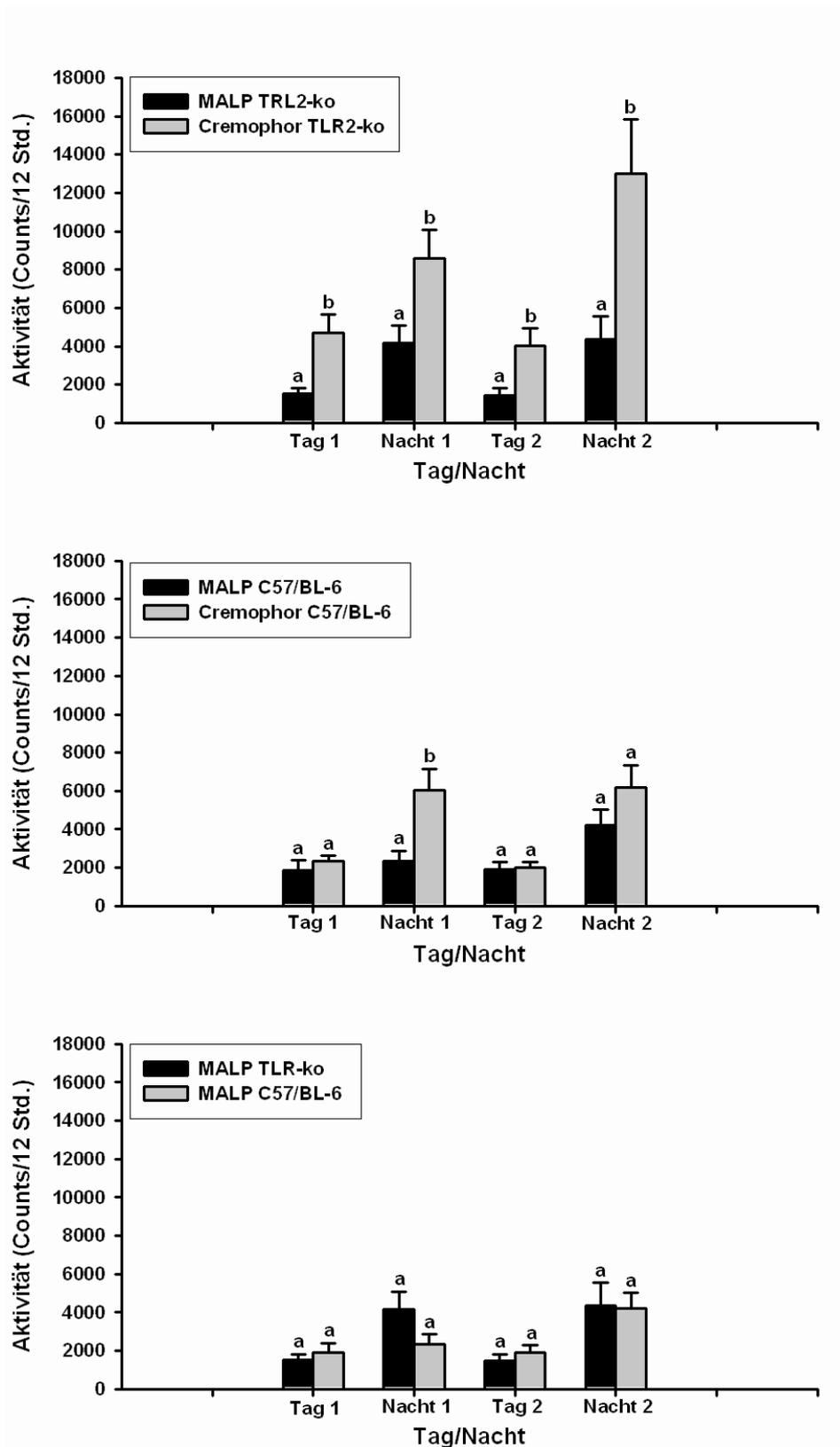


Abbildung 21: Vergleich der mittleren Aktivität der MALP-2- und Cremophor-behandelten ko-Mäuse mit den C57/BL-6-Mäusen. Die Ergebnisse sind jeweils über 12 Stunden kumuliert und als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Die Auswertung erstreckt sich über einen Zeitraum von zwei Tagen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem verglichenen Untersuchungsintervall an.

2.1.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit MALP-2

Um den immunstimulatorischen Einfluss der verschiedenen verwendeten Substanzen zu charakterisieren, wurden neben den telemetrischen Aufzeichnungen Untersuchungen der Zytokinplasmagehalte durchgeführt. Es wurden hierzu TNF α - sowie IL-6 gemessen, da diese beiden Zytokine als wichtigste zirkulierende endogene Pyrogen gelten. Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte 90 Min nach dem Stimulationszeitpunkt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da hier erfahrungsgemäß eine starke Erhöhung der TNF α -Werte, sowie eine bereits einsetzende Erhöhung der IL-6-Werte zu erwarten war.

2.1.3.1. Plasmawerte von TNF α

TNF α	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	- (n=5)	- (n=5)
C57/BL-6-Mäuse	71229 \pm 17303 pg TNF α /ml (n=5)	- (n=5)

Nach intraperitonealer Stimulation mit 1000 μ g/kg MALP-2 konnte bei den TLR2-ko-Mäusen kein TNF α im Plasma nachgewiesen werden (**Abbildung 22**). Die Nachweisgrenze lag bei 6 pg TNF α /ml (Ross *et al.*, 2003). Hingegen zeigten die C57/BL6-Mäuse einen massiven Anstieg der Plasmawerte auf 71229 \pm 17303 pg TNF α /ml. Eine Stimulation mit Cremophor konnte bei keinem der beiden Tierstämme messbare TNF α -Werte induzieren (**Abbildung 22**).

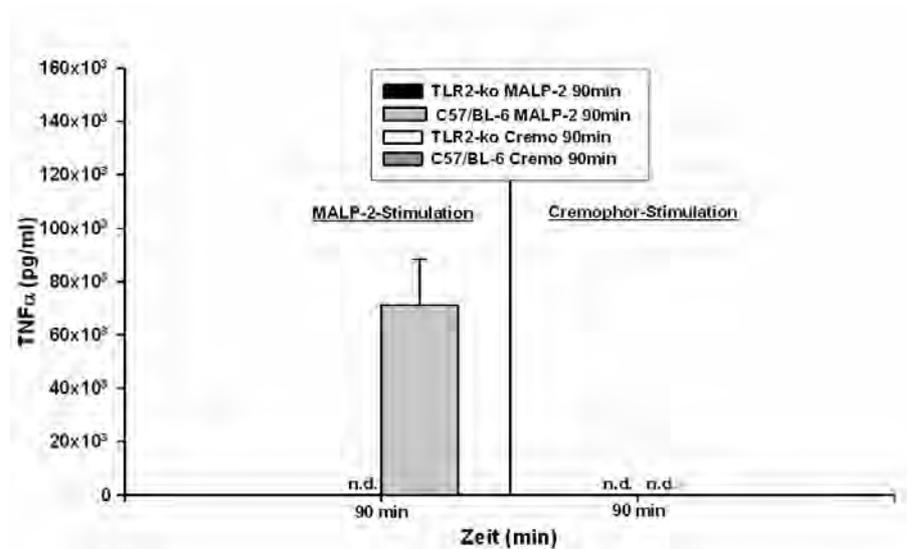


Abbildung 22: TNF α -Plasmawerte nach MALP-2-Stimulation, die Säule repräsentiert den Mittelwert \pm S.E.M. (n.d.: nicht detektierbar).

2.1.3.2. Plasmawerte von IL-6

IL-6	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	169 \pm 35 IU/ml	190 \pm 50 IU/ml
C57/BL-6-Mäuse	2299 \pm 1057 IU/ml (p= 0,0015; F= 30,5)	86 \pm 26 IU/ml
TLR2-ko vs C57/BL-6	signifikanter Unterschied (p= 0,0005; F=32,3)	Keine relevanten Unterschiede

Auch bei den IL-6-Messungen ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den ko-Mäusen und den Kontrolltieren (Abbildung 23). Die Nachweisgrenze lag bei dem verwendeten Assay bei 3 IU IL-6/ml (Ross *et al.*, 2003). Die TLR2-ko-Mäuse entwickelten nach MALP-2-Stimulation zirkulierende IL-6-Konzentrationen von 169 \pm 35 IU/ml, nach Cremophor-Stimulation ergaben sich mit 190 \pm 50 IU/ml vergleichbare Werte, die sich nicht signifikant unterschieden. Im Gegensatz hierzu zeigten die Kontrollmäuse, bei denen nach Behandlung mit Cremophor im Mittel 86 \pm 26 IU/ml IL-6 im Plasma gemessen wurden, nach Gabe von MALP-2 einen hochsignifikanten Anstieg auf 2299 \pm 1057 IU/ml (p= 0,0015; F= 30,5). Beim Vergleich der beiden Mäusestämme miteinander war nach MALP-2-Stimulation ein

signifikanter Unterschied der IL-6-Werte feststellbar (169 ± 35 IU/ml IL-6 der TLR2-ko-Mäuse zu 2299 ± 1057 IU/ml der Kontrollmäuse; $p = 0,0005$ und $F = 32,3$). Nach Cremophor-Injektionen konnten keine signifikanten Unterschiede der zirkulierenden IL-6-Werte zwischen den beiden Mäusestämmen ermittelt werden.

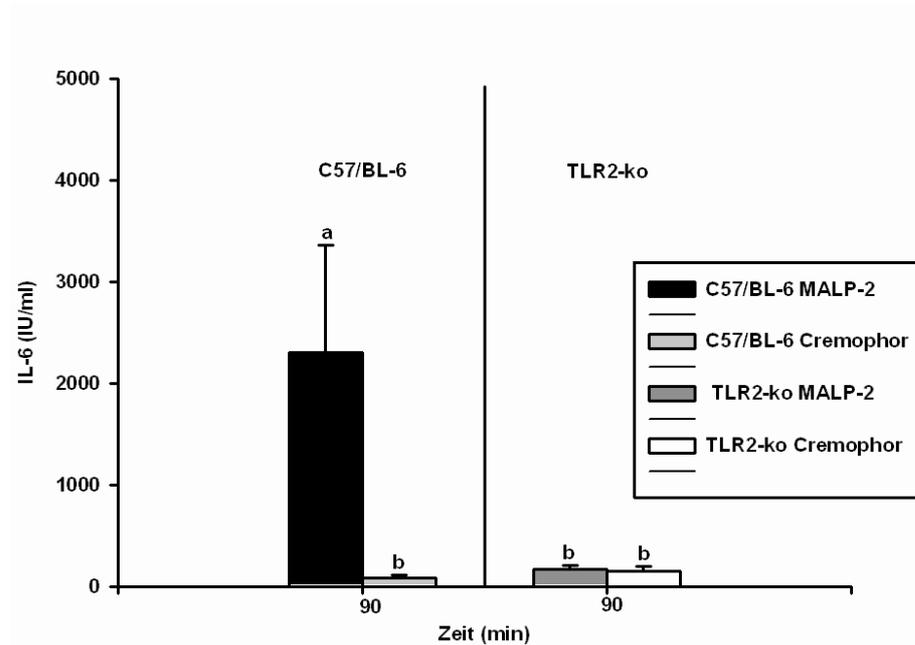


Abbildung 23: IL-6-Werte im Blutplasma 90 Minuten nach MALP-2- und Cremophor-Stimulation bei C57/BL-6- und TLR2ko-Mäusen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M.. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an. Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

2.2. FSL-1-Stimulation

2.2.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer Injektion von FSL-1. Vergleich zwischen TLR2-ko- und C57/BL6-Mäusen

Temperaturentwicklung	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n= 10)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n=12)
C57/BL-6-Mäuse	Stresspeak mit anschliessendem monophasischen Fieber bei 110-530 min (p= <0,0001; F= 28,9) (n= 9)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n=7)
TLR2-ko vs C57/BL-6	Bei TLR2-ko ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen, bei C57/BL-6 signifikant erhöhte Temperatur auf bis zu 37,8°C im Bereich von 75-330 min (p= <0,0001; F= 29,4)	Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tierstämmen

Bei der Stimulation mit dem Pyrogen FSL-1 wurde, wie bei MALP-2, eine Dosierung von 1000µg/kg gewählt. Die Aufzeichnung des Versuches begann auch hier 2 Stunden vor dem Injektionszeitpunkt, also mit dem Einschalten des Lichtes. Die Versuchsergebnisse sind mit den Ergebnissen der MALP-2-Stimulation vergleichbar, allerdings ist die Ausprägung der Temperaturerhöhung bei den C57/BL-6 etwas geringer. Die TLR2-ko-Mäuse zeigten bis auf

den Stresspeak keinerlei Temperaturerhöhung, wohingegen die C57/BL-6 über einen Zeitraum von 7 Std. des ersten Untersuchungstages eine Erhöhung auf maximal 37,7°C zeigten und somit ca. 1°C über der Temperatur der ko-Mäuse lagen. In der ersten Nacht entwickelten die C57/BL-6-Mäuse über ca. 6 Stunden eine Hypothermie, die ca. maximal 0,8°C unter der Temperatur der PBS-behandelten Tiere lag. Dies bedeutet, dass der normalerweise in der Dunkelphase beobachtet Anstieg der Körpertemperatur in der ersten Nacht nach Stimulation mit FSL-1 bei den C57/BL-6-Mäusen nahezu ausblieb. Im Anschluss daran entsprach die Körperkerntemperatur der Kontrolltiere wieder dem normalen Temperaturrehythmus (Abbildung 24).

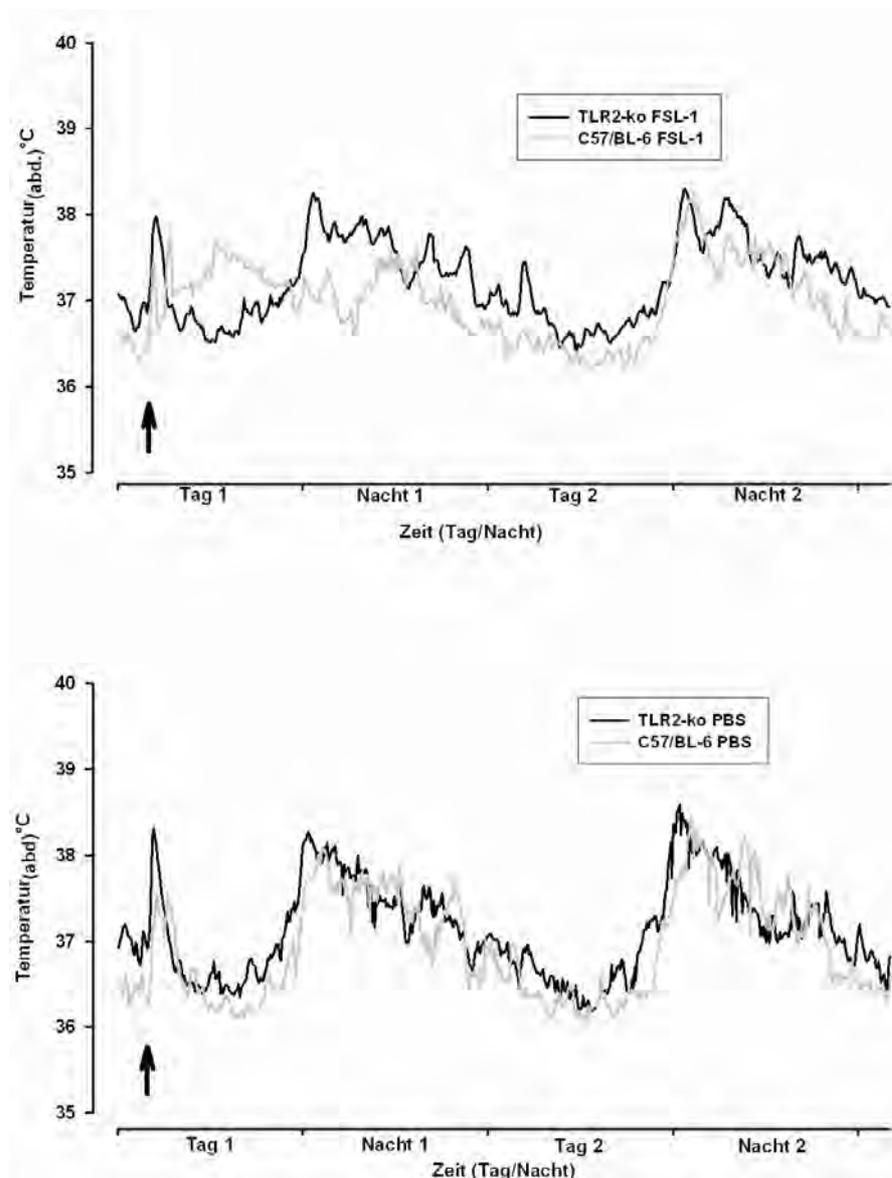


Abbildung 24: Temperaturverlauf bei den TLR2-ko- bzw. C57/BL-6-Mäusen nach FSL-1- und PBS-Applikation über einen Zeitraum von zwei Tagen

Bei den ko-Mäusen unterschieden sich die Temperaturverläufe zwischen den mit Pyrogen bzw. PBS-behandelten Tieren nicht (**Abbildung 25**, oben), wohingegen bei den pyrogenstimulierten C57/BL-6 eine deutliche Temperaturerhöhung um ca. 1°C auf $37,5\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zur PBS-Behandlung nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 25**, Mitte). Im Zeitintervall von 110-530 Minuten nach Injektion ergaben sich signifikante Unterschiede. Beim Vergleich der beiden FSL-1-stimulierten Mäusestämme zueinander konnten im Zeitraum von 75-530 Minuten post injectionem deutliche Temperaturunterschiede festgestellt werden. Die Temperatur der TLR2-ko-Mäuse lag hier mit $36,7\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ um ungefähr $0,7^{\circ}\text{C}$ tiefer als die der C57/BL-6 (**Abbildung 25**, unten).

Nach PBS-Applikation zeigten sich zwischen den beiden Mäusestämmen keine nennenswerten Unterschiede. Bei beiden trat innerhalb der ersten Stunde der schon genannte Stresspeak der Körpertemperatur auf.

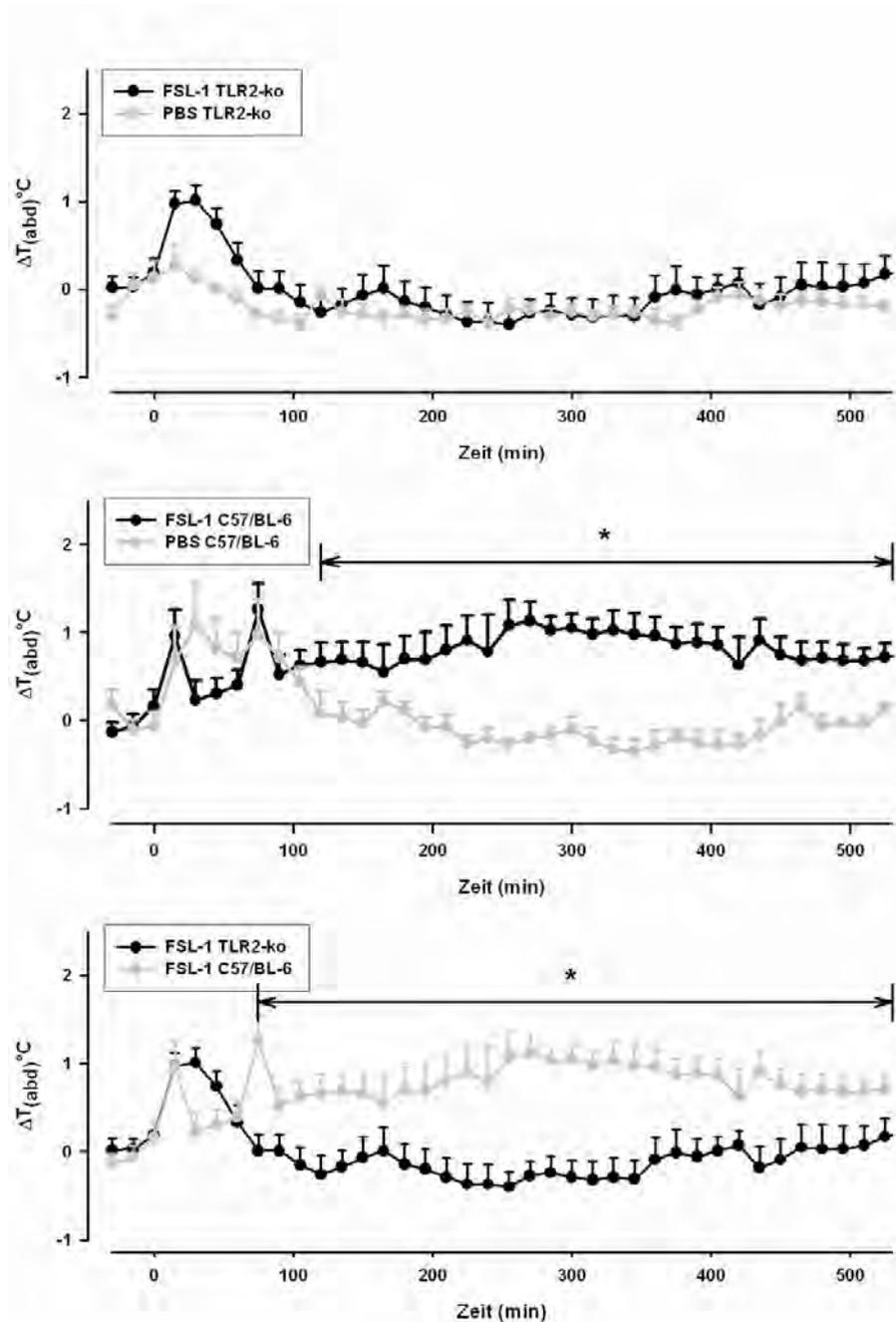


Abbildung 25: 500min-Zeitausschnitt des Injektionstages nach Gabe von FSL-1 oder PBS (Lösungsmittel) bei TLR2-ko- bzw. C57/BL-5-Mäusen. Wegen Variationen der Ausgangstemperaturen vor der Injektion werden die mittleren Temperaturverläufe der Tiergruppen als Differenz in Grad Celsius \pm S.E.M. zur mittleren Temperatur angegeben, die während der 120 Minuten vor der Injektion gemessen wurde. Zum Zeitpunkt "0" erfolgte die jeweilige Injektion. Horizontale Balken mit Stern zeigen die Zeiträume an, innerhalb derer signifikante Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen errechnet wurden.

2.2.2. Aktivitätsänderung nach FSL-1-Stimulation

Aktivität	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
<p>TLR2-ko-Mäuse (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p>T1: 2427±400 (p= 0,0237; F= 6,1) N1: 5965±969 T2: 1940±271 (p= 0,0209; F=6,4) N2: 6143±1189 (n= 9)</p> <p>hier konnte jeweils in den beiden Lichtperioden ein signifikanter Unterschied zwischen FSL-1- und PBS-stimulierten Tieren ermittelt werden</p>	<p>T1: 4692±781 N1: 10981±2669 T2: 4487±916 N2: 11383±2259 (n=12)</p>
<p>C57/BL-6-Mäuse (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p>T1: 1707±380 (p= 0,0333; F= 5,6) N1: 2510±460 (p= 0,0047; F= 11,2) T2: 1703±231 N2: 4650±853 (n= 9)</p> <p>am ersten Tag und in der ersten Nacht ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Pyrogen- und PBS-stimulierten Tieren</p>	<p>T1: 3869±924 N1: 6415±1191 T2: 2064±311 N2: 7102±1147 (n=7)</p>
<p>TLR2-ko vs C57/BL-6 (Aktivitätscounts/12 Std.)</p>	<p>Nur in der ersten Nacht ergab sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Aktivität zwischen den beiden Mäusestämmen (p= 0,0044; F= 11,2)</p>	

Das Aktivitätsmuster der TLR2-ko- und der C57/BL-6-Mäuse nach Stimulation mit FSL-1 bzw. PBS entsprach prinzipiell den bereits in der Versuchsreihe mit MALP-2 erzielten Beobachtungen. Ungeachtet der höheren absoluten Aktivitätscounts, die bei TLR2-ko-Mäusen nach Injektion mit PBS erfasst wurden, wurde bei diesen Tieren auch durch FSL-1 der charakteristische Aktivitätsrhythmus mit niedriger Tages- und hoher Nachtaktivität nicht beeinträchtigt (**Abbildung 26**, oben). Im Gegensatz dazu war bei den C57/BL-6-Kontrollen die erhöhte Nachtaktivität am Tag der Stimulation mit FSL-1 unterdrückt (**Abbildung 26**, Mitte). Dieser Effekt scheint somit von einem funktionsfähigen TLR2-Rezeptor abhängig zu sein. Beim Vergleich der beiden Stämme untereinander ergab sich in der ersten Nacht nach Injektion von FSL-1 bei den C57/BL-6-Mäusen eine im Vergleich zu den TLR2-ko-Mäusen signifikante Aktivitätsminderung, was auf die unterdrückte Nachtaktivität der Kontrolltiere zurückzuführen war (**Abbildung 26**, unten).

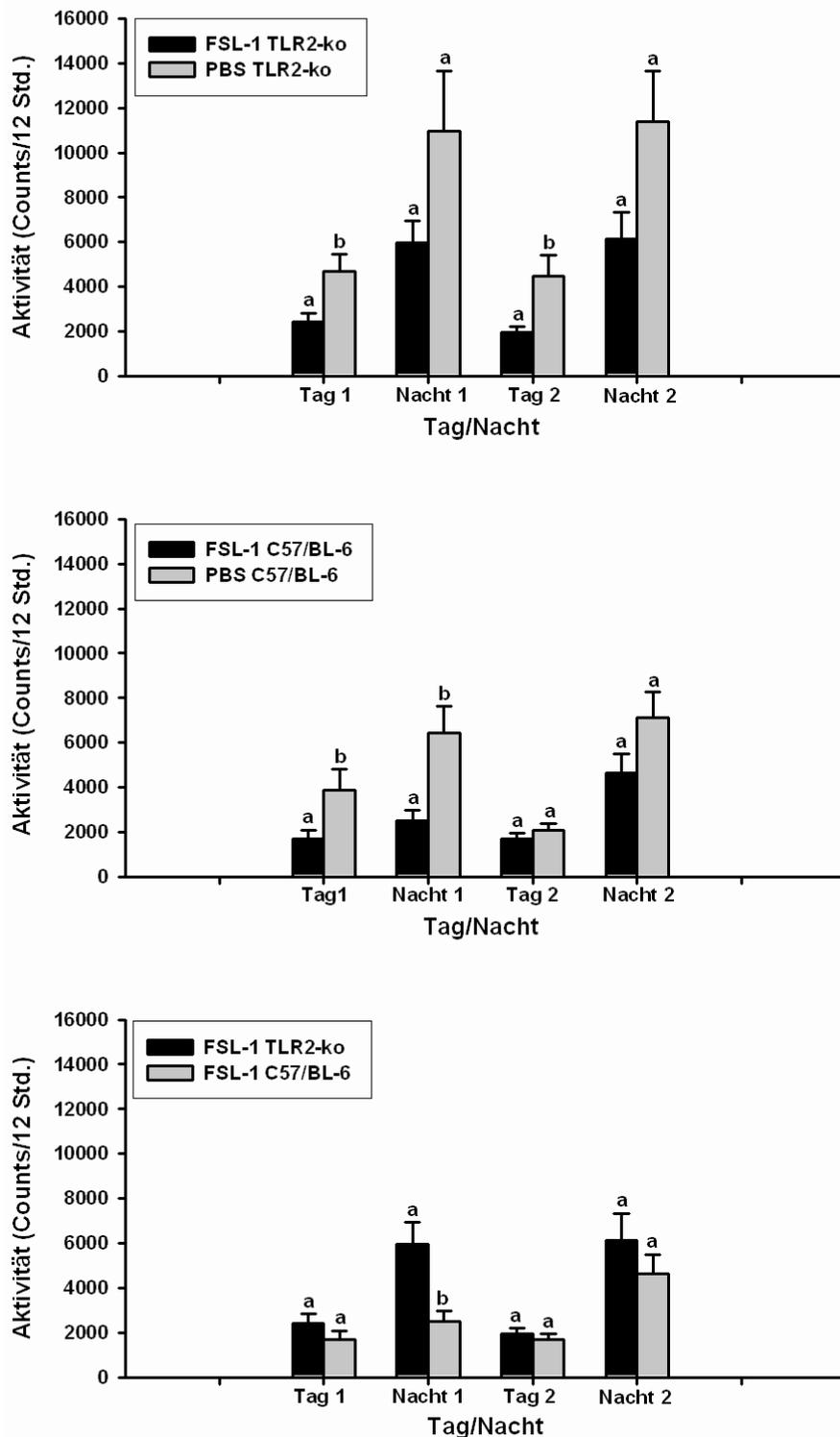


Abbildung 26: Vergleich der der mittleren motorischen Aktivität der FSL-1 und PBS-behandelten ko-Mäuse mit den bei C57/BL-6-Mäusen gemessenen Werten. Die Aktivitätsdaten sind jeweils über Zeiträume von 12Stunden kumuliert (Licht- und Dunkelphasen) und als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen eines Untersuchungsintervalls zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an.

2.2.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit FSL-1

2.2.3.1. Plasmawerte von TNF α

TNF α	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	- (n=5)	- (n=5)
C57/BL-6-Mäuse	24463 \pm 7547 pg TNF α /ml (n=5)	- (n=5)

Nach erfolgter Stimulation mit 1000 μ g/kg FSL-1 konnte, wie bei den MALP-2 stimulierten Tieren, kein TNF α im Blut der ko-Mäuse nachgewiesen werden (**Abbildung 27**). Die C57/BL-6-Mäuse zeigten dagegen deutliche Erhöhungen der TNF α -Spiegel auf 24463 \pm 7547 pg/ml. Dieser Wert liegt zwar unter den durch MALP-2 verursachten Werten, was die stärkere Wirksamkeit von MALP-2 gegenüber FSL-1 zeigt, es handelt sich jedoch ebenfalls um einen massiven Anstieg. Nach einer PBS-Stimulation konnten bei beiden Gruppen keine messbaren Konzentrationen an TNF α im Blut nachgewiesen werden.

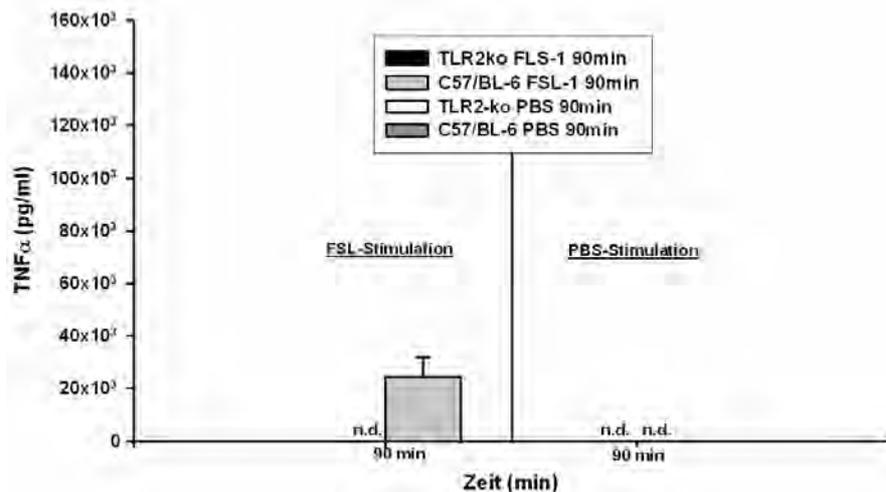


Abbildung 27: TNF α -Plasmakonzentrationen nach FSL-1 und PBS-Stimulation, die Säule repräsentiert den Mittelwert \pm S.E.M.

2.2.3.2. Plasmawerte von IL-6

IL-6	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	202±75 IU/ml	147±48 IU/ml
C57/BL-6-Mäuse	1237±370 IU/ml (p= 0,0124; F= 12,4)	182±90 IU/ml
TLR2-ko vs C57/BL-6	signifikanter Unterschied (p= 0,0062; F= 14,9)	Keine relevanten Unterschiede

Nach erfolgter FSL-1-Gabe wurde bei den TLR2-ko-Mäusen keine signifikante Erhöhung der zirkulierenden IL-6-Konzentrationen gegenüber den PBS-stimulierten Tieren gemessen. Bei den C57/BL-6-Mäusen stiegen die IL-6-Spiegel im Blut hingegen im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen signifikant auf etwa 7-fach höhere Werte an. Der direkte Vergleich von FSL-1-behandelten TLR2-ko mit C57/BL-6-Mäusen bezüglich der zirkulierenden IL-6-Konzentrationen ergab ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied.

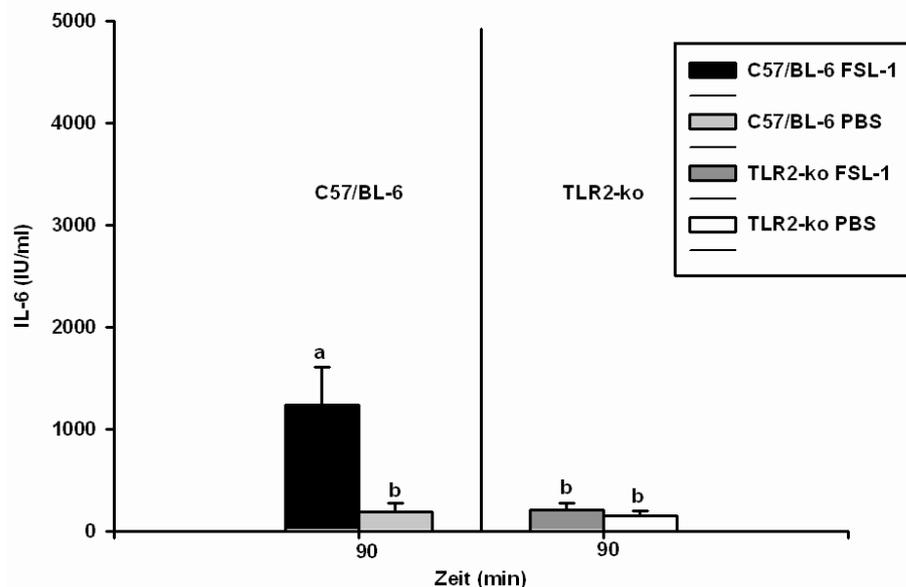


Abbildung 28: IL-6-Werte 90 Minuten nach FSL-1- bzw. PBS-Stimulation bei C57/BL-6- und TLR2-ko-Mäusen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte ± S.E.M. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an. Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander.

2.3. LPS-Stimulation

2.3.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer Injektion von LPS. Vergleich zwischen TLR2-ko- und C57/BL-6-Mäusen

Temperaturentwicklung	LPS Stimulation	PBS-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	Neben dem Stresspeak im Zeitraum von 150-310 min (p= 0,0059; F= 9,6) signifikante Temperaturerhöhung (n=10)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n=12)
C57/BL-6-Mäuse	Stresspeak mit anschliessendem signifikantem Fieber bei 245-540 min (p= 0,0038; F= 12,4) (n=8)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen (n=7)
TLR2-ko vs C57/BL-6	Im Bereich von 330-440 min signifikante Temperaturunterschiede (p= 0,0024; F= 13,4) bei der Fieberentwicklung zwischen den beiden Mäusestämmen	Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen

Für LPS-stimulierte Tiere wurde der gleich Versuchsablauf wie bei den MALP-2- und FSL-1-Stimulationen verwendet. Hier wurde allerdings eine Dosierung von 100µg/kg Körpergewicht eingesetzt, da bereits durch diese 10fach niedrigere Dosierung eine deutliche Fieberantwort erzielt werden konnte.

Nach LPS-Stimulation zeigten die ko- wie auch die C57/BL-6-Mäuse im Anschluss an den Stresspeak deutliche Fieberreaktionen, die sich jedoch im Bereich von 330-440 Minuten

signifikant voneinander unterschieden (**Abbildung 30**). Es kam bei den TLR2-ko-Mäusen zu einem Temperaturanstieg auf bis zu $37,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ und lag damit ca. $0,6^\circ\text{C}$ über der Temperatur der PBS-behandelten Tiere. Die Erhöhung begann 4 Std. nach Stimulation und hielt über 4 Std. an. Die C57/BL-6-Tiere zeigten adäquate Erhöhungen der Körpertemperatur von quantitativ ähnlicher Größenordnung wie bei den TLR2-ko-Mäusen. Hier begann der Temperaturanstieg ebenfalls ca. 4 Stunden nach LPS-Injektion und dauerte aber über mehr als 5 Std. an.

Die PBS-Gabe löste bei beiden Mäusestämmen nur einen Stresspeak aus (**Abbildung 30**), der weitere Temperaturverlauf entsprach dem physiologischen Temperaturrhythmus dieser Spezies.

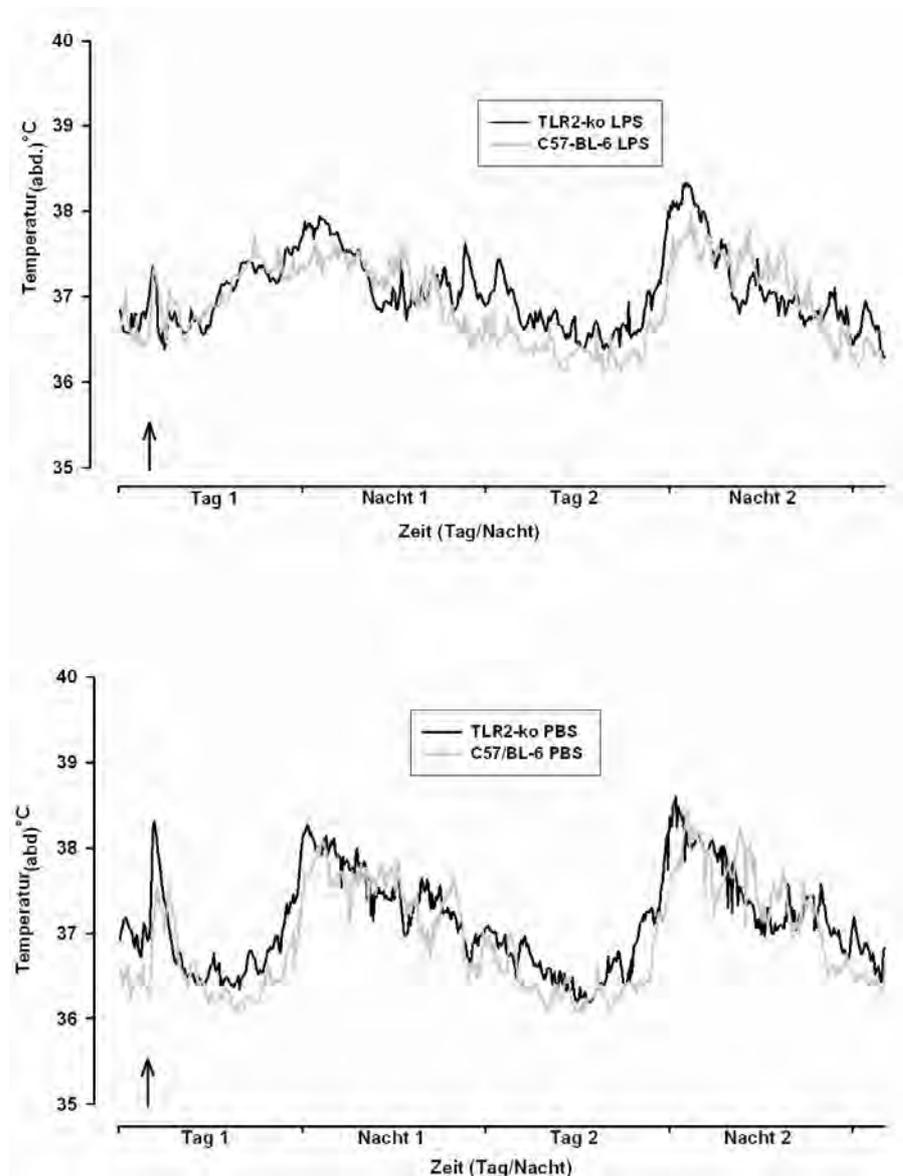


Abbildung 29: Temperaturverlauf über zwei Tage nach LPS- und PBS-Stimulation, TLR2-ko- vs C57/BL-6-Mäuse

Bei der Betrachtung der detailliert ausgewerteten Temperaturverläufe über die ersten 500 Minuten nach Injektion waren bei den ko-Mäuse signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren im Zeitintervall von 150-310 Minuten zu verzeichnen. Die C57/BL-6-Mäuse zeigten zwischen 245-540 Minuten nach Injektion signifikante Temperaturunterschiede bei LPS versus PBS-Behandlung. Der Vergleich zwischen den Tierstämmen ergab im Zeitintervall zwischen 330-440 Minuten nach Injektion deutliche Unterschiede, wobei in diesem Zeitraum die Temperaturen der C57/BL-6-Mäuse höher lagen. Durch LPS (im Gegensatz zu MALP-2 oder FSL-1) ließ sich somit bei den TLR2-ko-Mäusen eine Fieberreaktion auslösen, die jedoch im Vergleich zu den Antworten der Wildtyp-Mäuse etwas verkürzt ausfiel, dafür aber früher einsetzte (siehe **Abbildung 30**).

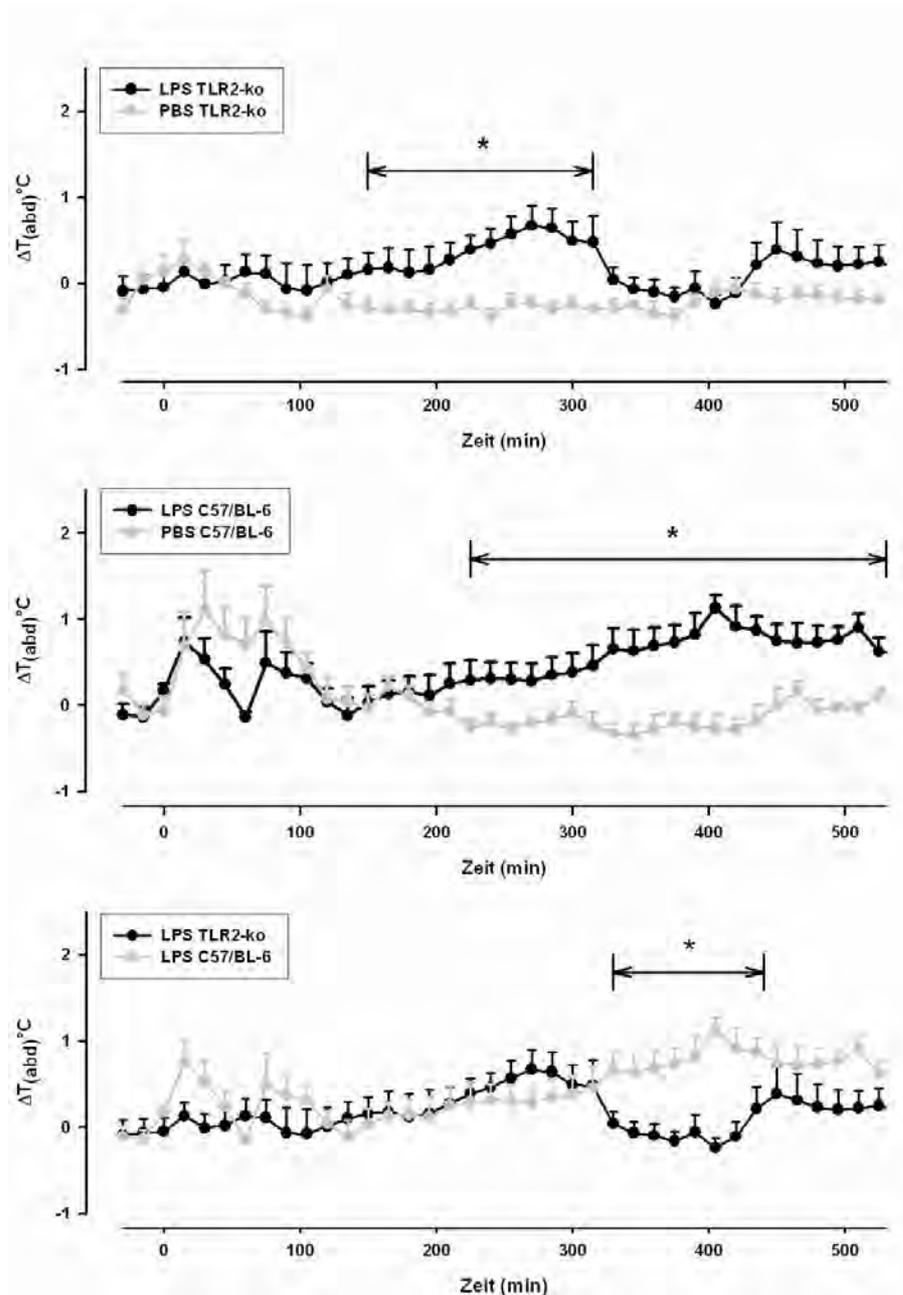


Abbildung 30: Detaillierter 500min-Ausschnitt nach der Injektion von LPS oder PBS (Lösungsmittel) bei TLR2-ko- und C57/BL-6-Mäusen. Wegen Variationen der Ausgangstemperaturen vor der Injektion werden die mittleren Temperaturverläufe der Tiergruppen als Differenz in $^\circ\text{C} \pm \text{S.E.M.}$ zur mittleren Temperatur abgegeben, die während der 120 Minuten vor der Injektion gemessen wurde. Zum Zeitpunkt "0" erfolgte die jeweilige Injektion. Horizontale Balken mit Stern zeigen die Zeiträume an, innerhalb derer signifikante Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen errechnet wurden.

2.3.2. Aktivitätsänderung nach LPS-Stimulation

Aktivität	LPS-Stimulation	PBS-Stimulation
<p>TLR2-ko-Mäuse (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p>T1: 2684±517 (p= 0,0291; F= 5,5) N1: 4963±1270 (p= 0,0374; F= 4,9) T2: 3385±473 N2: 6797±1026 (n= 12)</p> <p>Je am ersten Tag und in der ersten Nacht lag ein signifikanter Unterschied zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren vor</p>	<p>T1: 4692±781 N1: 10981±2669 T2: 4487±916 N2: 11383±2259 (n=12)</p>
<p>C57/BL-6-Mäuse (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p>T1: 2055±631 N1: 2584±520 (p= 0,0086; F= 9,5) T2: 1873±353 N2: 3953±984 (n= 9)</p> <p>Nur in der ersten Nacht zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den LPS- und PBS-stimulierten Tieren</p>	<p>T1: 3869±924 N1: 6415±1191 T2: 2064±311 N2: 7102±1147 (n=7)</p>

TLR2-ko vs C57/BL-6 (Aktivitätscounts/12 Std.)	Bis auf den zweiten Tag (p= 0,0277; F= 5,8) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tierstämmen	Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen
---	---	--

Nach LPS-Gabe waren deutliche Veränderungen der Aktivität bei beiden Stämmen festzustellen. Sowohl bei den ko-Mäusen als auch bei den C57/BL-6 konnte eine Reduktion der Aktivität nach LPS-Behandlung nachgewiesen werden. Bei den ko-Mäusen war diese am ersten Tag und in der ersten Nacht statistisch signifikant. Die C57/BL-6 zeigten nur in der ersten Nacht eine signifikante Reduktion der motorischen Aktivität im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren. Zwischen den Tierstämmen wurden bis auf den zweiten Tag, an dem die Aktivität der LPS-behandelten C57/BL-6 im Vergleich zu den TLR2-ko-Mäusen signifikant niedriger lag, keine weiteren Unterschiede festgestellt.

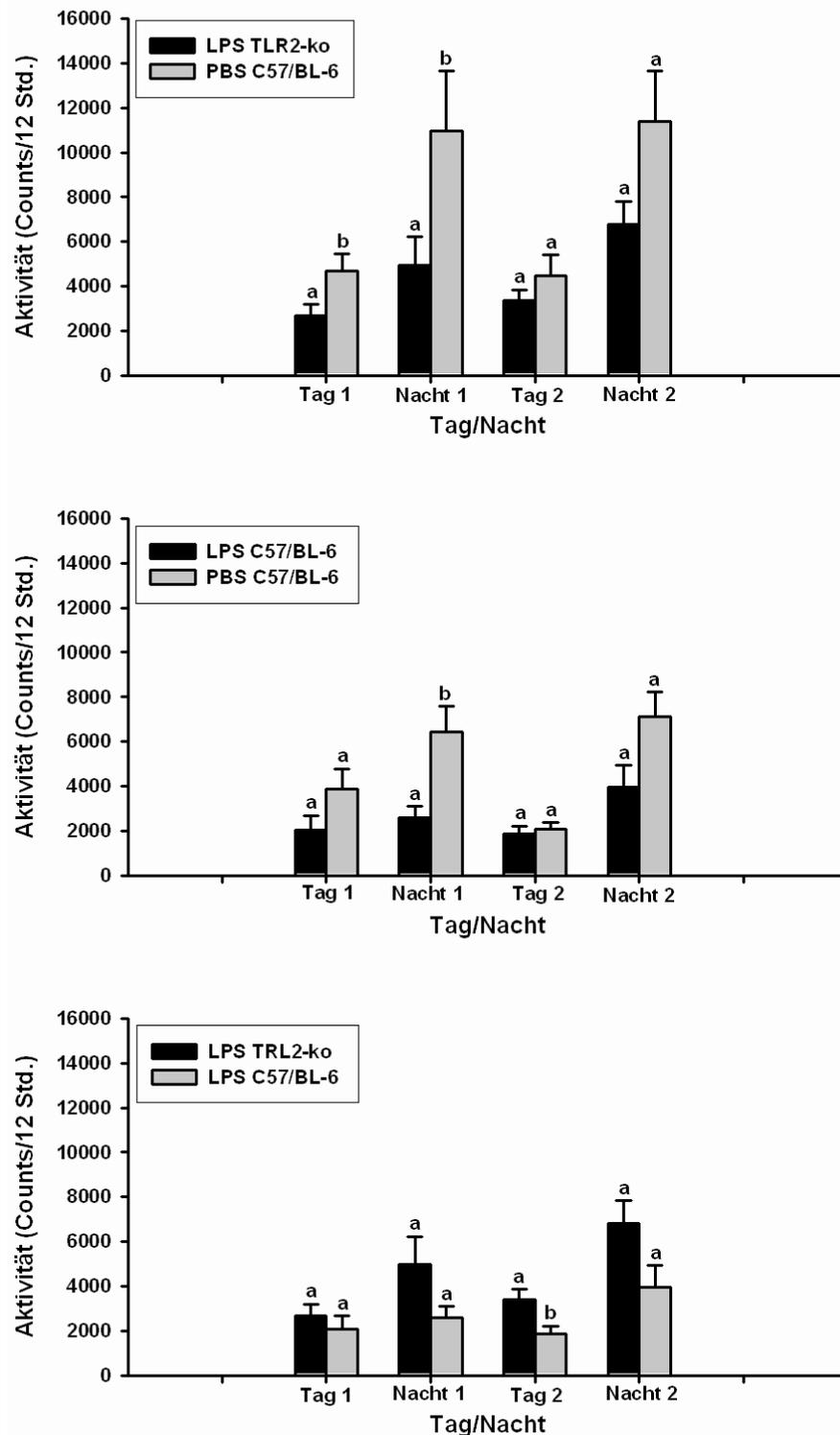


Abbildung 31: Vergleich der mittleren motorischen Aktivität der LPS- und PBS-behandelten ko-Mäuse mit den bei C57/BL-6-Mäusen gemessenen Werte. Die Aktivitätsdaten sind jeweils über Zeiträume von 12 Stunden kumuliert (Licht- und Dunkelphasen) und als Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen eines Untersuchungsintervalls zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an.

2.3.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF- α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit LPS

2.3.3.1. Plasmawerte von TNF- α

TNF α	LPS Stimulation	PBS-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	84236 \pm 29943 pg /ml (n=5)	- (n=5)
C57/BL-6-Mäuse	107111 \pm 31104 pg/ml (n=5)	- (n=5)
TLR2-ko vs C57/BL-6	kein signifikanter Unterschied	

Nach LPS-Stimulation zeigten beide Tiergruppen massive Anstiege von TNF- α im Blutplasma. Bei den TLR2-ko-Mäusen wurden 90 Minuten nach LPS-Injektion 84236 \pm 29943 pg/ml und bei den C57/BL-6 107111 \pm 31104 pg/ml TNF- α nachgewiesen, Werte, die sich statistisch nicht voneinander unterschieden. Eine PBS-Stimulation ließ bei beiden Tiergruppen die zirkulierenden TNF- α -Spiegel nicht über die Nachweisgrenze von 6 pg/ml ansteigen.

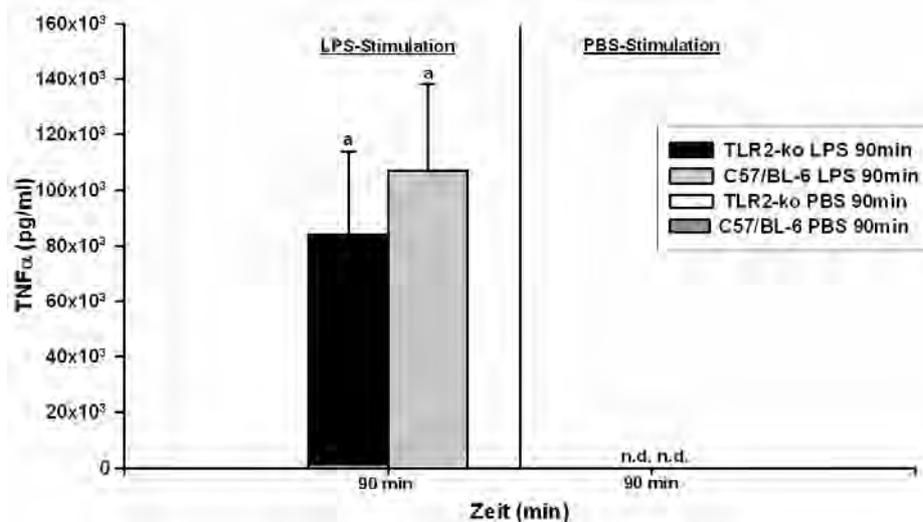


Abbildung 32: TNF α -Konzentrationen im Plasma nach LPS- und PBS-Stimulation bei TLR2-ko- und C57/BL-6-Mäusen. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm S.E.M., die gleichen Buchstaben über den Säulen der LPS-behandelten Tiergruppen zeigen an, dass kein statistisch signifikanter Unterschied vorlag.

2.3.3.2. Plasmawerte von IL-6

IL-6	LPS Stimulation	PBS-Stimulation
TLR2-ko-Mäuse	14346±3930 IU/ml (p= 0,012; F= 12,6)	147±48 IU/ml
C57/BL-6-Mäuse	13477±5429 IU/ml (p= 0,0033; F= 19,0)	182±90 IU/ml
TLR2-ko vs C57/BL-6	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied

Entsprechend den TNF α -Werten waren auch die IL-6-Werte der beiden Tierstämme nach Stimulation mit LPS deutlich erhöht. Bei den ko-Mäusen wurden 14346±3930 IU/ml IL-6 gemessen, die Kontrolltiere zeigten mit 13477±5429 IU/ml nahezu gleiche Werte. Im Plasma beider Stämme wurden 90 Minuten nach Injektion von PBS ähnliche basale IL-6-Spiegel gemessen. Zwischen den beiden Stämmen konnten weder nach LPS- noch nach PBS-Stimulation signifikante Unterschiede bezüglich der zirkulierenden IL-6-Konzentrationen festgestellt werden. Die Pyrogen-behandelten Tiere hoben sich jedoch jeweils von den PBS-behandelten Mäusen deutlich ab. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den TLR2-ko-Mäusen nach LPS-Behandlung (im Gegensatz zur Behandlung mit MALP-2 und FSL-1) eine im Vergleich zu den Kontrolltieren uneingeschränkte Zytokinproduktion stattfindet.

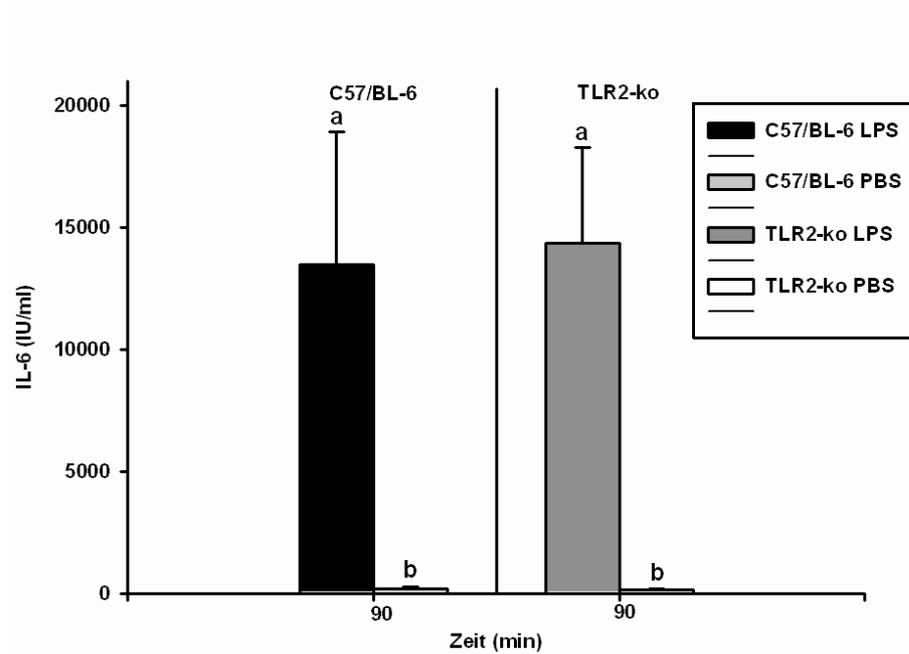


Abbildung 33: IL-6-Werte 90 Minuten nach LPS- bzw. PBS-Stimulation bei C57/BL-6- und TLR2-ko-Mäusen. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm S.E.M., die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an. Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander.

3. SH- und WKY-Ratten

3.1. Blutdruckmessungen

Bei den SHR handelt es sich um einen Rattenstamm, der unter spontanem Bluthochdruck leidet. Um diesen phänotypischen Unterschied zu charakterisieren, wurden Blutdruckmessungen bei den SHR wie auch bei ihren genetischen Kontrolltieren, den WKY-Ratten, durchgeführt. Die Messungen bei beiden Rattenstämme ergaben signifikante Unterschiede, bei denen die SHR (n=8) durchschnittlich einen systolischen Blutdruck von 175 mmHg, der damit deutlich über den 138 mmHg der WKY-Ratten (n=8) lag, zeigten. Statistisch ergaben sich signifikante Unterschiede ($p = <0,0001$; $F = 72,6$). Die Herzfrequenz der beiden Rattenstämme unterschied sich mit 342 Schlägen/min seitens der SHR gegenüber 346 Schlägen/min der WKY kaum (Abbildung 34) und zeigte keinen signifikanten Unterschied.

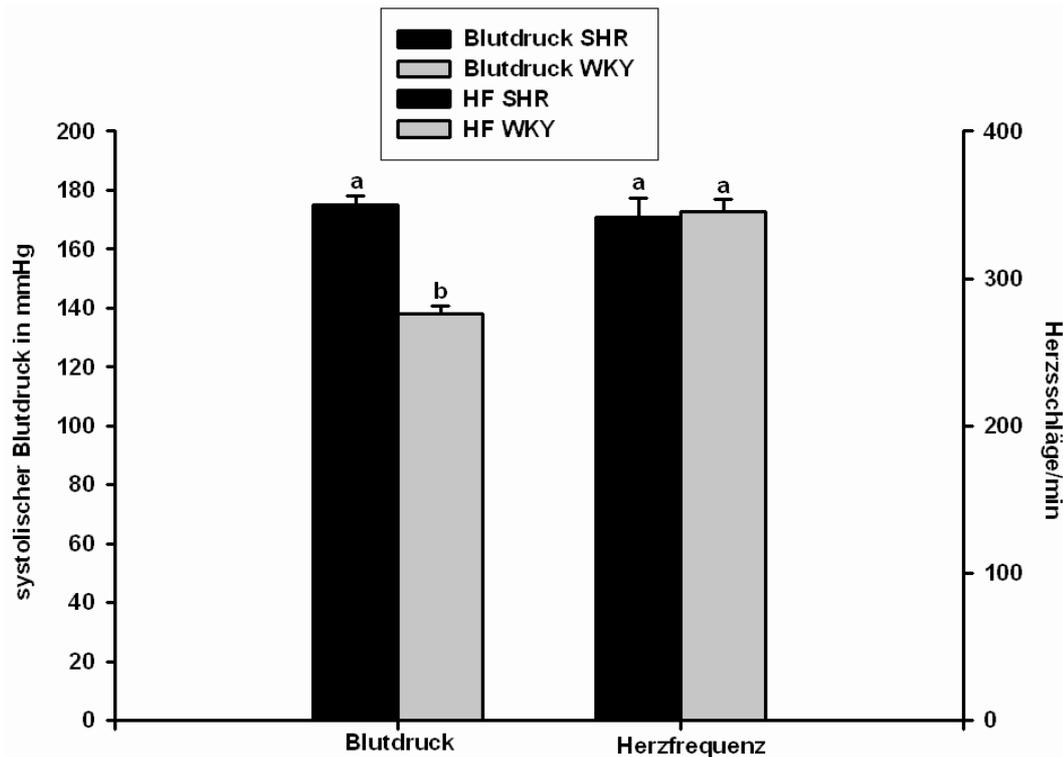


Abbildung 34 : Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz bei SHR und WKY-Ratten. Die Säule präsentieren jeweils Mittelwerte \pm S.E.M. (n=8). Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied an.

3.2. MALP-2-Stimulation

3.2.1. Telemetrische Ergebnisse

3.2.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer MALP-2-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Temperaturentwicklung	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
SH-Ratten	Neben dem Stresspeak im Zeitraum von 180-530 min ($p < 0,0001$; $F = 40,3$) signifikante Temperaturerhöhung auf $37,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (n=8)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen $37,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (n=10)

WKY-Ratten	Stresspeak mit anschliessendem signifikantem Fieber von 38,1±0,3°C bei 150-530 min (p= <0,0001; F= 129,1) (n=13)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen 37,2 °C (n=10)
SH- vs WKY	Im Bereich von 170-435 min signifikante Temperaturunterschiede (p= 0,0121; F= 7,4) bei der Fieberentwicklung zwischen den beiden Rattenstämmen	Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen

Für die telemetrischen Untersuchungen der Ratten wurde bei allen verwendeten Pyrogenen eine Dosierung von 100µg/kg KGW gewählt. Die Aufzeichnung der Messung begann mit dem Einschalten des Lichtes 120 Minuten vor der Stimulation und endete 2 Tage nach dem Injektionszeitpunkt. Die Normalwerte der Körpertemperatur bei der Ratte liegen dem zirkadianen Rhythmus folgend tagsüber bei ca. 37°C und steigen nachts durch die erhöhte Aktivität auf bis zu 38,5°C an. Die Ratten zeigten im Allgemeinen direkt nach der Injektion von Pyrogenen, wie auch den Kontrolllösungen eine transiente Temperaturerhöhung auf knapp 38°C, welche nach ca. 40 min wieder auf Normaltemperatur absank. Diese als Stresspeak bezeichnete Temperaturerhöhung erfolgt auf Grund des Handlings der Ratten und ist als Stressreaktion der Tiere zu verstehen. 120 min nach der Stimulation folgte bei den MALP-2 behandelten SHR eine weitere, langsam ansteigende Temperaturerhöhung auf einen Wert von 37,7±0,2°C, welche über den ersten Tag anhielt. Diese Temperaturerhöhung konnte bei den Cremophor-behandelten Tieren nicht festgestellt werden, hier blieb die Temperatur während des Tages konstant bei der physiologischen Temperatur von 37,2±0,1°C (p= <0,0001; F= 40,3). Die WKY-Ratten zeigten 150 Minuten nach MALP-2-Injektion einen Temperaturanstieg auf ein Maximum von bis zu 38,1±0,3°C, wohingegen sich die Temperatur der Cremophor-behandelten Tiere bei 37,2 °C einpendelte. Die Temperaturen zeigten deutlich signifikante Unterschiede (p= <0,001; F= 129,1). Bei Betrachtung der beiden Rattenstämme zueinander konnten im Bereich von 170-435 Minuten signifikante Temperaturdifferenzen

ermittelt werden ($p= 0,0121$; $F= 7,4$). In diesem Zeitraum zeigten die SH-Ratten eine abgeschwächte Fieberreaktion (Abbildung 35, unten).

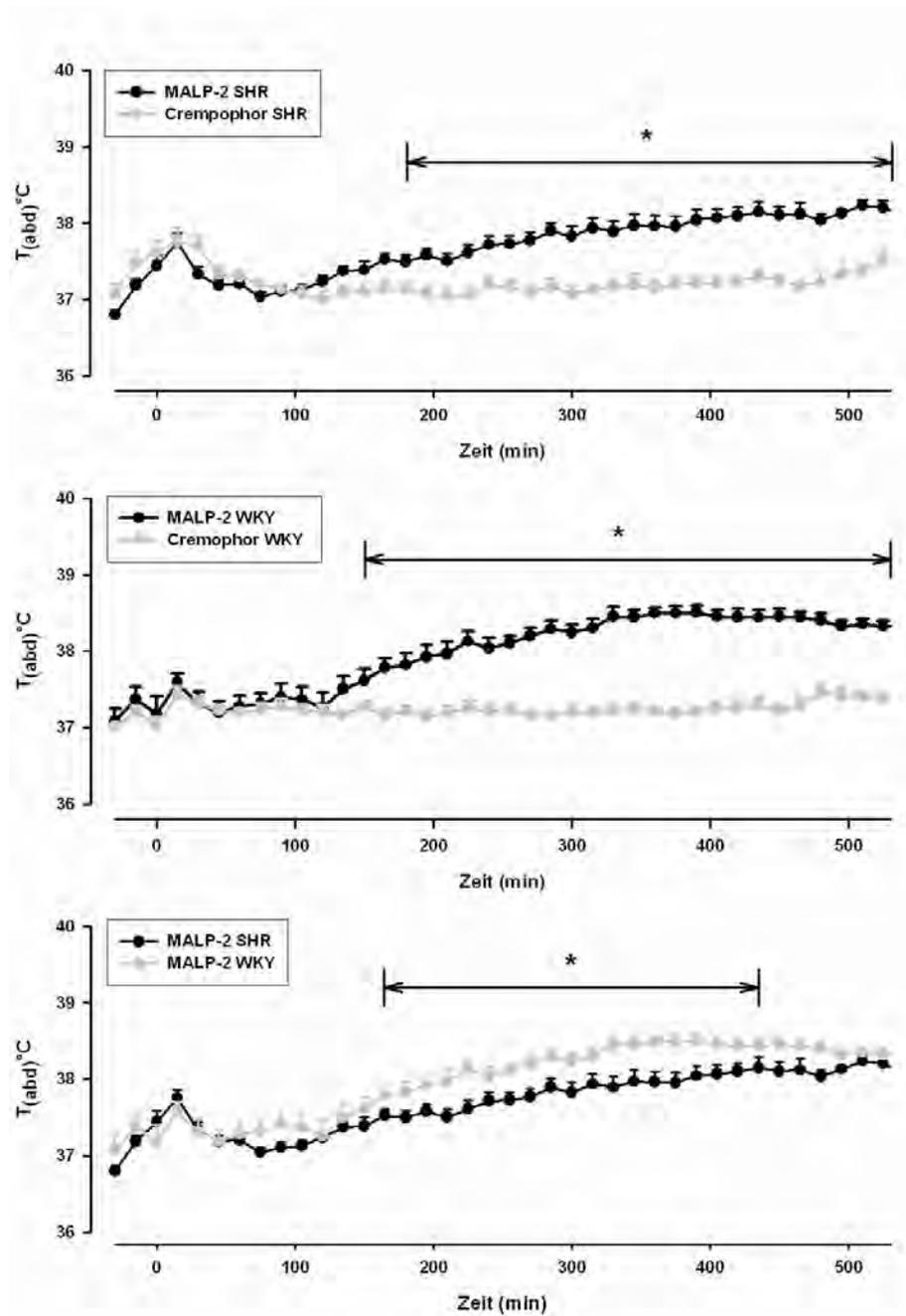


Abbildung 35: 500 min-Zeitausschnitt des Injektionstags nach MALP-2-Stimulation bei SHR und WKY-Ratten. Der Zeitpunkt 0 zeigt den Injektionszeitpunkt an. Sowohl bei den SHR als auch den WKY-Ratten konnten in bestimmten Zeitintervallen signifikante Unterschiede zwischen den MALP-2- und Cremophor-behandelten Tieren festgestellt werden. Im Zeitintervall von 170-435 Minuten wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden MALP-2-stimulierten Rattenstämmen ermittelt, wobei die WKY ein höheres Fieber entwickelten als die SHR. Horizontale Balken mit Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den jeweils dargestellten Gruppen an.

3.2.1.2. **Aktivitätsänderung nach intraperitonealer MALP-2-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.**

Aktivität	MALP-2-Stimulation	Cremophor-Stimulation
<p style="text-align: center;">SH-Ratten (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p style="text-align: center;">T1: 488 ± 50 N1: 463 ± 63 (p= 0,002; F= 19,5) T2: 395 ± 53 N2: 666 ± 78 (p= <0,0001; F= 37,6) (n= 12)</p> <p style="text-align: center;">In beiden Versuchsnächten lag ein signifikanter Unterschied zwischen MALP-2- und Cremophor-stimulierten Tieren vor</p>	<p style="text-align: center;">T1: 584 ± 63 N1: 816 ± 49 T2: 576 ± 77 N2: 858 ± 54 (n=12)</p>
<p style="text-align: center;">WKY-Ratten (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p style="text-align: center;">T1: 461 ± 45 N1: 394 ± 29 (p= <0,0001; F= 56,8) T2: 428 ± 40 N2: 574 ± 43 (p= 0,0007; F= 15,4) (n= 13)</p> <p style="text-align: center;">In beiden Nächten zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den MALP-2- und Cremophor-stimulierten Tieren</p>	<p style="text-align: center;">T1: 507 ± 43 N1: 780 ± 41 T2: 496 ± 36 N2: 825 ± 36 (n=10)</p>

<p style="text-align: center;">SH vs WKY (Aktivitätscounts/12 Std.)</p>	<p style="text-align: center;">Bis auf die zweite Nacht , ($p= 0,019$; $F= 6,4$), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tierstämmen</p>	<p style="text-align: center;">Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen</p>
--	--	---

Bei der Aktivitätsmessung wurden jeweils Tag und Nacht getrennt voneinander ausgewertet. Die Graphik zeigt die gemittelte kumulierte Anzahl der Aktivitätscounts über jeweils 12 Stunden mit dem zugehörigen Standardfehler. Der Messzeitraum entspricht je den Hell- und Dunkelphasen des Versuchs. Die Messungen zeigten, dass bei beiden Rattenstämmen eine Reduktion der Aktivität während beider Versuchsnächte beobachtet werden konnte. In der zweiten Nacht fiel die Aktivitätsminderung bei den WKY stärker aus, so dass hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Rattenstämmen auftrat ($p= 0,019$; $F= 6,4$). Die genauen Daten sind der oben zusammengestellten Tabelle zu entnehmen.

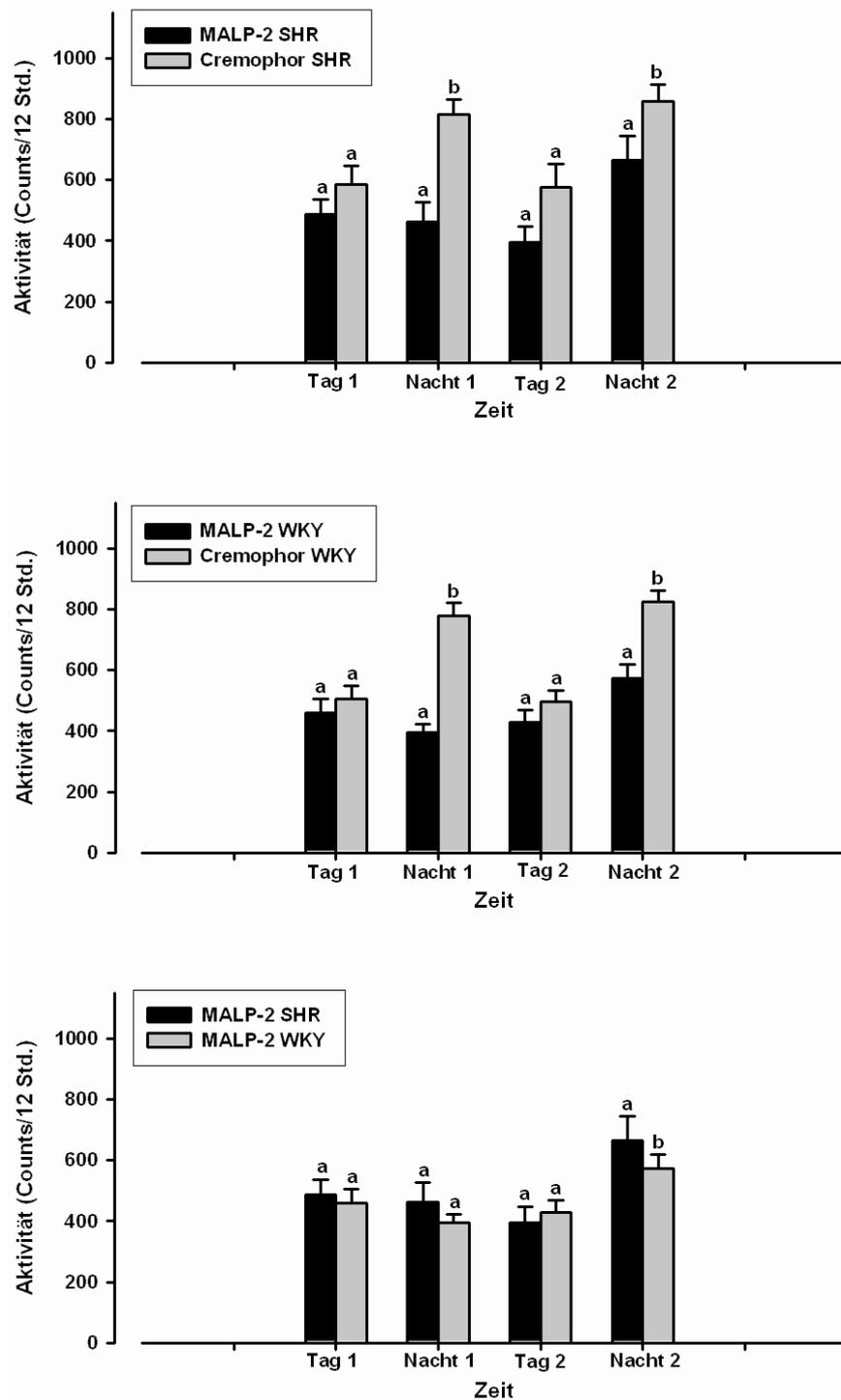


Abbildung 36: Vergleich der mittleren Aktivität der MALP-2- und Cremophor-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse sind jeweils über 12 Stunden kumuliert und als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Die Auswertung erstreckt sich über einen Zeitraum von zwei Tagen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.2.1.3. Futteraufnahme nach intraperitonealer MALP-2-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Futteraufnahme (g/Tag)	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
SH-Ratten	<p style="text-align: center;">Tag 0: $20 \pm 0,49\text{g}$ (p= 0,022; F= 6,1)</p> <p style="text-align: center;">Tag 1: $10 \pm 1,4\text{g}$ (p= <0,0001; F= 99,3)</p> <p style="text-align: center;">Tag 2: $19 \pm 1,21\text{g}$ (p= 0,0026; F= 11,6) n=(12)</p> <p style="text-align: center;">An allen Versuchstagen trat eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme auf</p>	<p style="text-align: center;">$22 \pm 0,41\text{g}$</p> <p style="text-align: center;">$21 \pm 0,58\text{g}$</p> <p style="text-align: center;">$22 \pm 0,82\text{g}$</p> <p style="text-align: center;">n=(12)</p>
WKY-Ratten	<p style="text-align: center;">Tag 0: $21 \pm 1,14\text{g}$</p> <p style="text-align: center;">Tag 1: $6 \pm 1,42\text{g}$ (p= <0,0001; F= 96,8)</p> <p style="text-align: center;">Tag 2: $12 \pm 0,70\text{g}$ (p= <0,0001; F= 95,1) n=(13)</p> <p style="text-align: center;">Nach Stimulation trat an den Versuchstagen eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme auf</p>	<p style="text-align: center;">$19 \pm 0,37\text{g}$</p> <p style="text-align: center;">$19 \pm 0,19\text{g}$</p> <p style="text-align: center;">$20 \pm 0,33\text{g}$</p> <p style="text-align: center;">n=(10)</p>

<p style="text-align: center;">SH- vs WKY</p>	<p style="text-align: center;">Am Tag 2 wurden signifikante Unterschiede zwischen den Rattenstämmen gemessen, die WKY zeigten eine deutlich stärkere Reduktion der Futteraufnahme (p= 0,0015; F= 13,0)</p>	<p style="text-align: center;">Kein signifikanter Unterschied in der Futteraufnahme</p>
--	---	--

Die Messung der Futteraufnahme begann 24 Stunden vor der Stimulation und endete 48 Stunden nach der Pyrogengabe. Die Graphik zeigt die gemittelte kumulierte Futteraufnahme über jeweils 24 Stunden mit dem zugehörigen Standardfehler. Bei beiden Rattenstämmen wurde nach MALP-2-Stimulation eine deutliche Senkung der Futteraufnahme beobachtet werden. Die verminderte Aufnahme des Futters fiel am 2.Tag nach MALP-Applikation bei den WKY im Vergleich zu den SHR signifikant stärker aus (p= 0,0015; F= 13,0). Die Cremophor-stimulierten Tiere beider Rattenstämme wurden in ihrem Fressverhalten nicht beeinträchtigt. Die genaue Daten sind in der Tabelle zusehen.

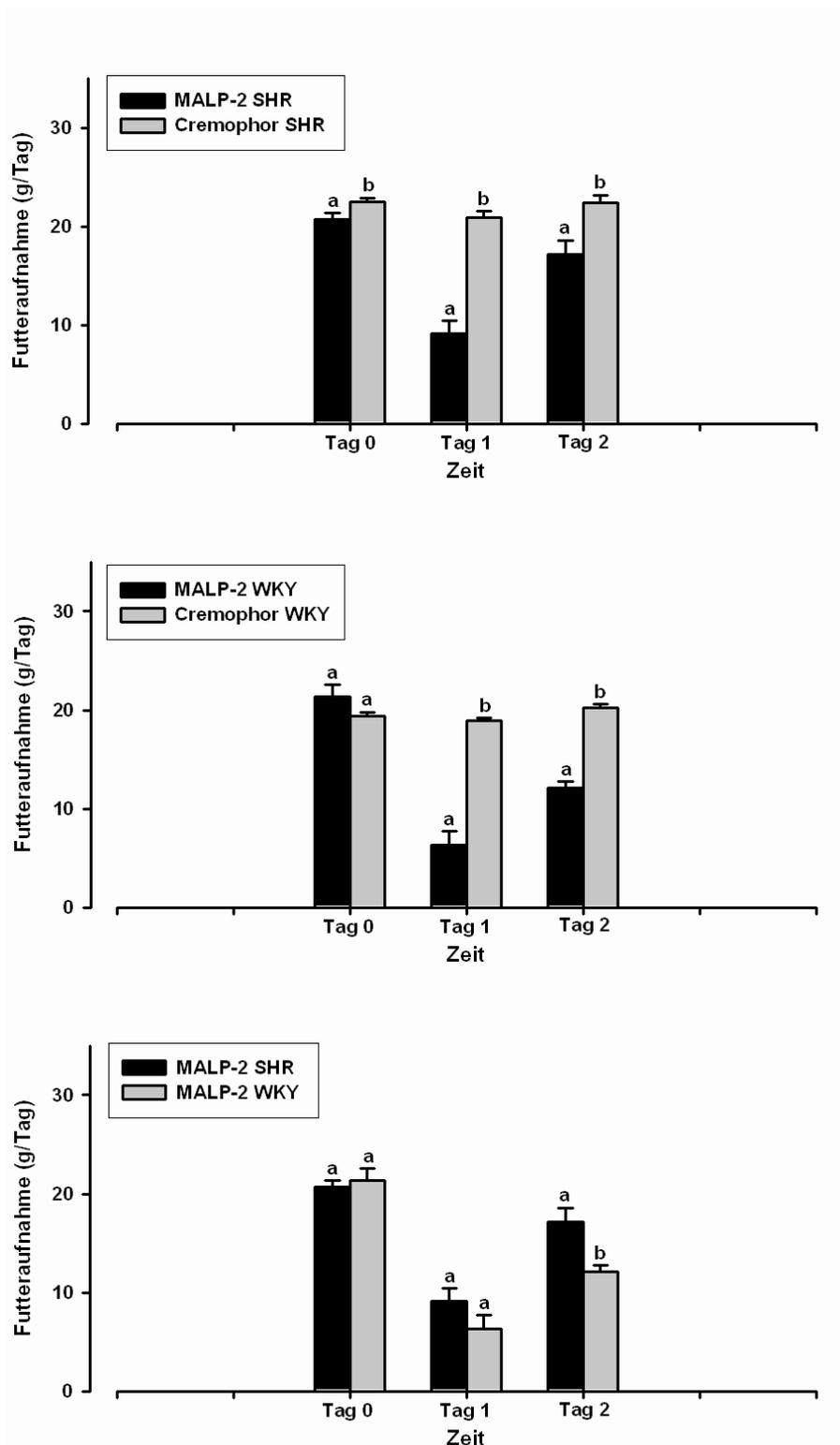


Abbildung 37: Vergleich der mittleren Futtermittelaufnahme der MALP-2- und Cremophor-behandelten SHR mit den WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Tag 0 stellt den Futterverbrauch 24 Stunden vor der Injektion von MALP-2 dar und zeigt somit die Futtermittelaufnahme der unbehandelten Tiere. Tag 1 und 2 stellen die Folgetage nach der Applikation der Substanzen dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.2.1.4. Wasseraufnahme nach intraperitonealer MALP-2-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Wasseraufnahme (g/Tag)	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
SH-Ratten	<p>Tag 0: 25 ± 1,38g</p> <p>Tag 1: 13 ± 1,61g (p= <0,0001; F= 109,7)</p> <p>Tag 2: 27 ± 0,82g (p= 0,0026; F= 11,5) n=(12)</p> <p>An beiden Tagen post stimulationem wurden signifikante Senkungen der Wasseraufnahme gemessen</p>	<p>30 ± 1,29g</p> <p>29 ± 1,09g</p> <p>31 ±1,25g</p> <p>n=(12)</p>
WKY-Ratten	<p>Tag 0: 26 ± 0,77g</p> <p>Tag 1: 11 ± 2,05g (p= <0,0001; F= 78,0)</p> <p>Tag 2: 26 ± 1,63g n=(13)</p> <p>Am Stimulationstag trat eine signifikante Reduktion der Wasseraufnahme auf</p>	<p>27 ± 1,04g</p> <p>28 ± 0,79g</p> <p>28 ± 0,89g n=(10)</p>

SH- vs WKY	Zwischen den beiden Rattenstämmen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden	kein signifikanter Unterschied
-------------------	---	---------------------------------------

Wie bei der Futtermessung begann die Messung der Wasseraufnahme 24 Stunden vor der Stimulation und endete 48 Stunden nach der Pyrogengabe. Die Graphik zeigt die gemittelte kumulierte Wasseraufnahme über jeweils 24 Stunden mit dem zugehörigen Standardfehler. Beide MALP-2-behandelten Rattenstämme zeigten am ersten Tag nach Pyrogenapplikation eine signifikante Reduktion der Wasseraufnahme im Vergleich zu den jeweiligen Cremophor-Kontrollgruppen. Bei den SH-Ratten war die Aufnahme von Trinkwasser im Gegensatz zu den WKY-Ratten auch am 2. Tag nach der Behandlung mit MALP-2 noch signifikant reduziert. Zwischen den SH- und WKY-Ratten konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Trinkverhaltens festgestellt werden (genauere Daten siehe Tabelle). Beim Vergleich der Cremophor-behandelten Tiere wurde ein größerer Wasserverbrauch bei den SHR festgestellt, der sich allerdings nicht als statistisch relevant herausstellte.

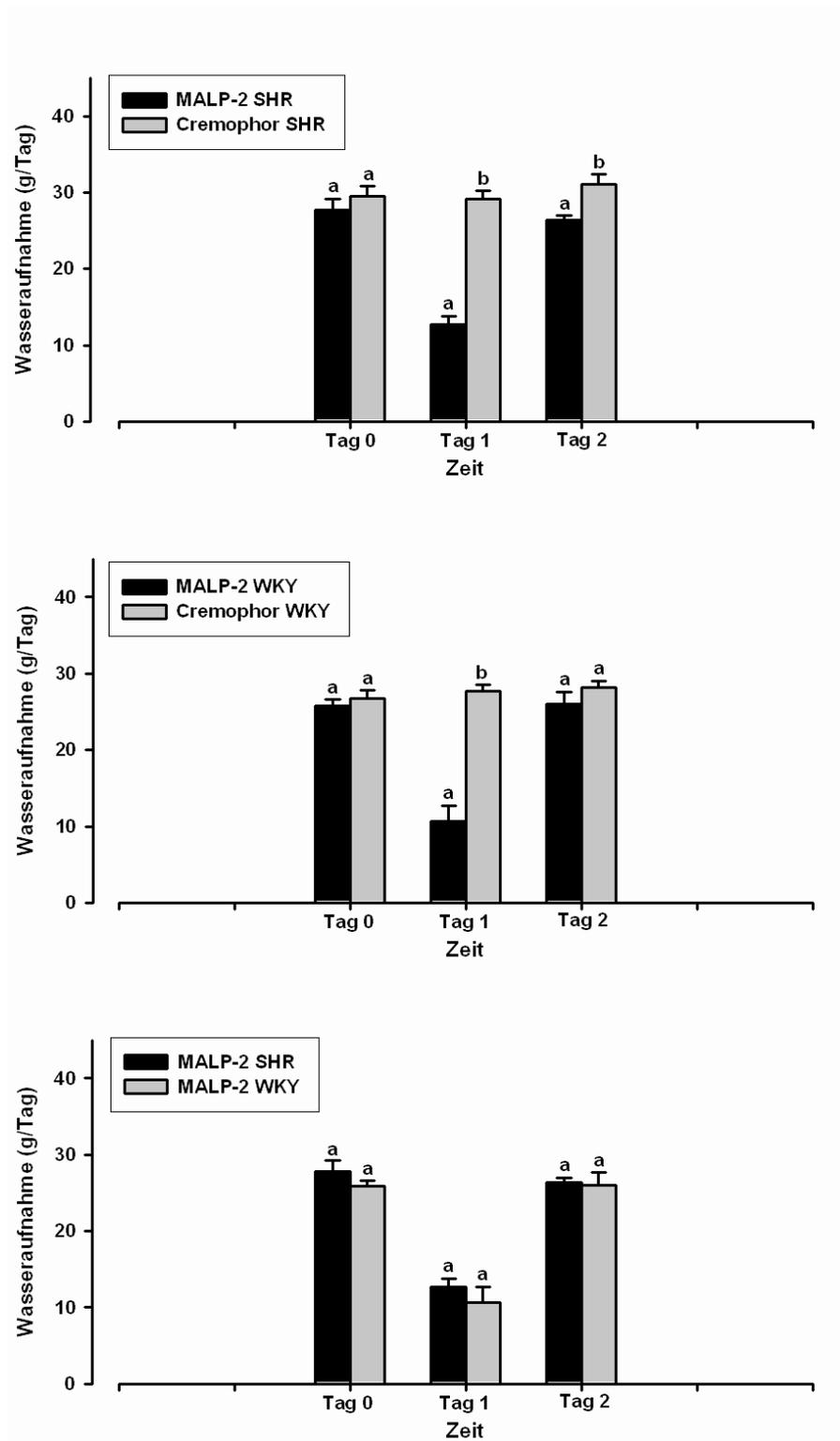


Abbildung 38: Vergleich der mittleren Wasseraufnahme der MALP-2- und Cremophor-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Tag „0“ stellt den Wasserverbrauch 24 Stunden vor der Injektion von MALP-2 dar und zeigt somit die Wasseraufnahme der unbehandelten Tiere. Die Tage 1 und 2 stellen den Injektionstag und den Folgetage nach der Applikation der jeweiligen Substanz dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.2.1.5. Gewichtsveränderung nach intraperitonealer MALP-2-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Gewichtsveränderung (g/Tag)	MALP-2 Stimulation	Cremophor-Stimulation
SH-Ratten	<p>Tag 0: $6,06 \pm 1,52\text{g}$</p> <p>Tag 1: $-9,46 \pm 2,91\text{g}$ (p= <0,0001; F= 31,9)</p> <p>Tag 2: $1,46 \pm 0,82\text{g}$ (p= 0,0055; F= 9,5) n=(12)</p> <p>Am Injektions-, wie am Folgetag wurden signifikante Gewichtsreduktionen gemessen</p>	<p>$6,42 \pm 0,92\text{g}$</p> <p>$2,78 \pm 0,90\text{g}$</p> <p>$-0,22 \pm 0,57\text{g}$</p> <p>n=(12)</p>
WKY-Ratten	<p>Tag 0: $5,55 \pm 0,55\text{g}$</p> <p>Tag 1: $-21,06 \pm 1,27\text{g}$ (p= <0,0001; F= 210,9)</p> <p>Tag 2: $1,59 \pm 1,93\text{g}$ n=(13)</p> <p>Am Injektionstag kam es zu einer signifikanten Gewichtsabnahme</p>	<p>$4,78 \pm 0,54\text{g}$</p> <p>$4,83 \pm 0,97\text{g}$</p> <p>$4,63 \pm 0,70\text{g}$ n=(10)</p>

SH- vs WKY	Signifikanter Unterschied am Tag 1 nach MALP-2- Applikation, bei den WKY fiel die Gewichtsabnahme deutlicher aus (p= 0,032; F= 5,2)	
-------------------	--	--

Um die Gewichtsveränderungen festzustellen, wurden die Ratten an den Versuchstagen ungefähr zur selben Zeit um ca. 9 Uhr gewogen. Die Gewichtsentwicklung wurde als Differenz zum Gewicht des Vortages ermittelt. Die Gewichtsentwicklung der SHR wie der WKY-Ratten zeigte am Tag nach der Pyrogengabe einen deutlichen Einbruch, der bei den WKY-Ratten signifikant stärker ausfiel. Bei beiden Rattenstämmen kam es am 2. Tag nach der Behandlung mit MALP-2 wieder zu einer Gewichtszunahme. Bei den SH-Ratten wurde am 2.Tag nach der Injektion ein minimaler Gewichtsverlust beobachtet.

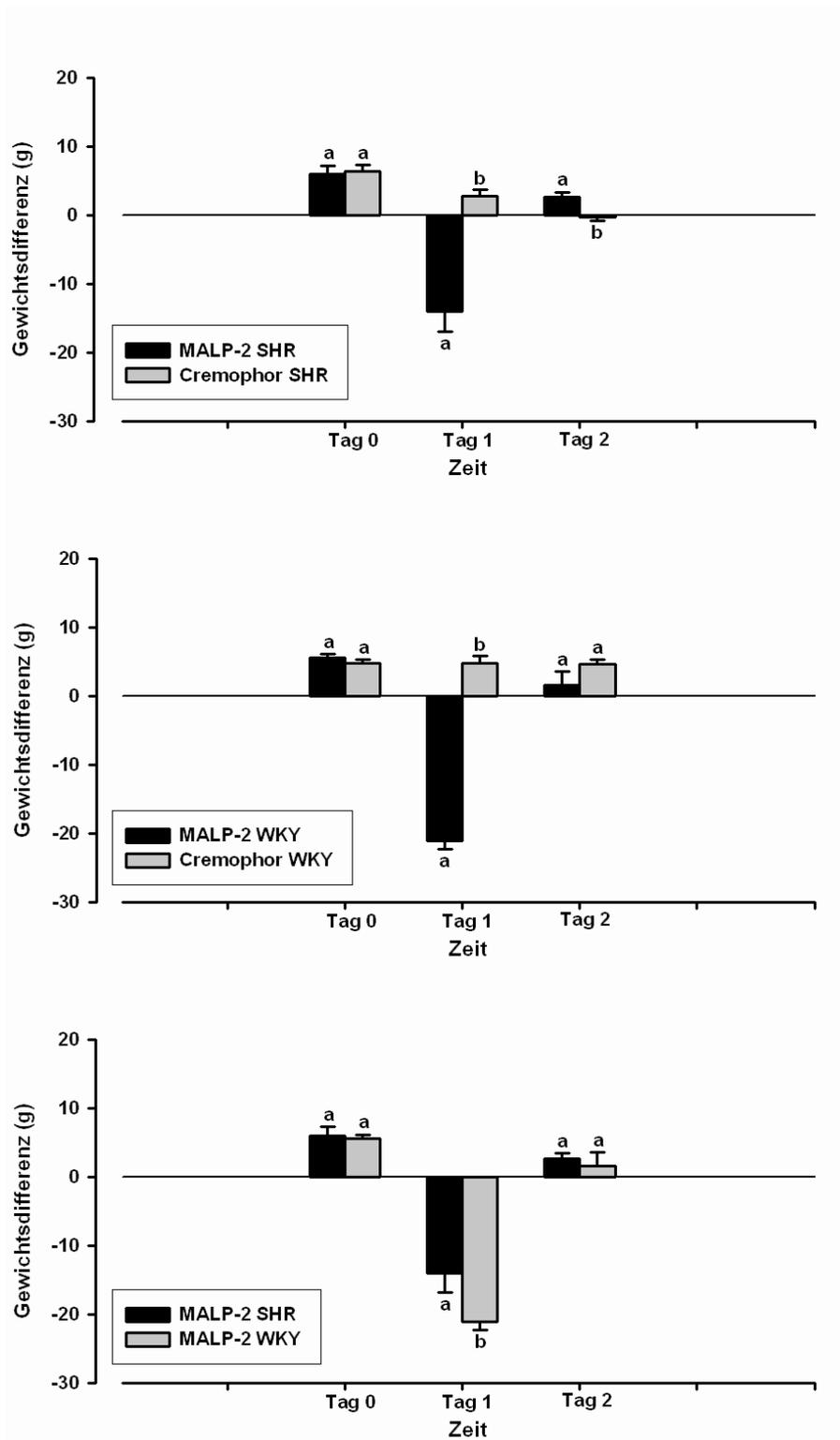


Abbildung 39: Vergleich der mittleren Gewichtsentwicklung der MALP-2- und Cremophor-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt, als Differenz zum Vortag angegeben und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Wie bei den Abb. der Futter- und Wasseraufnahme zeigt hier der Tag „0“ die Gewichtsentwicklung vor Pyrogengabe. Die Tage 1 und 2 stellen den Injektionstag und den Folgetag dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.3. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit MALP-2

3.3.1.1. Plasmawerte von TNF α

TNF α	MALP-2-Stimulation	Cremophor-Stimulation
SH-Ratten	60 min post injectionem: 25758 \pm 8955 pg/ml 120 min post injectionem: 4389 \pm 827 pg/ml (n=4-5)	- (n=4)
WKY-Ratten	60 min post injectionem : 30476 \pm 7480 pg/ml 120 min post injectionem : 5250 \pm 1191 pg/ml (n=4-5)	- (n=4)
SHR vs WKY	Weder bei den 60-, noch bei den 120-min-Werten konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen ermittelt werden	

Nach erfolgter intraperitonealer Stimulation mit 100 μ g/kg MALP-2 wurden jeweils Plasmaproben nach 60 Minuten und 120 Minuten post injectionem gesammelt, um den Verlauf der TNF α -Konzentrationen im Blut verfolgen zu können. Bei den anderen Pyrogen wurden ebenfalls nach 180 Minuten weitere Proben gesammelt, wegen der limitierten Verfügbarkeit von MALP-2 wurde in diesem Versuch darauf verzichtet. Bei den SHR, wie auch bei den WKY-Ratten konnte nach Stimulation mit MALP-2 TNF α im Plasma nachgewiesen werden, wobei die Werte nach 60 Minuten bei beiden Stämmen deutlich höher lagen als nach 120 Minuten. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen SHR und WKY-Ratten bezüglich der TNF-Freisetzung zu keinem der zu untersuchenden Zeitpunkte errechnet werden. Eine Stimulation mit Cremophor konnte bei keinem der beiden Tierstämme messbare TNF α -Werte im Blutplasma induzieren. Die genauen Messergebnisse sind der Tabelle zu entnehmen.

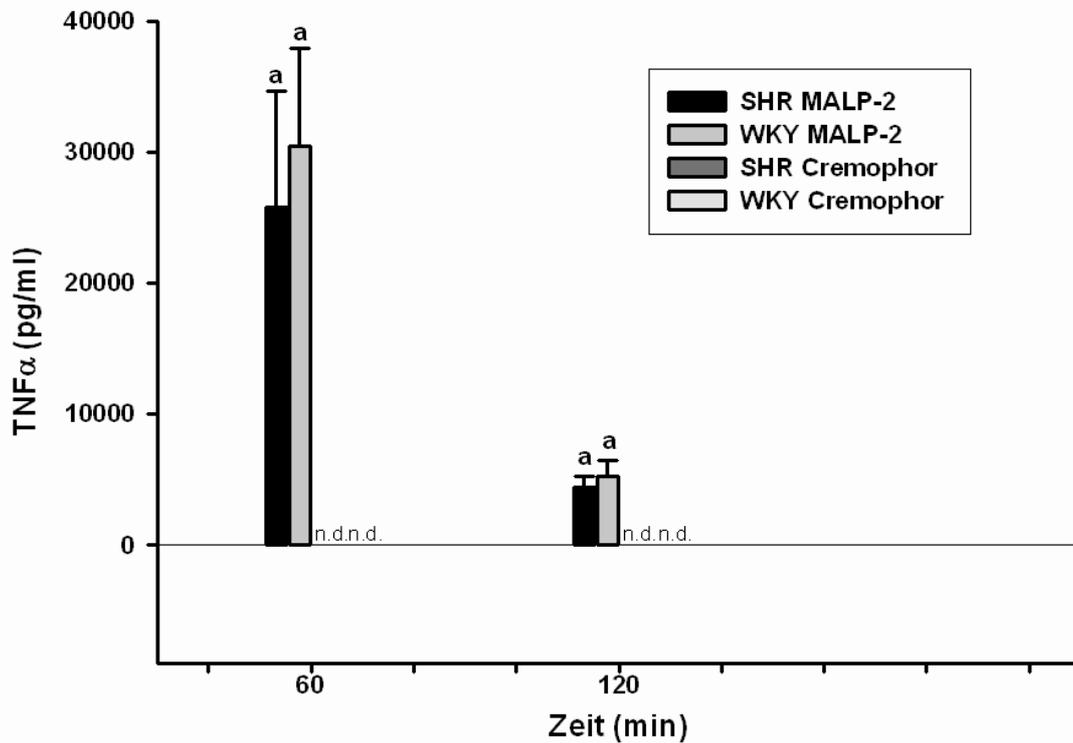


Abbildung 40: TNF α -Entwicklung 60 und 120 min nach MALP-2-Applikation im Vergleich zu den Cremophor-Kontrollgruppen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. Gleiche Buchstaben über den Säulen zeigen, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen vorliegen. Die Stimulation mit MALP-2 führte bei beiden Rattenstämmen zur TNF α -Bildung, wohingegen eine Behandlung mit Cremophor zu keinen messbaren TNF α -Werten führte (n.d.= nicht detektierbar).

3.3.1.2. Plasmawerte von IL-6

IL-6	MALP-2-Stimulation	Cremophor-Stimulation
SH-Ratten	60 min post injectionem: 1488 \pm 797 IU/ml	60 \pm 11 IU/ml
	120 min post injectionem : 4003 \pm 362 IU/ml (p= <0,0001 ; F= 116,3)	96 \pm 13 IU/ml
WKY-Ratten	60 min post injectionem : 1698 \pm 802 IU/ml	72 \pm 28 IU/ml
	120 min post injectionem : 6219 \pm 1909 IU/ml (p= 0,007 ; F= 19,4)	113 \pm 8 IU/ml

SH vs WKY	kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen	kein signifikanter Unterschied
------------------	---	---

In denselben Plasmaproben wurde auch der Verlauf der IL-6-Konzentrationen im Blut analysiert. Bei beiden Rattenstämmen konnte nach MALP-2-Stimulation ein erhöhter Gehalt an IL-6 im Plasma nachgewiesen werden, der deutlich über dem der Cremophor-behandelten Tiere lag. Die Werte lagen aber bei beiden Rattenstämmen wie bei den TNF α -Werten auch hier auf vergleichbarem Niveau, d.h. auch bezüglich der MALP-2-induzierten zirkulierenden IL-6-Konzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten.

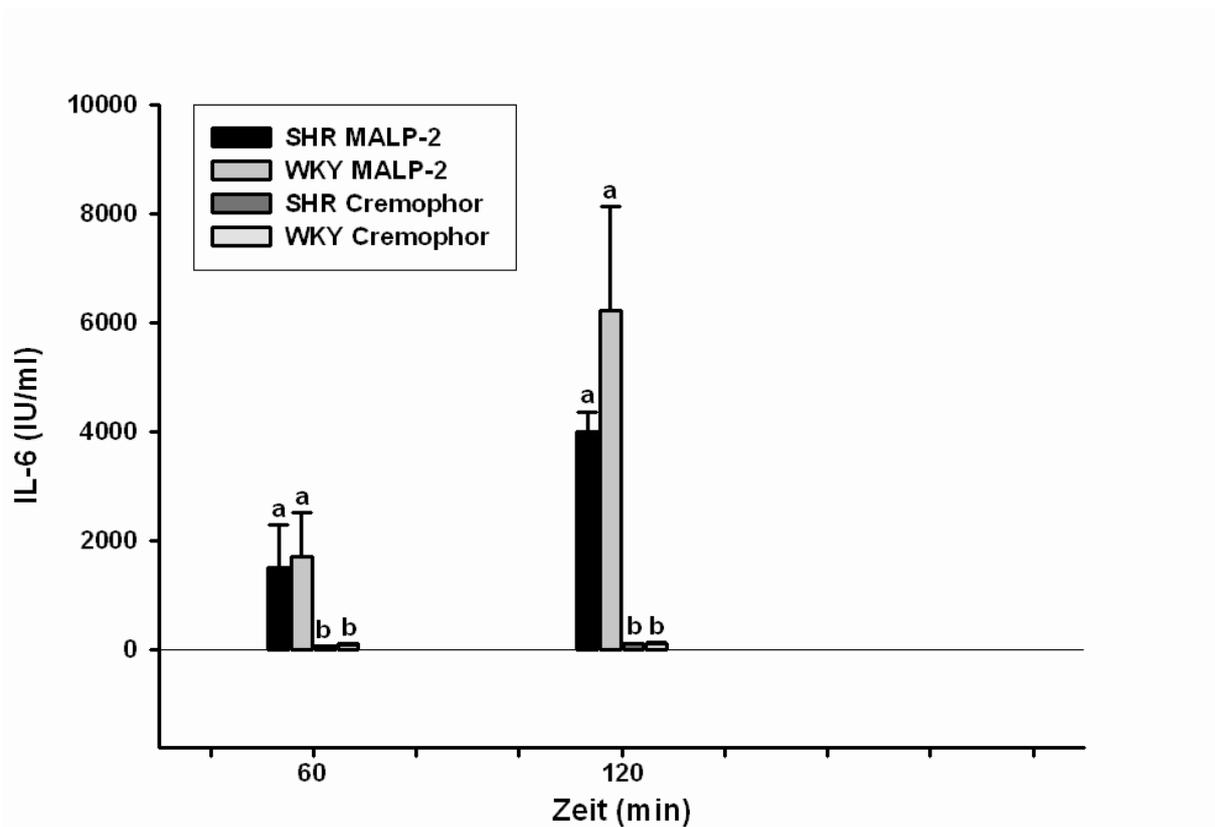


Abbildung 41: IL-6-Entwicklung 60 und 120 min nach MALP-2-Applikation im Vergleich zu den Cremophor-Kontrollgruppen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an.

3.3.2. Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach intraperitonealer Injektion von MALP-2

3.3.2.1. Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3

Der immunzytochemische Nachweis einer Akkumulation des Transkriptionsfaktors STAT3 in den Zellkernen von Gehirnstrukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke wurde geführt und quantitativ ausgewertet. Bei diesen Gehirnstrukturen handelte es sich um das Organum vasculosum terminalis (OVLT), das Subfornikalorgan (SFO), die Eminentia mediana (ME) und die Area postrema (AP). Hierdurch konnte überprüft werden, wie stark eine durch MALP-2 induzierte inflammatorische Aktivierung des Gehirns bei SHR und WKY-Ratten ausfiel. Um die immunhistochemisch angefärbten Gehirnschnitte auf ihre STAT3-Signale hin auswerten zu können, wurden mittels Durchlichtmethode Photographien in den Vergrößerungen 100, 200 und 400 angefertigt. Von den zu untersuchenden Hirnregionen wurden von 3 Versuchstieren mindesten 3 verwertbare Photographien pro Hirnregion in der 200fachen-Vergrößerung ausgewertet, indem die STAT3-positiven Zellkerne gezählt wurden. Hierzu wurde die manuelle Zählhilfe des Programms Methamorph verwendet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle und der folgenden Abbildung aufgeführt.

STAT-3-aktivierte Zellen nach MALP-2-Stimulation	SHR	WKY
OVLT	102 ± 20,4	102 ± 19,7
SFO	156 ± 17,8	171 ± 9,6
ME	28 ± 2,5	34 ± 2
AP	39 ± 4,1	36 ± 5,5

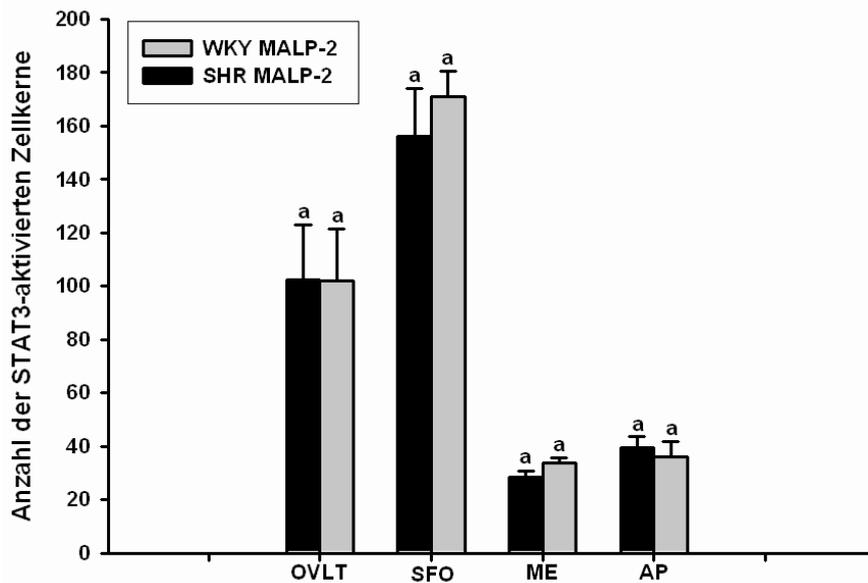


Abbildung 42: Vergleich der mittleren ausgezählten STAT-3-Signale der MALP-2-behandelten SHR und WKY-Ratten 120 Minuten post injectionem. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Die identischen Buchstaben über den Säulen, die die untersuchten Gehirnregionen repräsentieren, zeigen an, dass in keiner Gehirnstruktur ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zahl STAT3-positiver Zellkerne vorlag.

Die MALP-2-Stimulation verursachte bei den WKY-Ratten wie auch bei den SHR eine starke Ausbildung von STAT3-Signalen in Zellkernen, die vor allem im Bereich des OVLT und des SFO (Abbildung 42) besonders häufig vorzufinden waren. Die beiden Rattenstämme unterschieden sich bezüglich der inflammatorischen Aktivierung von Gehirnstrukturen über eine nukleäre STAT3-Translokation allerdings nicht signifikant voneinander.

STAT-3-aktivierte Zellen nach Cremophor-Stimulation	SHR	WKY
OVLT	$2 \pm 0,8$	$2 \pm 1,1$
SFO	$1 \pm 0,5$	$1 \pm 0,5$
ME	$0 \pm 0,2$	$3 \pm 1,5$
AP	0 ± 0	$1 \pm 0,4$

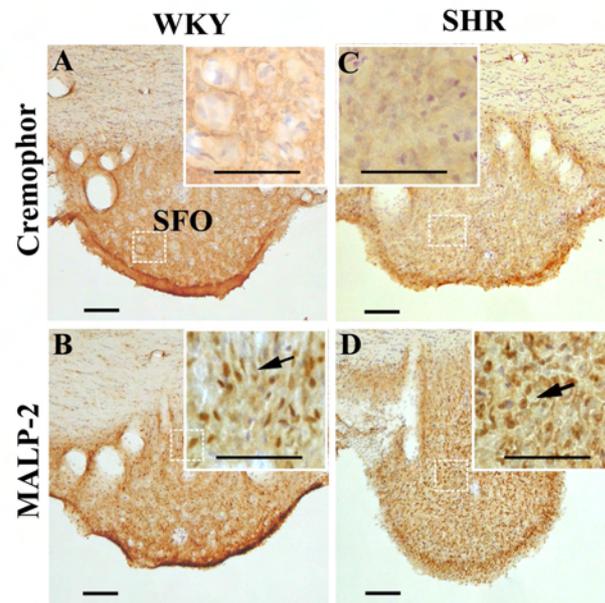


Abbildung 44: SFO nach Injektion von Cremophor (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und MALP-2 (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende zu Abb.43. Auch im SFO verursachte Cremophor kaum nucleäre STAT3-Signale, wohingegen eine Stimulation mit MALP-2 bei den SHR wie auch bei den WKY zu einer hohen Anzahl an STAT3-Signalen führte.

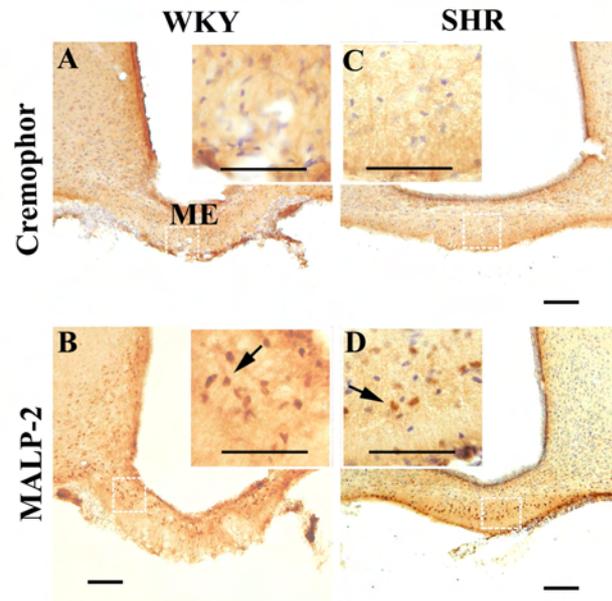


Abbildung 45: ME nach Injektion von Cremophor (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und MALP-2 (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende zu Abb.43. In der ME zeigten die Zellkerne der Cremophorbehandelten Tiere kaum Reaktionen, aber auch MALP-2 konnte bei beiden Versuchsgruppen nur eine geringe Aktivierung von STAT3-Signalen in den Zellkernen auslösen.

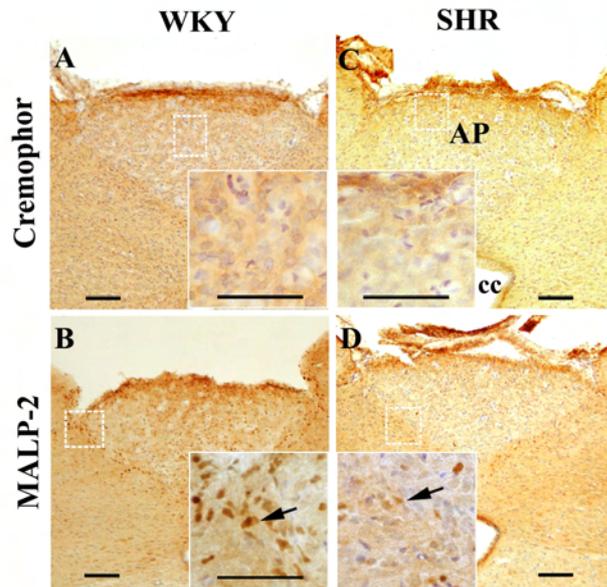


Abbildung 46: AP nach Injektion von Cremophor (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und MALP-2 (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende zu Abb.43. In der Area postrema verursachte Cremophor so gut wie keine Aktivierung von STAT3 in den Zellkernen, auch MALP-2 konnte nur vereinzelt zur Aktivierung von STAT3 führen.

3.4. FSL-1-Stimulation

3.4.1. Telemetrische Ergebnisse

3.4.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer FSL-1-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Temperaturentwicklung	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	Im Zeitraum von 150- 530 min signifikante Temperaturerhöhung auf $37,7\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($p = <0,0001$; $F = 30,0$) ($n=13$)	Ausser Stresspeak keine fiebrhaften Veränderungen Temperatur bei $37,2\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ($n=12$)
WKY-Ratten	Stresspeak mit anschliessendem signifikantem Fieber bei 135-530 min mit $37,65\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($p = <0,0001$; $F = 49,8$) ($n=14$)	Ausser Stresspeak keine fiebrhaften Veränderungen Temperatur bei $37,1\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($n=9$)
SH- vs WKY	Keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen	Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Rattenstämmen

Der Versuchsablauf der FSL-1-Stimulationen entsprach dem der mit MALP-2 durchgeführten Versuche. Es wurde ebenfalls eine Dosierung von 100µg/kg Körpergewicht gewählt. Nach Injektion von FSL-1 entwickelten beide Rattenstämme ein eher moderates Fieber, welches bei den SHR 150 Minuten nach der FSL-1-Stimulation begann und bis zu 530 Minuten signifikant erhöht blieb. Die WKY-Ratten zeigten einen ähnlichen Temperaturverlauf. Hier begann die Temperaturerhöhung bereits 135 Minuten post injectionem und hielt bis 530 Minuten im signifikanten Ausmaß an. Bei beiden Rattenstämmen war nach PBS-Gabe lediglich die transiente, durch Injektionsstress verursachte Erhöhung der Körpertemperatur zu verzeichnen. Das moderate, durch FSL-1-induzierte Fieber verlief bei beiden Rattenstämmen nahezu identisch.

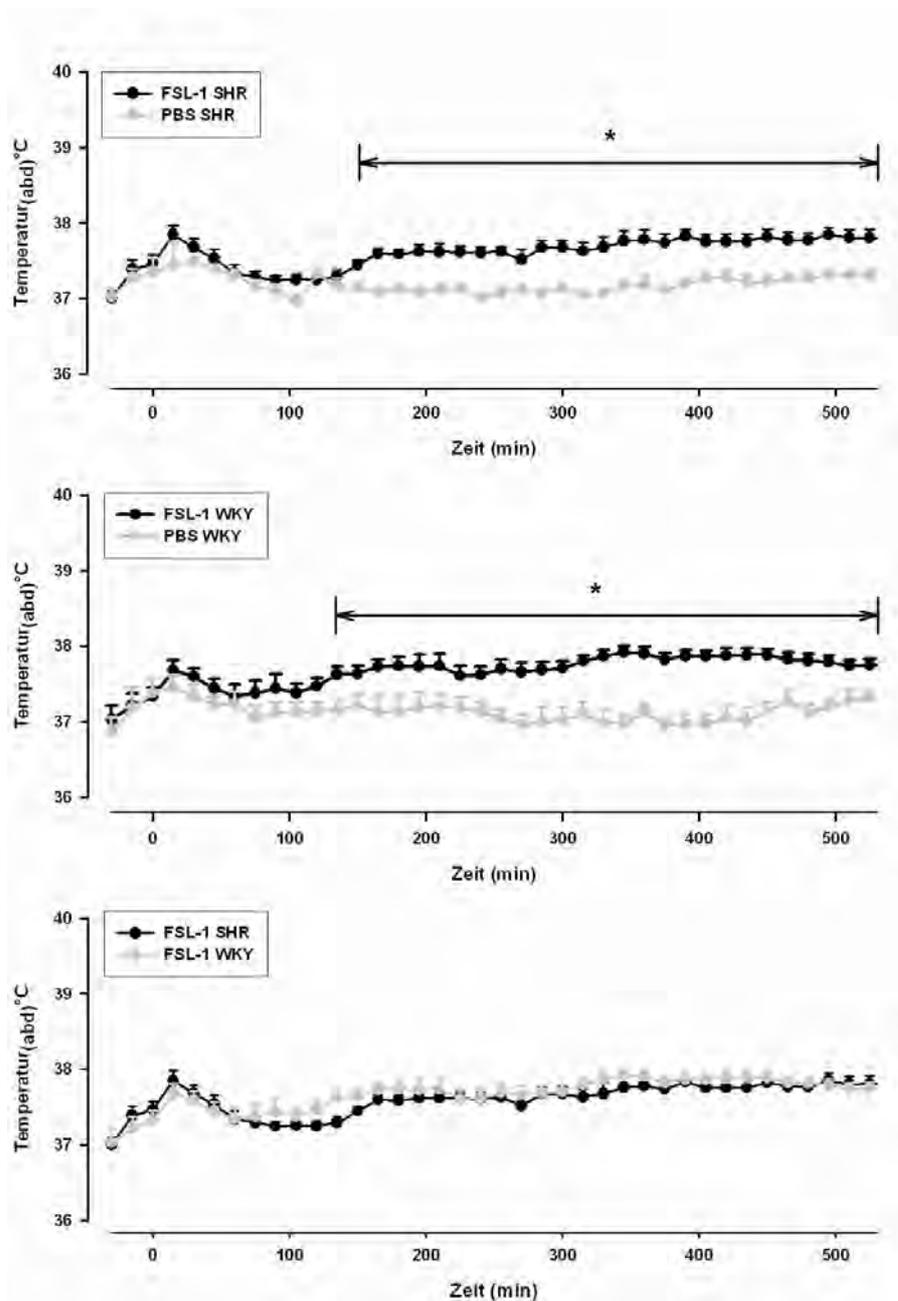


Abbildung 47: 500 min-Zeitausschnitt des Injektionstags nach FSL-1-Stimulation bei SHR und WKY-Ratten. Der Zeitpunkt 0 zeigt den Injektionszeitpunkt an. Bei den SHR ergaben sich im Zeitraum von 150-530 Minuten und bei den WKY im Zeitraum von 135-530 Minuten nach dem Injektionszeitpunkt signifikante Temperaturunterschiede zwischen FSL-1- und PBS-stimulierten Tieren. Im Versuchverlauf konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden FSL-1-stimulierten Rattenstämmen gemessen werden. Horizontale Balken mit Sternen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den jeweils dargestellten Gruppen an.

3.4.1.2. **Aktivitätsänderung nach intraperitonealer FSL-1-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.**

Aktivität	FSL-1-Stimulation	PBS-Stimulation
<p align="center">SH-Ratten (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p align="center"> T1: 548 ± 58 N1: 731 ± 45 T2: 526 ± 47 (p= 0,0134 ; F= 7,1) N2: 781 ± 56 (n=13) Die SHR zeigten nach FSL-1-Gabe keinerlei Einschränkung der Aktivität, am Tag 2 wurde sogar eine gesteigerte Bewegung beobachtet </p>	<p align="center"> T1: 446 ± 29 N1: 719 ± 33 T2: 413 ± 15 N2: 768 ± 35 (n=12) </p>
<p align="center">WKY-Ratten (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p align="center"> T1: 506 ± 55 N1: 519 ± 45 (p= 0,008; F= 15,1) T2: 443 ± 49 N2: 733 ± 60 (n= 9) In der ersten Nacht wurde ein starker Rückgang der Aktivität bei den Pyrogen-stimulierten Tieren festgestellt </p>	<p align="center"> T1: 499 ± 60 N1: 805 ± 59 T2: 499 ± 55 N2: 794 ± 74 (n=7) </p>

<p style="text-align: center;">SH vs WKY (Aktivitätscounts/12 Std.)</p>	<p style="text-align: center;">In der ersten Nacht wurden signifikante Differenzen zwischen SHR und WKY festgestellt (p= 0,002; F= 12,0), die Aktivität bei den WKY war stark reduziert</p>	<p style="text-align: center;">Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen</p>
--	--	---

Die FSL-1-Gabe verursachte bei SHR keinerlei Einschränkung der Aktivität, am zweiten Tag zeigten die FSL-1-behandelten Tiere vergleichend zu den PBS-Stimulierten sogar eine gesteigerte Aktivität. Die WKY-Ratten hingegen verminderten ihre Aktivität, der MALP-2-Stimulation ähnelnd, in der der ersten Nacht drastisch, erholten sich dann aber bereits wieder am folgenden Tag. Bei Betrachtung der beiden Vergleichsgruppen ergaben sich innerhalb der ersten Nacht statistisch relevante Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten, die WKY zeigten eine deutliche Reduktion der motorischen Aktivität, wobei die SHR keinerlei Verringerung im Bewegungsdrang zeigten. Die genauen Daten sind der Tabelle zu entnehmen.

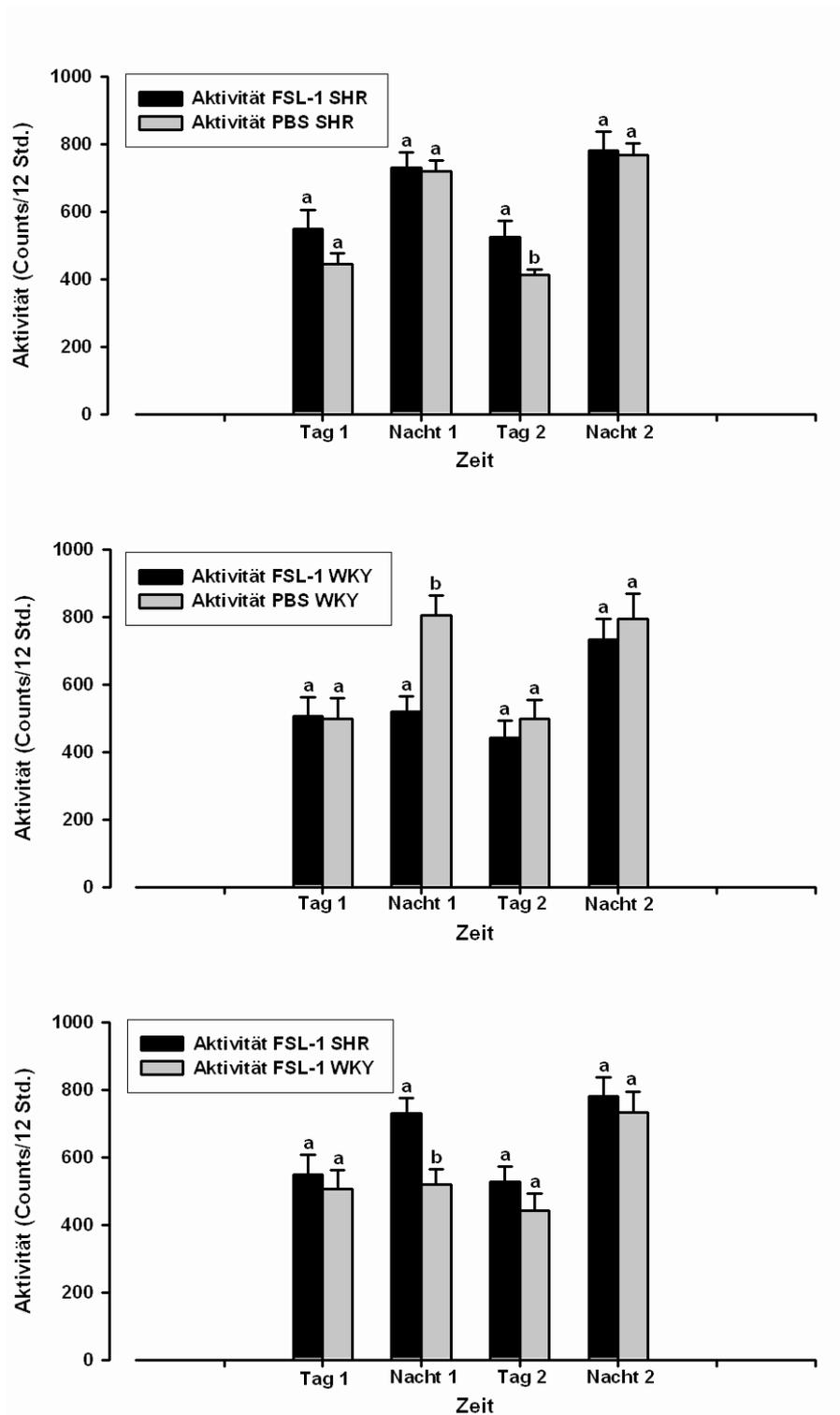


Abbildung 48: Vergleich der mittleren Aktivität der FSL-1- und PBS-behandelten SHR mit den WKY-Ratten. Die Ergebnisse sind jeweils über 12 Stunden kumuliert und als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Die Auswertung erstreckt sich über einen Zeitraum von zwei Tagen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.4.1.3. Futteraufnahme nach intraperitonealer FSL-1-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Futteraufnahme (g/Tag)	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	<p>T0: 24,19 ± 1,45g T1: 19,23 ± 1,51g T2: 19,48 ± 0,93g (n=13)</p> <p>Bei den SHR konnten keine relevanten Änderungen in der Futteraufnahme festgestellt werden</p>	<p>T0: 21,80 ± 0,57g T1: 20,71 ± 0,39g T2: 22,50 ± 0,68g (n=13)</p>
WKY-Ratten	<p>T0: 22,05 ± 1,29g T1: 12,56 ± 1,62g (p= <0,0001; F= 30,4) T2: 20,68 ± 0,86g (n=14)</p> <p>Die WKY zeigten am Tag nach der Injektion eine deutliche Senkung der Futteraufnahme</p>	<p>T0: 20,82 ± 0,51g T1: 20,45 ± 0,57g T2: 22,12 ± 0,82g (n=10)</p>
SH- vs WKY	<p>Am Tag der Stimulation mit FSL-1 nahmen die WKY signifikant weniger Futter auf als die SHR (p= 0,0014; F= 12,9)</p>	<p>Keine relevanten Unterschiede</p>

Abbildung 49 fasst die Futtermittelaufnahme der SHR und WKY-Ratten vor (Tag 0) und nach (Tag 1, Tag 2) Stimulation mit FSL-1 bzw. PBS zusammen. Die FSL-1-behandelten SHR zeigten hier im Vergleich zu den PBS-Tieren, wie auch schon bei der Aktivität, keine statistisch relevanten Änderungen bezüglich der Futtermittelaufnahme. Die WKY-Ratten wiesen am Tag nach Pyrogen-Gabe hingegen eine deutliche Verringerung der Futtermittelaufnahme auf, was sich auch im Vergleich zu den FSL-1-behandelten SHR als signifikant erwies. Genauere Daten sind der Tabelle zu entnehmen.

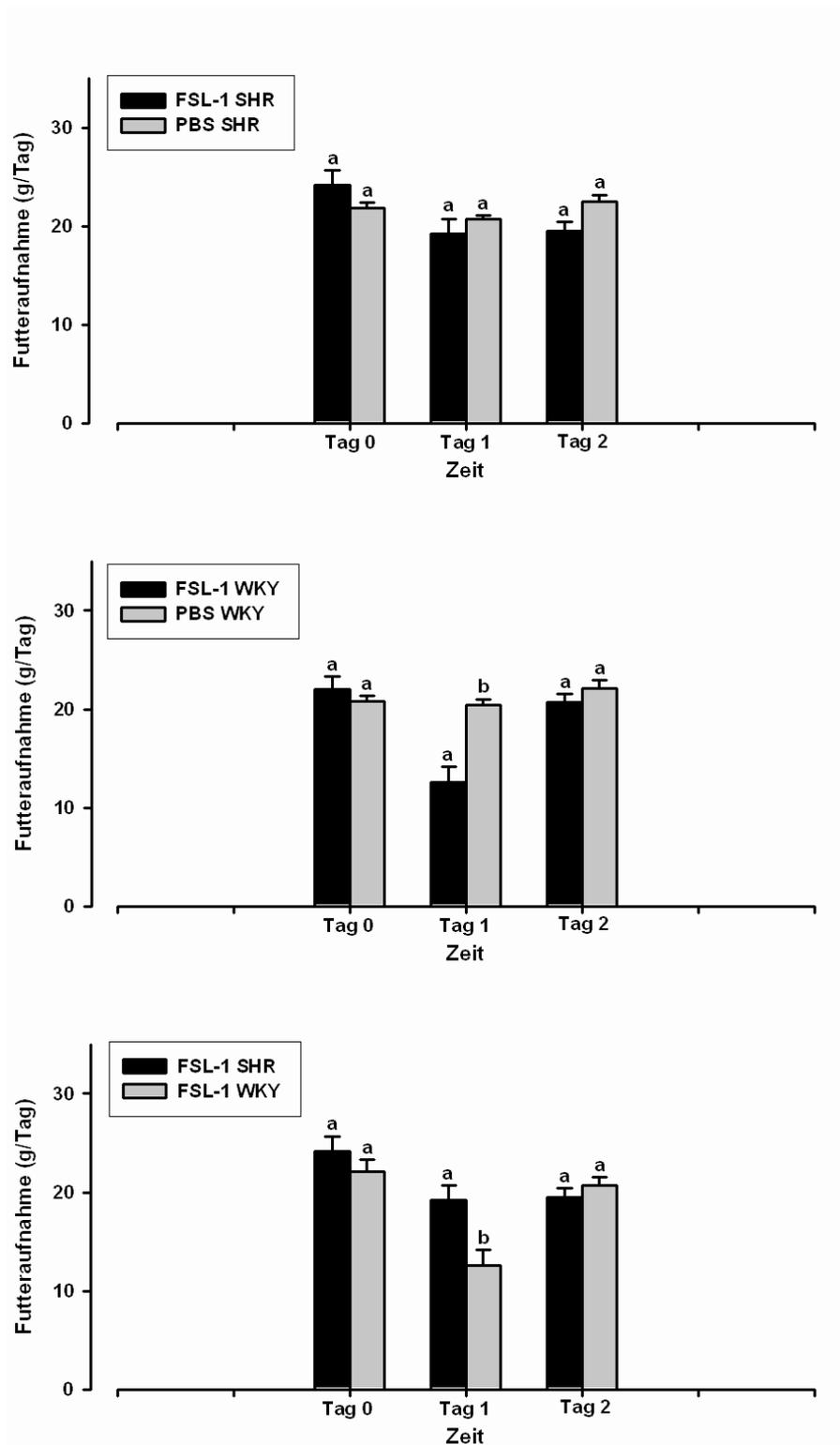


Abbildung 49: Vergleich der mittleren Futteraufnahme der FSL-1- und PBS-behandelten SHR mit den WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Tag „0“ stellt den Futterverbrauch 24 Stunden vor der Injektion dar und zeigt somit die Futteraufnahme der unbehandelten Tiere. Tag 1 und 2 stellen die Folgetage nach der Applikation des Pyrogens dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.4.1.4. Wasseraufnahme nach intraperitonealer FSL-1 Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Wasseraufnahme (g/Tag)	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	<p>T0: 33,60 ± 1,24g T1: 28,31 ± 1,46g T2: 33,71 ± 0,95g (n=13)</p> <p>Bei den SHR wurde keine statistisch relevante Reduktion der Wasseraufnahme beobachtet</p>	<p>T0: 30,04 ± 1,39g T1: 30,27 ± 1,21g T2: 31,50 ± 0,80 (n=13)</p>
WKY-Ratten	<p>T0: 26,94 ± 1,36g T1: 17,12 ± 1,09g (p= <0,0001; F= 48,3) T2: 30,28 ± 0,89g (p= 0,0447; F= 4,5) (n=14)</p> <p>Die WKY zeigten am Tag nach der Stimulation eine starke Verminderung der Wasseraufnahme, welches am Folgetag in ein vermehrtes Trinkverhalten umschlug</p>	<p>T0: 26,66 ± 1,26g T1: 26,83 ± 0,93g T2: 27,39 ± 1,44g (n=10)</p>
SH- vs WKY	<p>Im Vergleich der beiden Tierstämme wurden an allen Tagen signifikante Unterschiede bei der Wasseraufnahme gemessen, die WKY tranken</p>	<p>Auch bei den PBS-stimulierten Tieren waren signifikante Unterschiede im Trinkverhalten festzustellen, da die SHR eine höhere</p>

	durchweg weniger	Wasseraufnahme zeigten als die WKY
	T0: (p= 0,0002; F= 18,7)	T0: (p= 0,0849; F= 3,3)
	T1: (p= <0,0001; F= 38,8)	T1: (p= 0,0399; F= 4,8)
	T2: (p= 0,0088; F= 8,1)	T2: (p= 0,0102; F= 8,0)

FSL-1 induzierte nur bei den WKY-Ratten eine Adipsie am Injektionstag, worauf sich am Folgetag die Wasseraufnahme im Vergleich zu den mit PBS behandelten Kontrollen sogar kompensatorisch erhöhte. Signifikante Effekte der FSL-1-Behandlung auf das Trinkverhalten war bei den SH-Ratten nicht zu verzeichnen. Es fiel jedoch auf, dass bei den in diesem Versuch eingesetzten SH-Ratten generell ein höherer Wasserverbrauch vorlag als bei den WKY-Kontrolltieren (**Abbildung 50**, unten).

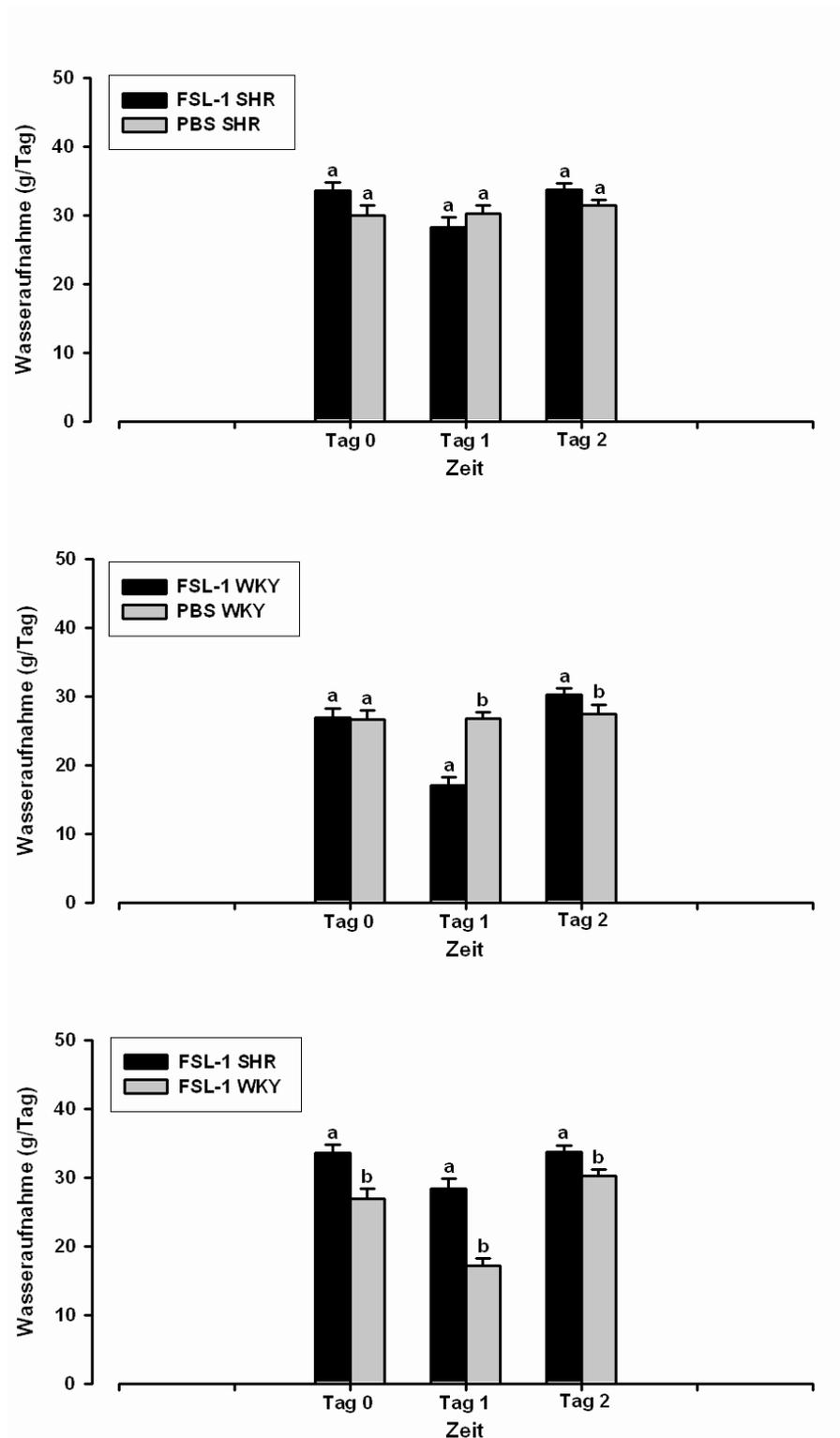


Abbildung 50: Vergleich der mittleren Wasseraufnahme der FSL-1- und PBS-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Tag „0“ stellt den Wasserverbrauch 24 Stunden vor der Injektion von MALP-2 dar und zeigt somit die Wasseraufnahme der unbehandelten Tiere. Die Tage 1 und 2 stellen die Tage nach der Applikation von FSL-1 oder PBS dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.4.1.5. Gewichtsveränderung nach intraperitonealer FLS-1-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Gewichtsveränderung (g/Tag)	FSL-1 Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	<p>T0: 11,00 ± 1,54g T1: -0,87 ± 2,16g T2: 3,58 ± 1,21g (p= 0,002; F= 20,3) (n=13)</p> <p>Bei den SHR trat an T1 eine Gewichtsabnahme und an T2 post injectionem ein Gewichtszunahme auf, die Gewichtsabnahme war allerdings nicht signifikant</p>	<p>T0: 8,62 ± 1,27g T1: 2,38 ± 0,61g T2: -1,38 ± 0,56g (n=13)</p>
WKY-Ratten	<p>T0: 6,03 ± 1,24g T1: -6,61 ± 1,32g (p= <0,0001; F= 58,6) T2: 7,11 ± 2,71g (p= 0,0373; F= 4,9) (n=14)</p> <p>Bei den WKY wurden an beiden Tagen post injectionem deutliche Unterschiede zwischen FSL-1 und PBS-behandelten Tieren gemessen, an T1 folgte eine Reduktion gefolgt von einer Zunahme des Gewichtes nach FSL-1-Behandlung</p>	<p>T0: 7,12 ± 1,29g T1: 3,80 ± 0,82g T2: 1,48 ± 1,26g (n=10)</p>

SH- vs WKY	Am Tag vor der Stimulation zeigten die SHR eine stärkere Gewichtszunahme ($p= 0,0002$; $F= 19,0$), die darauf folgende Abnahme war bei den SHR nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den WKY ($p= 0,0009$; $F= 14,1$).	
-------------------	--	--

Bei beiden Rattenstämmen erfolgte am Tag nach der Pyrogen-Verabreichung ein Einbruch in der Gewichtsentwicklung, der bei den SHR allerdings geringer ausfiel und gegenüber den PBS-behandelten Tieren statistisch nicht signifikant war. Der stärkere FSL-1-induzierte Gewichtsverlust der WKY-Ratten am Injektionstag wurde am Folgetag durch eine stärkere Gewichtszunahme zumindest teilweise wieder kompensiert.

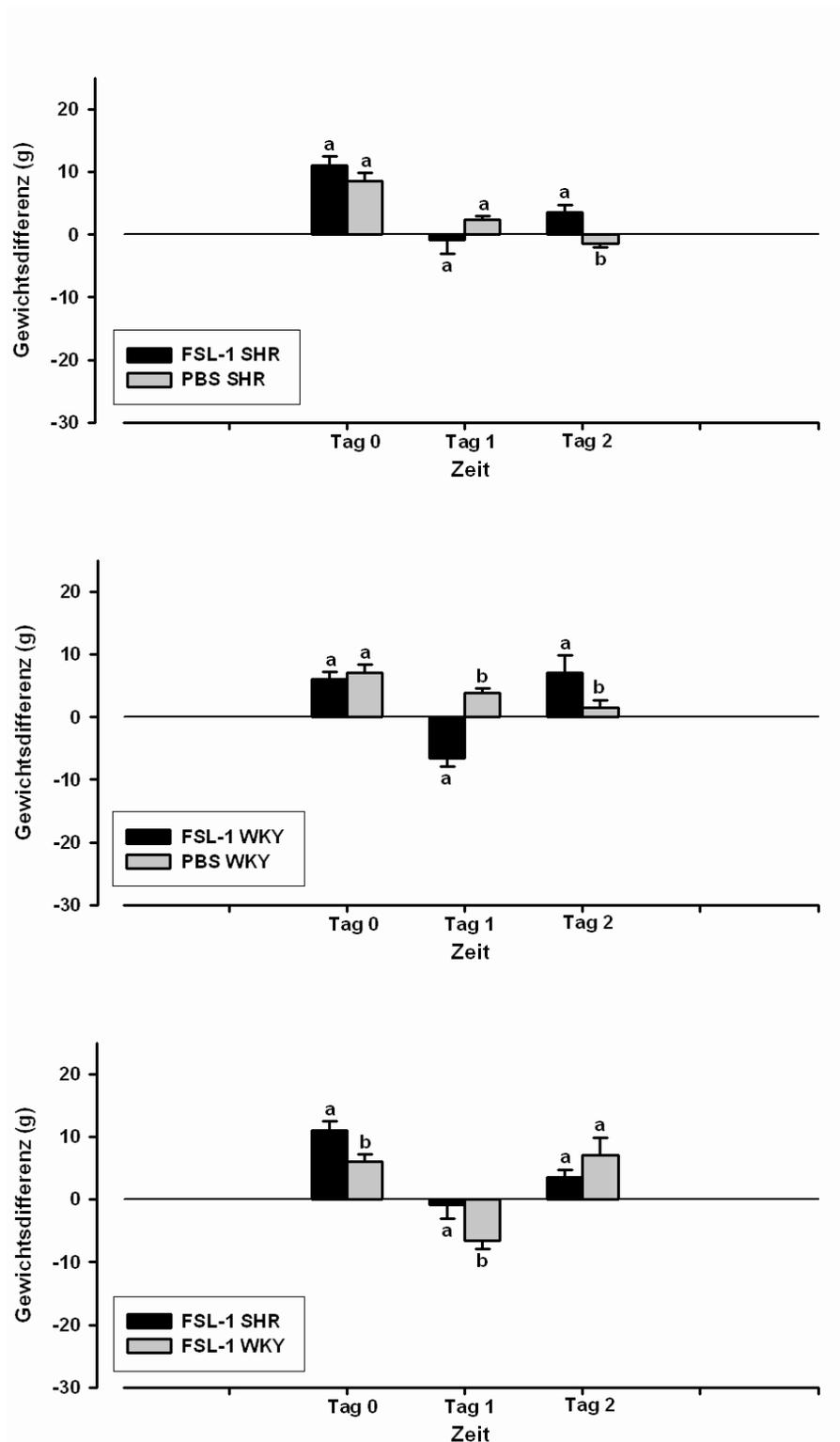


Abbildung 51: Vergleich der mittleren Gewichts­differenz der FSL-1- und PBS-behandelten SHR mit den WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Wie bei den Abb. der Futter- und Wasseraufnahme zeigt hier der Tag „0“ die Gewichts­entwicklung vor Injektion der Substanzen. Tag 1 und 2 zeigen den Injektions- und Folgetag. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.4.2. Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF α und IL-6 nach intraperitonealer Stimulation mit FSL-1

3.4.2.1. Plasmawerte von TNF α

TNF α	FSL-1-Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	60 min post injectionem: 8601 \pm 892 pg/ml 120 min post injectionem: 3473 \pm 379 pg/ml 180 min post injectionem: 2347 \pm 1083 pg/ml (n=4-5)	60 min post injectionem : n.d. 120 min post injectionem : n.d. 180 min post injectionem : 111 \pm 5 pg/ml (n=4)
WKY-Ratten	60 min post injectionem : 11727 \pm 4520 pg/ml 120 min post injectionem : 4363,2 \pm 751,70 pg/ml 180 min post injectionem: 893 \pm 569 pg/ml (n=4-6)	Zu keinem der Messzeitpunkte konnte TNFα detektiert werden (n=4)
SH- vs WKY	Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen festgestellt	

Um einen Verlauf der TNF α -Konzentration nach Stimulation mit FSL-1 genauer beurteilen zu können, wurden die Messungen an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion durchgeführt. Die Proben wurden 60, 120 und 180 Minuten nach FSL-1- und PBS-Gabe entnommen. Es konnte bei beiden Rattenstämmen zu allen drei Zeitpunkten eine Erhöhung des TNF α -Gehalts nach Pyrogenstimulation im Plasma festgestellt werden, nach 60 Minuten war die Erhöhung am deutlichsten und sank zu den folgenden Zeitpunkten stetig ab. Die FSL-1-induzierte Kinetik der Freisetzung von TNF α in die Blutbahn verlief bei beiden Rattenstämmen ähnlich. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte traten signifikante Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten auf. Die PBS-Injektion führte zu keiner nachweisbaren TNF α -Bildung (siehe **Abbildung 52**).

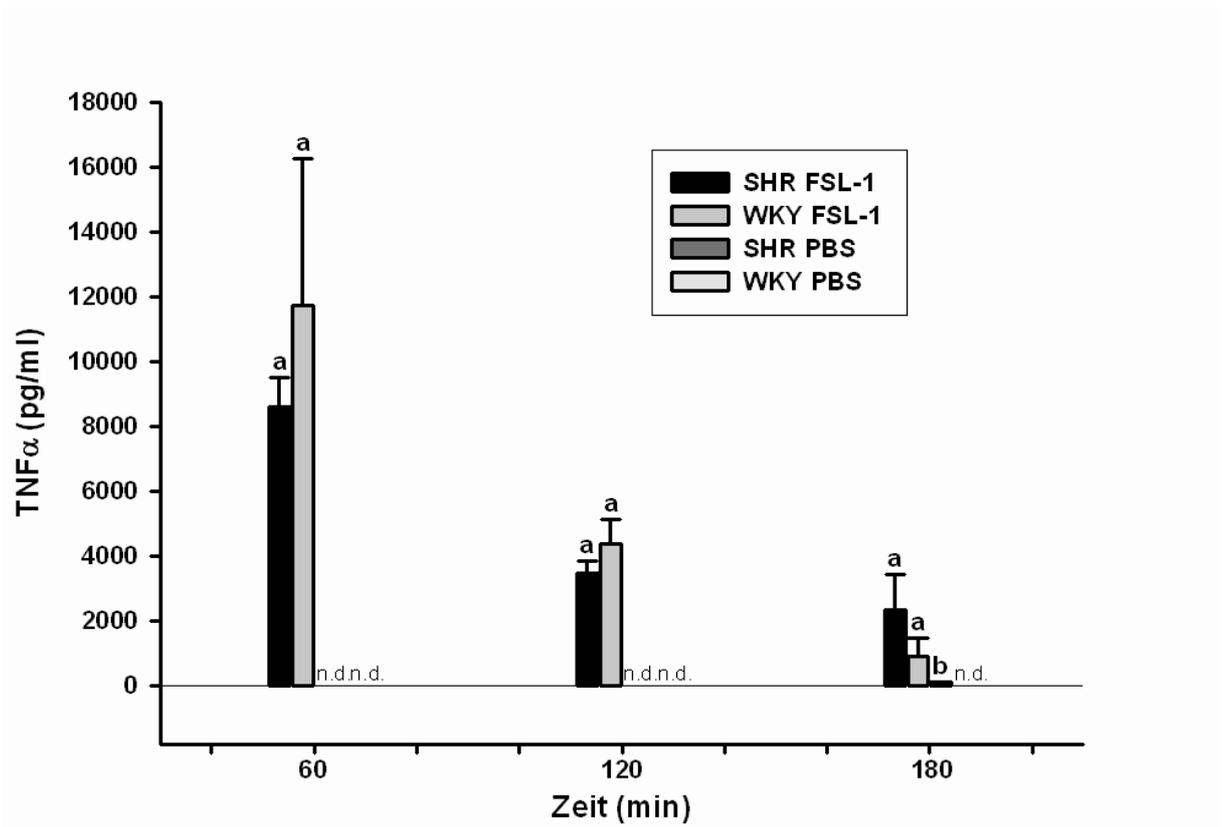


Abbildung 52: TNF α -Entwicklung 60, 120 und 180 min nach FSL-1-Applikation im Vergleich zu den PBS-Kontroll-Gruppen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an.

3.4.2.2. Plasmawerte von IL-6

IL-6	FSL-1-Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	60 min post injectionem : 1232 ± 365 IU/ml (p= 0,0187 ; F= 10,2) 120 min post injectionem : 2644 ± 380 IU/ml (p= 0,0005 ; F= 44,9) 180 min post injectionem : 3591 ± 958 IU/ml (p= 0,0107 ; F= 13,3)	60 min post injectionem : 65 ±12 IU/ml 120 min post injectionem : 99 ± 18 IU/ml 180 min post injectionem : 86 ± 39 IU/ml
WKY-Ratten	60 min post injectionem: 1482 ± 504 IU/ml (p= 0,0315; F= 7,8) 120 min post injectionem: 2940 ± 842 IU/ml (p= 0,0459; F= 6,3) 180 min post injectionem : 2736 ± 458 IU/ml (p= 0,0011; F= 34,5)	60 min post injectionem : 74 ± 27 IU/ml 120 min post injectionem : 98 ± 20 IU/ml 180 min post injectionem : 43 ± 20 IU/ml
SH vs WKY	keine signifikanten Unterschiede	keine signifikanten Unterschiede

In den gleichen Plasmaproben wurden auch die Konzentrationen an biologisch aktiven IL-6 gemessen. Bei beiden Rattenstämmen konnte nach FSL-1-Stimulation ein deutlicher Anstieg an IL-6 im Plasma nachgewiesen werden, der zu allen drei Zeitpunkten signifikant über den entsprechenden Werten der PBS-behandelten Tiere lag. Auch für IL-6 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen FSL-1-behandelten SHR und WKY-Ratten (siehe **Abbildung 53**).

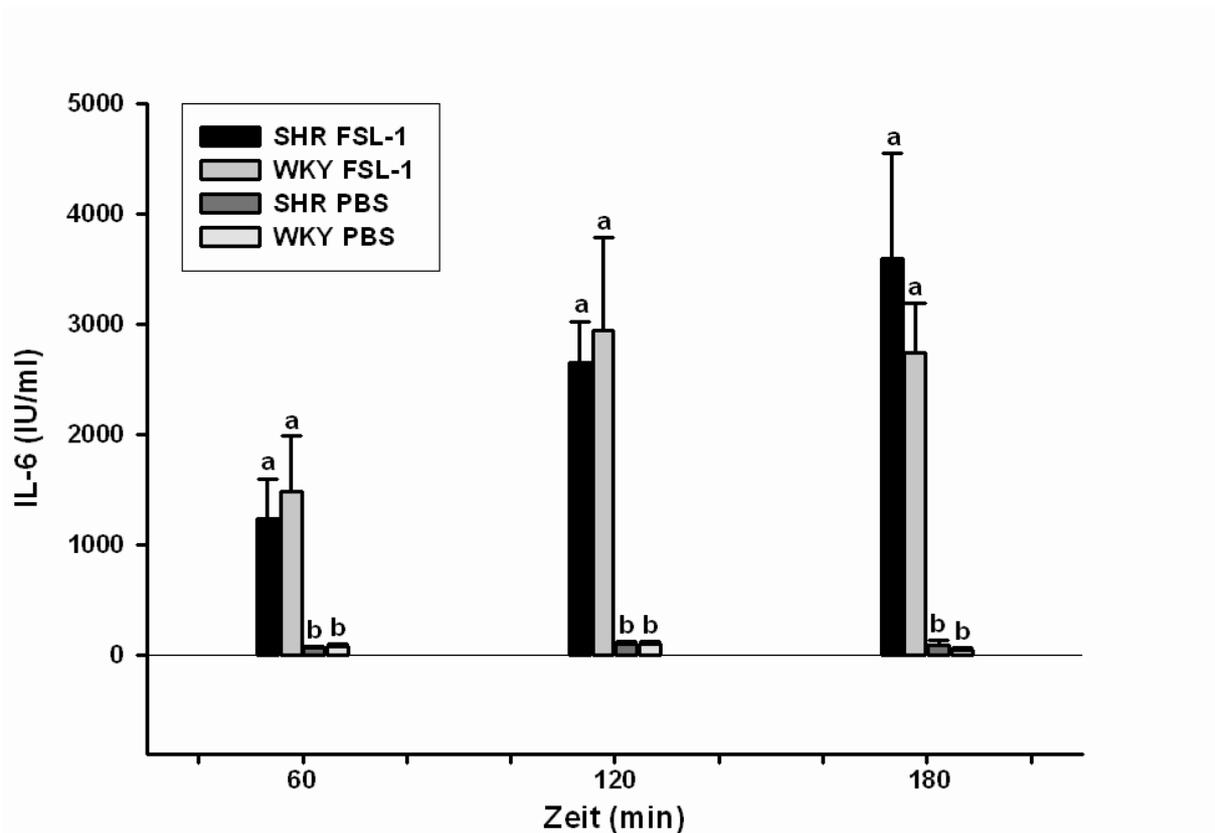


Abbildung 53: IL-6-Entwicklung 60, 120 und 180 min nach FSL-1-Applikation im Vergleich zu den PBS-Kontroll-Gruppen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an.

3.4.3. Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach intraperitonealer Injektion von FSL-1

3.4.3.1. Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3

Auch die Stärke der durch FSL-1 induzierten inflammatorischen Aktivierung fieberrelevanter Gehirnstrukturen wurde bei SHR und WKY-Ratten durch Quantifizierung der nukleären STAT3-Signale ermittelt.

STAT-3-aktivierte Zellen nach FSL-1-Stimulation	SHR	WKY
OVL	34 ± 4,8	35 ± 4,9
SFO	120 ± 17,7	93 ± 17,9
ME	20 ± 3,2	11 ± 1,7
AP	19 ± 6,1	17 ± 3,7

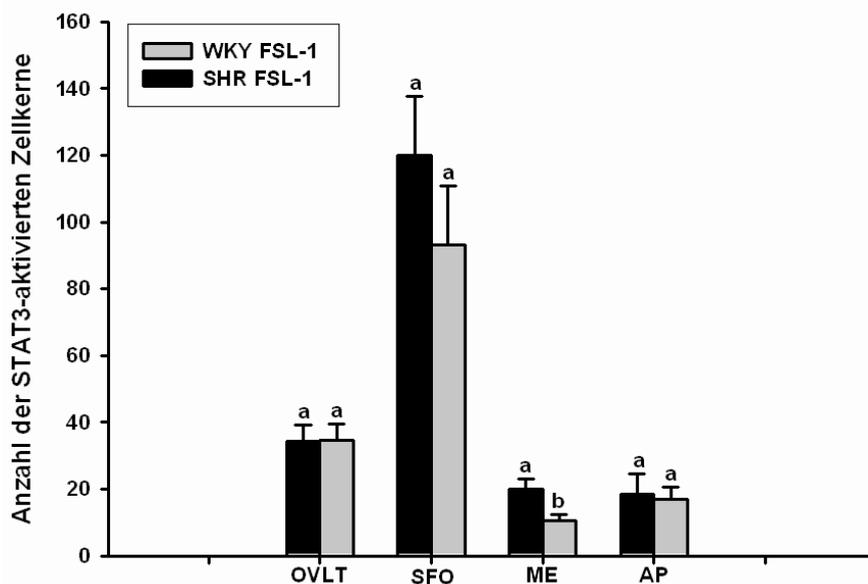


Abbildung 54: Vergleich der mittleren ausgezählten STAT-3-Signale der FSL-1-behandelten SHR und WKY-Ratten 120 Minuten post injectionem. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede in der Zahl nukleärer STAT3-Signale in einer Gehirnstruktur (ME) zwischen den beiden Rattenstämmen an.

Ähnlich wie bei den MALP-2-stimulierten Tieren zeigten die Ratten nach FSL-1-Gabe eine relativ große Anzahl STAT-3-positiver Zellkerne, insgesamt war die Aktivierung jedoch geringer als bei den mit MALP-2-behandelten Tieren. Besonders im OVL kam es nach FSL-1-Gabe zu einer geringeren STAT-3-Aktivierung im Vergleich zu MALP-2, die beiden Rattenstämme wichen jedoch nicht voneinander ab.

STAT-3-aktivierte Zellen nach PBS-Stimulation	SHR	WKY
OVL	1 ± 0,3	4 ± 1,6
SFO	0 ± 0,2	1 ± 0,9
ME	0 ± 0,3	1 ± 0,6
AP	0 ± 0	1 ± 0,7

Wie bei den Cremophor-stimulierten Ratten konnten bei den PBS-behandelten Tieren nur vereinzelt STAT-3-positive Zellkerne ausgemacht werden. Dieser Befund zeigt wiederum, dass eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 im Gehirn nur unter inflammatorischen Bedingungen stattfindet.

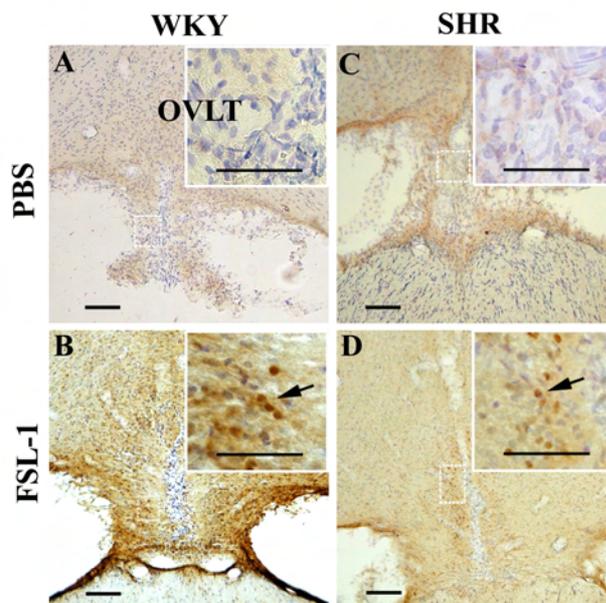


Abbildung 55: OVL nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und FSL-1 (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende zu Abb. 43. Wie bei der Stimulation mit MALP-2 konnte auch nach FSL-1-Stimulation eine grosse Anzahl STAT3-positiver Zellkerne im OVL nachgewiesen werden (Abb. B und D), sie lag jedoch unter den ermittelten Werten der MALP2-stimulierten Tiere. Die Injektion von PBS führte hingegen weder bei den SHR (Abb. C) noch bei den WKY (Abb. A) zur aussagekräftigen Ausbildung von STAT3-Signalen.

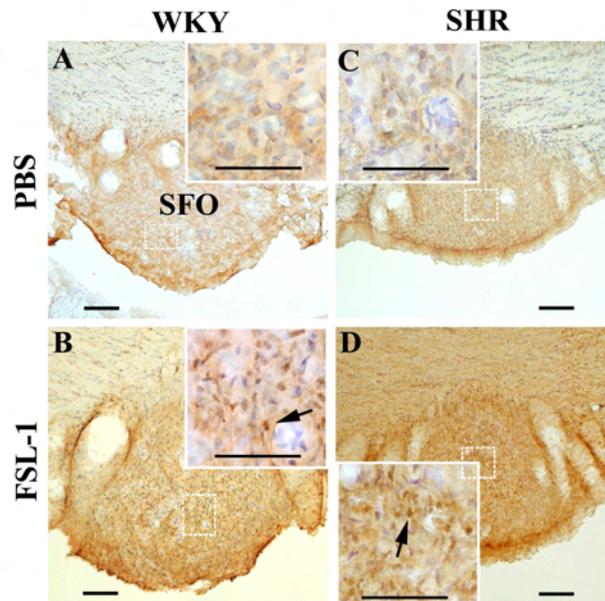


Abbildung 56: SFO nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und FSL-1 (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende zu Abb.43. Dem OVLT ähnelnd stellen sich auch im SFO bei den SHR (Abb. D) und WKY-Ratten (Abb. B) eine große Anzahl STAT3-positiver Zellkerne dar, die Aktivierung viel sogar höher aus, als im OVLT gleichstimulierter Tiere. Die Injektion von PBS konnte bei beiden Rattenstämmen auch hier kaum zur Ausbildung von Signalen führen (Abb. A und B).

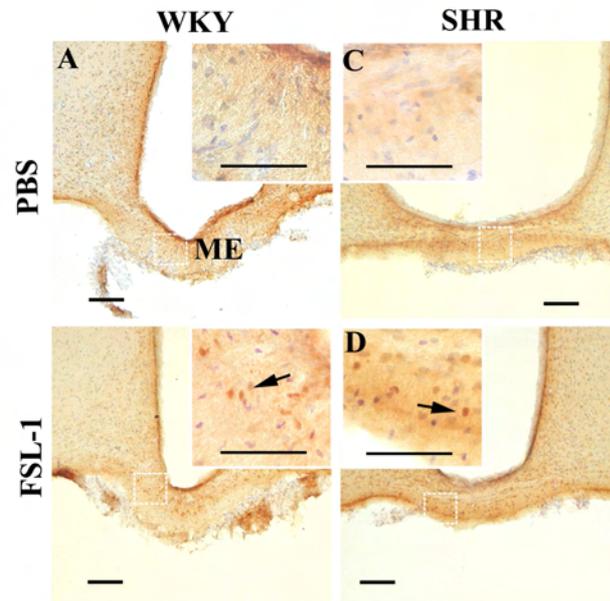


Abbildung 57: ME nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und FSL-1 (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende zu Abb.43. Wie zuvor bei der MALP-Stimulation beschrieben fällt die Anzahl der STAT3-positiven Zellkerne in der Region der ME deutlich geringer aus. Hier sind nur vereinzelt positive Signale nach FSL-1-Gabe zu finden. PBS führte zu so geringen Signalentwicklungen, dass diese vernachlässigbar sind.

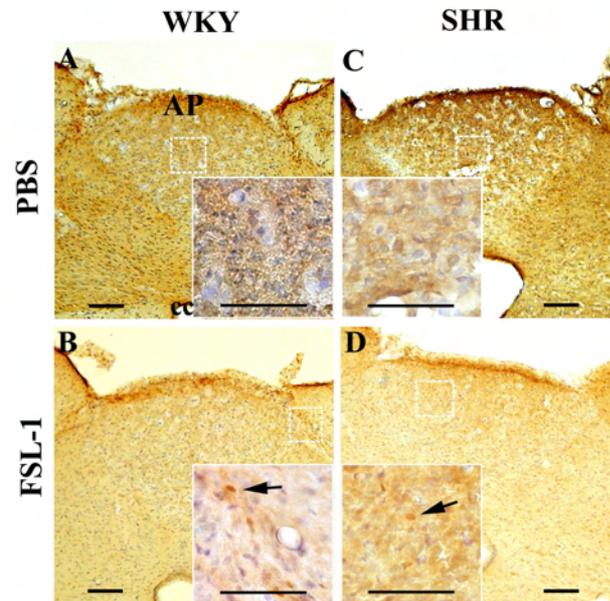


Abbildung 58: AP nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und FSL-1 (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende zu Abb.43. Auch in der AP konnte PBS zu keiner nennenswerten STAT3-Signalentwicklung führen. Durch FSL-1 verursachten Signale traten bei SHR (Abb. D) und WKY (Abb. B) nur vereinzelt auf.

3.5. LPS-Stimulation

3.5.1. Telemetrische Ergebnisse

3.5.1.1. Körpertemperaturverlauf nach intraperitonealer LPS-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Temperaturentwicklung	LPS-Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	Neben dem Stresspeak im Zeitraum von 150-530 min signifikante Temperaturerhöhung auf $38,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($p = <0,0001$; $F = 48,2$) ($n=10$)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen $37,1 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ($n=12$)
WKY-Ratten	Stresspeak mit anschliessendem signifikantem Fieber bei 135-530 min ($p = 0,0004$; $F = 18,3$) auf $39,35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ($n=10$)	Ausser Stresspeak keine fieberhaften Veränderungen $37,15 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($n=9$)
SH- vs WKY	Im Bereich von 270-510 min signifikante Temperaturunterschiede ($p = 0,0163$; $F = 7,0$) um ca. $0,4^{\circ}\text{C}$ bei der Fieberentwicklung zwischen den beiden Rattenstämmen	Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tierstämmen

Der Versuchsablauf bei den LPS-Stimulationen entsprach dem der mit MALP-2- oder FSL-1 durchgeführten Versuche. Es wurde ebenfalls eine Dosierung von $100\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht gewählt. Beide Rattenstämme entwickelten ein robustes Fieber, welches bei den SHR 150 Minuten nach der LPS-Stimulation begann und bis zu 530 Minuten signifikant erhöht blieb.

Die Körpertemperatur stieg hierbei bis $38,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ an, wohingegen die PBS-Kontrollgruppe ausser dem Stresspeak eine stabile Temperatur von $37,1 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ aufwies. Die WKY-Ratten zeigten einen ähnlichen Temperaturverlauf. Hier begann die Temperaturerhöhung bereits bei 135 Minuten post injectionem und hielt bis 530 Minuten im signifikanten Ausmaß an. Die Temperatur stieg auf $39,35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ nach Pyrogen-Injektion und blieb bei den PBS-Kontrollratten bei konstanten $37,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Das LPS-induzierte Fieber fiel bei den WKY-Ratten im Zeitraum von 270-510 min nach Injektion signifikant stärker aus als bei den SH-Ratten.

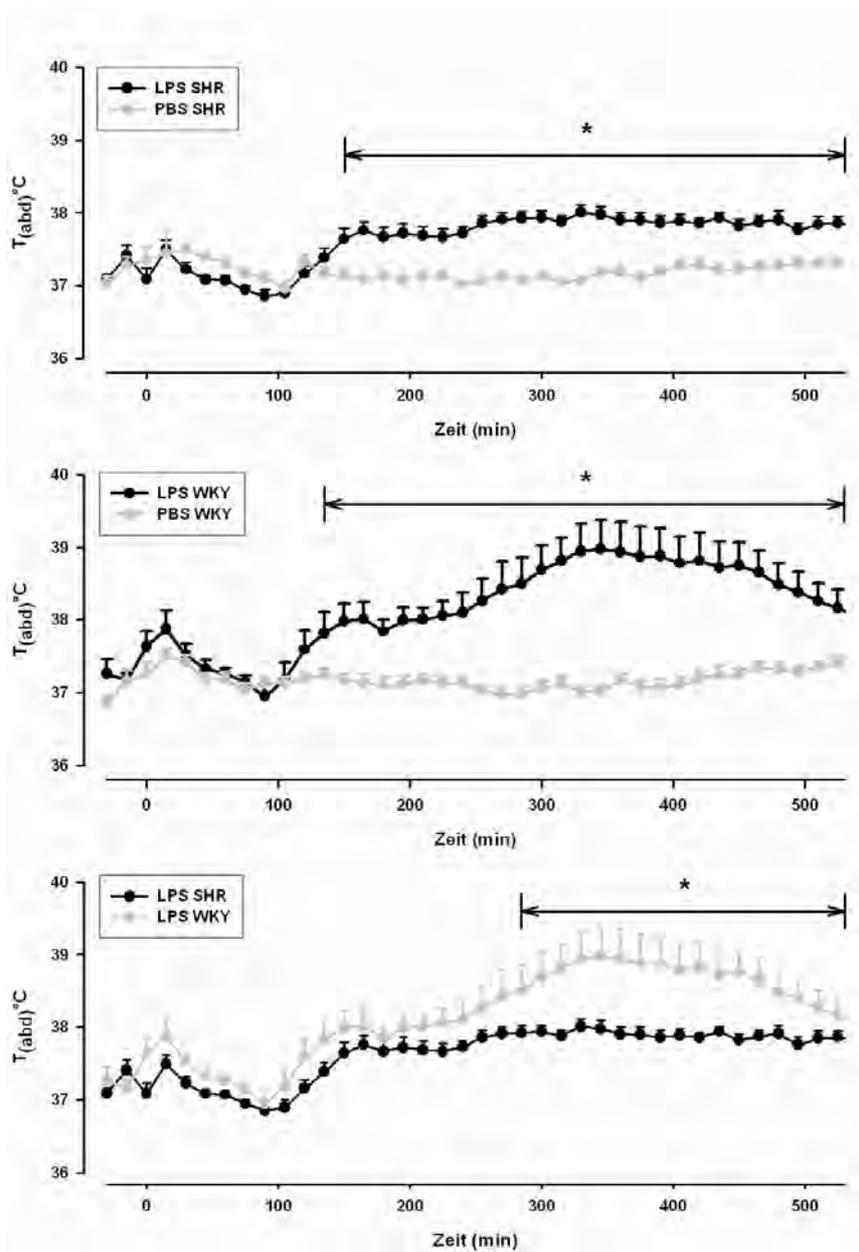


Abbildung 59: 500 min-Zeitausschnitt des Injektionstags nach LPS-Stimulation bei SHR und WKY-Ratten. Der Zeitpunkt 0 zeigt den Injektionszeitpunkt an. Sowohl bei den SHR, wie auch den WKY-Ratten konnten in bestimmten Zeitintervallen signifikante Unterschiede zwischen den LPS- und PBS-behandelten Tieren festgestellt werden. Im Zeitintervall 270-510 Minuten nach Injektion ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden LPS-stimulierten Rattenstämmen. Horizontale Balken mit Sternen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den jeweils dargestellten Gruppen an.

3.5.1.2. **Aktivitätsänderung nach intraperitonealer LPS-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.**

Aktivität	LPS-Stimulation	PBS-Stimulation
<p align="center">SH-Ratten (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p align="center">T1: 612±57 (p= 0,0121; F= 7,6) N1: 715±36 T2: 702±114 (p= 0,0093; F= 8,2) N2: 843±45 (n= 10)</p> <p align="center">Je am ersten und zweiten Tag lag ein signifikanter Unterschied zwischen LPS- und PBS-behandelten Ratten vor, die LPS- stimulierten Tiere zeigten mehr Aktivität</p>	<p align="center">T1: 446±29 N1: 719±33 T2: 413±15 N2: 768±35 (n=12)</p>
<p align="center">WKY-Ratten (Aktivitätscounts/12 Std., T=Tag; N=Nacht)</p>	<p align="center">T1: 385±20 N1: 519±78 (p= 0,0086; F= 8,8) T2: 396±25 N2: 765±64 (n= 9)</p> <p align="center">Nur in der ersten Nacht zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Pyrogen- und Solvent- stimulierten Tieren</p>	<p align="center">T1: 499±60 N1: 805±59 T2: 499±55 N2: 749±74 (n=9)</p>

<p style="text-align: center;">SH vs WKY (Aktivitätscounts/12 Std.)</p>	<p style="text-align: center;">An beiden Tagen, sowie in der ersten Nacht zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tierstämmen, die SHR zeigten jeweils eine höhere Aktivität zeigten als die WKY</p> <p style="text-align: center;">T1: (p= 0,0024; F= 12,7) N1: (p= 0,0157; F= 7,2) T2: (p= 0,0235; F= 6,2)</p>	<p style="text-align: center;">Kein signifikanter Unterschied bei den beiden Tierstämmen</p>
---	--	---

Im Gegensatz zu den WKY-Ratten zeigten die SHR keinerlei Reduktion in ihrer Aktivität nach LPS-Stimulation. Ihr Bewegungsdrang war, verglichen mit den Kontrollen, sogar zeitweise erhöht. Bei den WKY-Tieren kam nach Behandlung mit LPS hingegen verglichen zu den Kontrollen zu einer Reduktion der Aktivität während der ersten Nacht. Generell resultierte die LPS-Behandlung bei den WKY-Ratten verglichen mit den SH-Ratten in einer signifikant erniedrigten motorischen Aktivität.

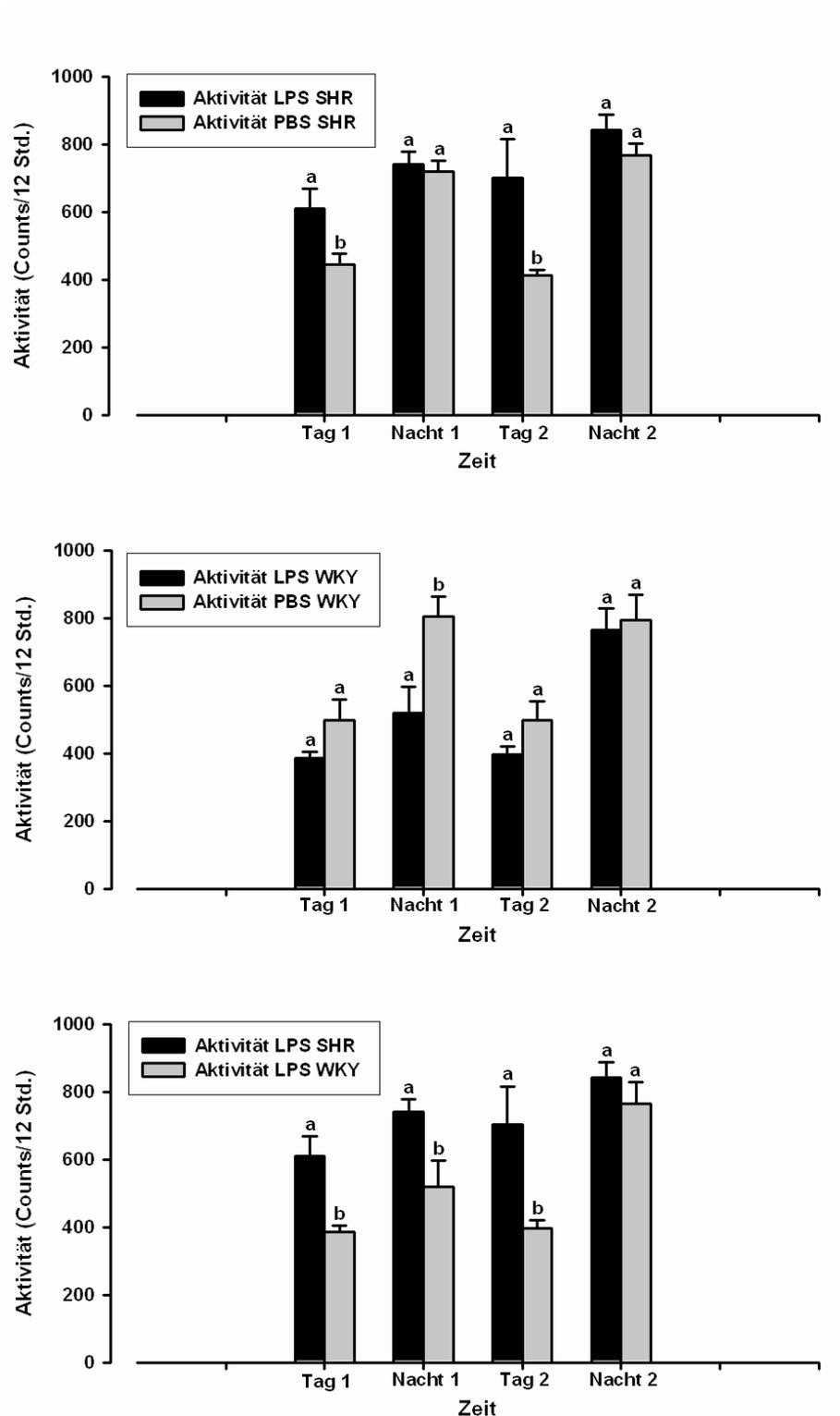


Abbildung 60: Vergleich der mittleren Aktivität der LPS- und PBS-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse sind jeweils über 12 Stunden kumuliert und als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Die Auswertung erstrecken sich über einen Zeitraum von zwei Tagen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.5.1.3. Futteraufnahme nach intraperitonealer LPS-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Futteraufnahme (g/Tag)	LPS Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	<p>T0: 23,96 ± 0,92g (p= 0,0373; F= 4,9)</p> <p>T1: 16,58 ± 1,59g (p= 0,0052; F= 9,7)</p> <p>T2: 21,13 ± 0,90g (n=10)</p> <p>Bei den SHR wurde am Tag vor der Stimulation eine gesteigerte und am Injektionstag eine reduzierte Futteraufnahme festgestellt</p>	<p>T0: 21,98 ± 0,57g</p> <p>T1: 20,56 ± 0,39g</p> <p>T2: 21,68 ± 0,68g (n=13)</p>
WKY-Ratten	<p>T0: 21,61 ± 0,73g</p> <p>T1: 8,16 ± 1,82g (p= <0,0001; F= 47,2)</p> <p>T2: 18,61 ± 1,09g (p= 0,0162; F= 7,0)</p> <p>(n=10)</p> <p>Am 1. und 2. Tag nach LPS-Gabe kam es bei den WKY zu einer signifikanten Reduktion der Futteraufnahme</p>	<p>T0: 20,82 ± 0,51g</p> <p>T1: 20,45 ± 0,57g</p> <p>T2: 22,12 ± 0,82g (n=10)</p>
SH- vs WKY	<p>T0: (p= 0,0488; F= 4,5)</p> <p>T1: (p= 0,0013; F= 14,4)</p> <p>Am Tag vor (T0) und am Injektionstag zeigten WKY im Vergleich zu SHR eine reduzierte Futteraufnahme</p>	Keine signifikanten Unterschiede in der Futteraufnahme

Am Tag der LPS-Stimulation (Tag 1, **Abbildung 61**) zeigten beide Rattenstämme eine Reduktion ihrer Futteraufnahme, die bei den WKY-Ratten deutlich und signifikant stärker ausfiel. Während sich bei den SHR der Futterverbrauch am Folgetag (Tag 2) wieder denen der PBS-Tiere angleich, blieb die Appetitlosigkeit bei den LPS-behandelten WKY an diesem Tag allerdings in moderaterem Umfang bestehen. Am Tag vor der LPS-Gabe war die Futteraufnahme der SH-Ratten im Vergleich zu den WKY-Ratten leicht, aber signifikant erhöht. Das bekannte Phänomen der LPS-induzierten Anorexie scheint sich bei den SH-Ratten demzufolge wesentlich schwächer zu manifestieren als bei ihren genetischen Kontrolltieren, den WKY-Ratten.

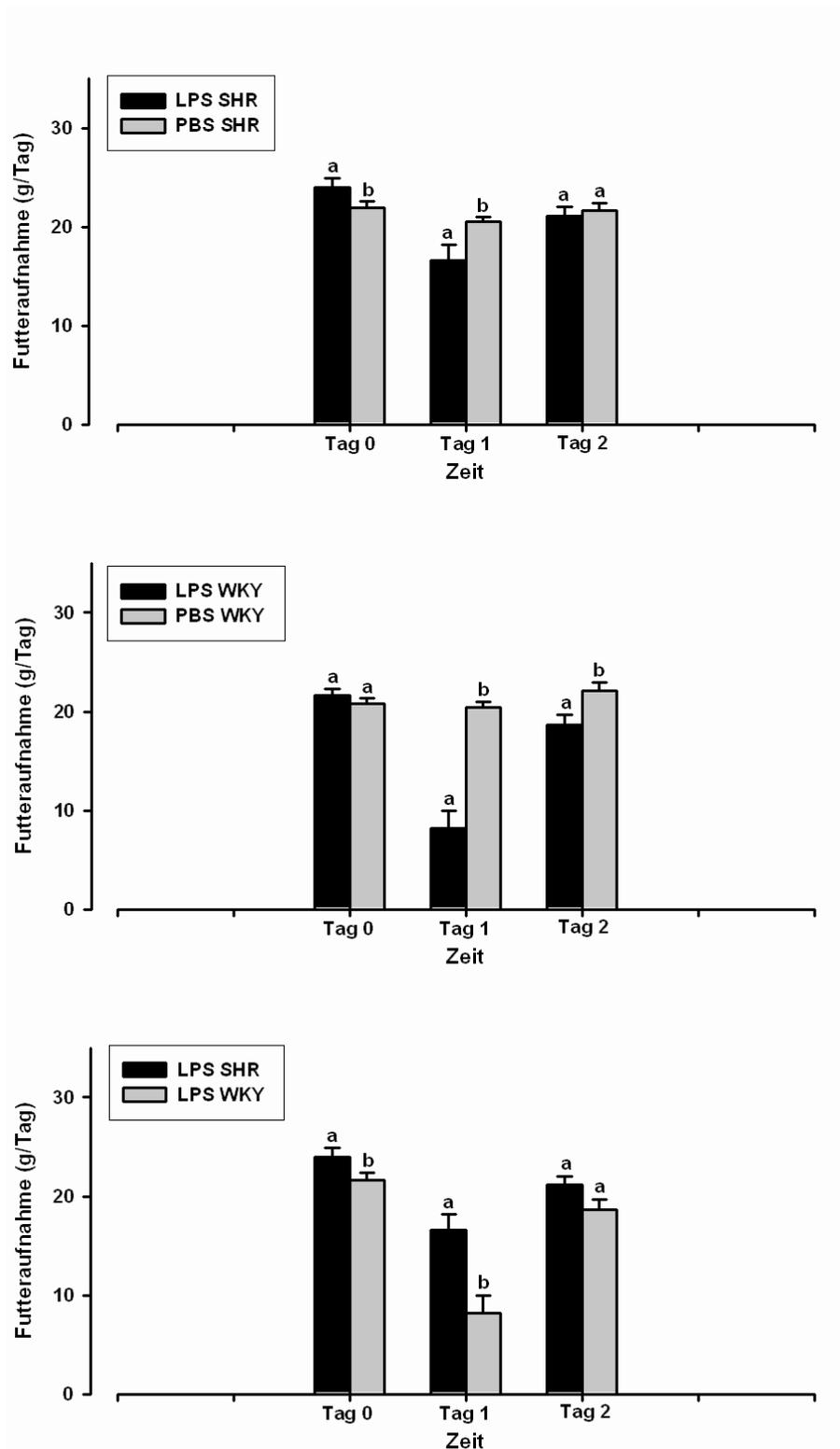


Abbildung 61: Vergleich der mittleren Futtermittelaufnahme der LPS- und PBS-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Tag „0“ stellt den Futtermittelaufnahme 24 Stunden vor der Injektion von LPS dar und zeigt somit die Futtermittelaufnahme der unbehandelten Tiere. Tag 1 und 2 stellen die Folgetage nach der Applikation der Substanzen dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.5.1.4. Wasseraufnahme nach intraperitonealer LPS-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Wasseraufnahme (g/Tag)	LPS-Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	<p>T0: 28,83 ± 1,40g T1: 20,15 ± 2,41g (p= 0,0006; F=16,2) T2: 31,10 ± 1,15g (n=10)</p> <p>Am Injektionstag war die Wasseraufnahme signifikant reduziert</p>	<p>T0: 30,67 ± 1,39g T1: 31,01 ± 1,21g T2: 31,60 ± 0,80g (n=13)</p>
WKY-Ratten	<p>T0: 27,80 ± 1,18g T1: 12,27 ± 1,55g (p= <0,0001; F= 68,0) T2: 31,53 ± 0,79g (p= 0,0136; F= 7,8) (n=10)</p> <p>Am Injektionstag war die Wasseraufnahme signifikant reduziert, am Folgetag dagegen signifikant erhöht</p>	<p>T0: 26,66 ± 1,26g T1: 26,83 ± 0,93g T2: 27,39 ± 1,44g (n=10)</p>
SH- vs WKY	<p>Am Injektionstag fiel die Reduktion der Wasseraufnahme bei den WKY stärker aus, als bei den SHR T1: (p= 0,0131; F= 7,6)</p>	<p>T1: (p= 0,039; F= 4,796) T2: (p= 0,0102; F= 7,974) Bei den PBS-behandelten Tieren konnte ein signifikanter Steigerung im Trinkverhalten der SHR-Tiere beobachtet werden</p>

Beide LPS-behandelten Rattenstämme zeigten am Tag der LPS-Injektion eine signifikante Reduktion der Wasseraufnahme im Vergleich zu den jeweiligen PBS-Kontrollgruppen. Diese LPS-induzierte Adipsie fiel bei den WKY-Ratten signifikant stärker aus als bei den SH-Ratten. Am Folgetag normalisierte sich das Trinkverhalten bei beiden Rattenstämmen wieder, die WKY-Ratten zeigten sogar eine im Vergleich zu den mit PBS-behandelten Tieren erhöhte Wasseraufnahme (siehe **Abbildung 62**).

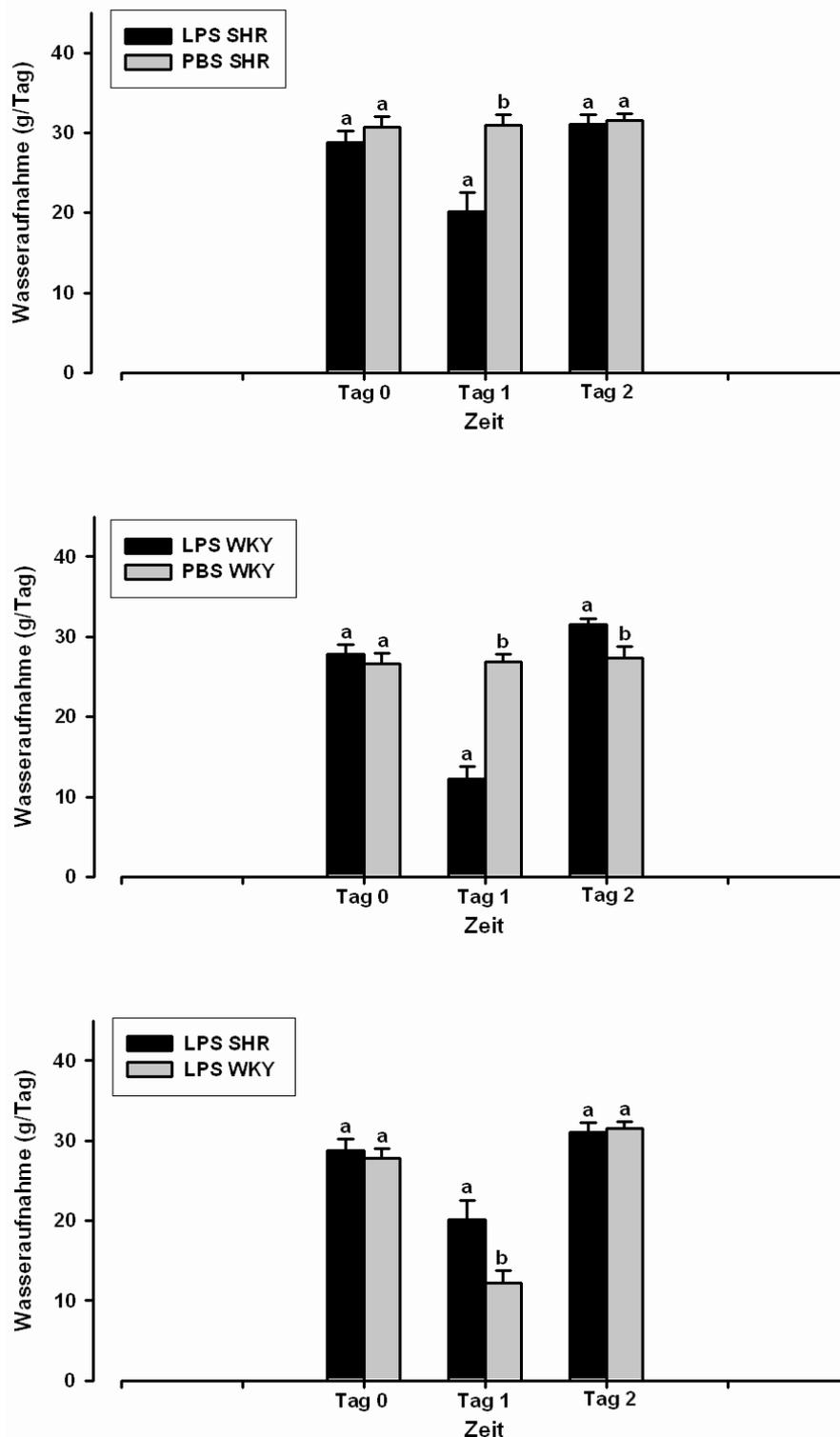


Abbildung 62: Vergleich der mittleren Wasseraufnahme der LPS- und PBS-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Tag „0“ stellt den Wasserverbrauch 24 Stunden vor der Injektion von LPS dar und zeigt somit die Wasseraufnahme der unbehandelten Tiere. Tag 1 und 2 stellen die Folgetage nach der Applikation der jeweiligen Substanz dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch

signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

3.5.1.5. Gewichtsveränderung nach intraperitonealer LPS-Stimulation. Vergleich zwischen SHR und WKY-Ratten.

Gewichtsveränderung (g/Tag)	LPS-Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	<p>T0: $4,07 \pm 1,25g$ T1: $-8,07 \pm 3,03g$ (p= <0,0001; F= 23,4) T2: $6,28 \pm 1,24g$ (p= 0,0203; F= 6,3) (n=10)</p> <p>am Stimulationstag kam es zu einer signifikanten Gewichtsreduktion bei den SHR, woraufhin sie am Folgetag stark zunahmen</p>	<p>T0: $8,62 \pm 1,27g$ T1: $2,38 \pm 0,61g$ T2: $-1,38 \pm 0,56g$ (n=13)</p>
WKY-Ratten	<p>T0: $6,85 \pm 1,38g$ T2: $-15,64 \pm 2,32g$ (p= <0,0001; F= 62,4) T2: $8,87 \pm 2,39g$ (p= 0,0136; F= 7,5) (n=10)</p> <p>Auch bei den WKY kam erst zu einer Gewichtab- und dann zu einer stärkeren Zunahme</p>	<p>T0: $7,12 \pm 1,29g$ T1: $3,8 \pm 0,82g$ T2: $1,48 \pm 1,26g$ (n=10)</p>

SH- vs WKY	Die Gewichtsab- und Zunahmen fielen bei den WKY signifikant stärker aus T1: (p= 0,0085; F= 8,7) T2: (p= 0,0481; F= 4,5)	
-------------------	--	--

SHR und WKY-Ratten zeigten am Tag nach der Pyrogengabe eine deutliche Reduktion des Körpergewichts, die bei den WKY-Ratten signifikant stärker ausfiel. Am 2.Tag nach LPS-Gabe kam es hingegen bei beiden Stämmen bereits wieder zu einer Zunahme des Gewichts, auch dieser Effekt war bei den WKY-Ratten stärker ausgeprägt. Die Gewichtsentwicklung der mit PBS-behandelten Kontrollratten verlief nicht konstant, die SH-Ratten nahmen am zweiten Tag nach der Injektion sogar leicht ab.

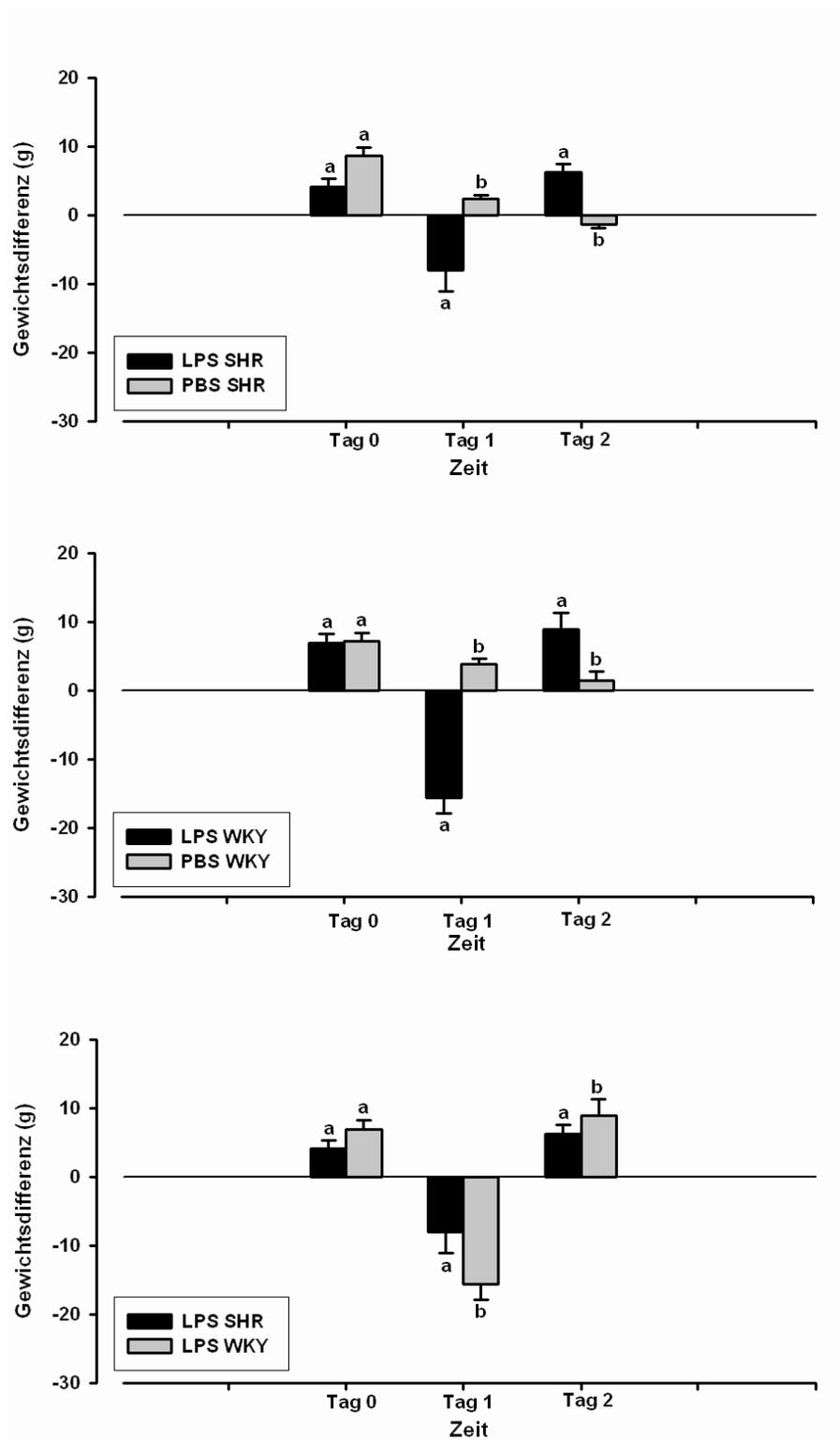


Abbildung 63: Vergleich der mittleren Gewichtsentwicklung der LPS- und PBS-behandelten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse wurden jeweils als 24-Stunden-Werte ermittelt, als Differenz zum Gewicht des Vortags angegeben und sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt. Wie bei den Abb. der Futter- und Wasseraufnahme zeigt hier der Tag „0“ die Gewichtsentwicklung vor Pyrogengabe. Tage 1 und 2 stellen den Injektions- und Folgetag dar. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen in dem zu vergleichenden Untersuchungsintervall an.

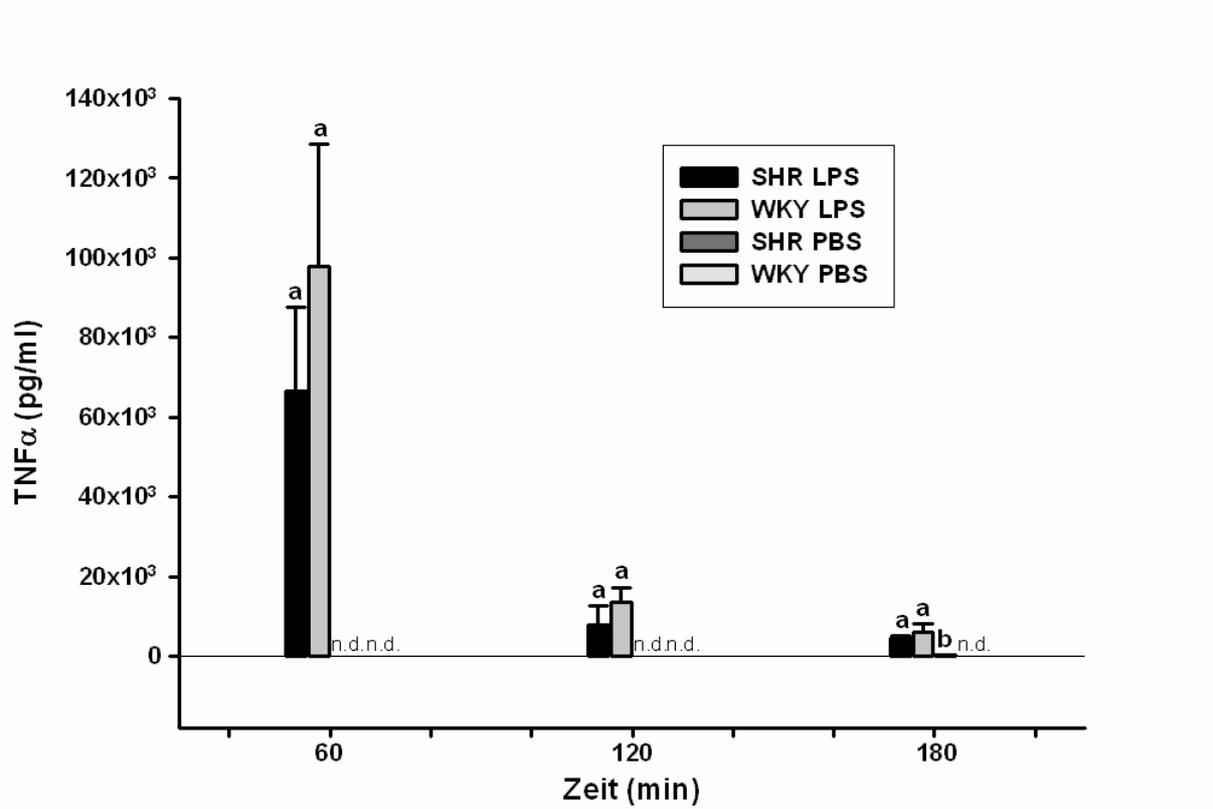


Abbildung 64: TNF α -Entwicklung 60, 120 und 180 min nach LPS-Applikation im Vergleich zu den PBS-Kontroll-Gruppen. Die Säule repräsentiert den Mittelwert \pm S.E.M. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an.

3.5.2.2. Plasmawerte von IL-6

IL-6	LPS-Stimulation	PBS-Stimulation
SH-Ratten	60 min post injectionem : 2649 ± 747 IU/ml (p= 0,0135 ; F= 12,0) 120 min post injectionem : 3212 ± 920 IU/ml (p= 0,0148; F= 11,5) 180 min post injectionem : 4105 ± 1406 IU/ml (p= 0,0289; F= 8,2)	60 min post injectionem : 65 ± 12 IU/ml 120 min post injectionem : 99 ± 18 IU/ml 180 min post injectionem : 86 ± 39 IU/ml
WKY-Ratten	60 min post injectionem: 2714 ± 560 IU/ml (p= 0,0033; F= 22,2) 120 min post injectionem: 4852 ± 1445 IU/ml (p= 0,027; F= 8,5) 180 min post injectionem : 13573 ± 3027 IU/ml (p= 0,0042; F= 20,0)	60 min post injectionem : 74 ± 27 IU/ml 120 min post injectionem : 20 ± 98 IU/ml 180 min post injectionem : 43 ± 20 IU/ml
SH vs WKY	signifikanter Unterschied bei 180 Minuten (p= 0,0297; F= 8,0)	keine relevanten Unterschiede

In den gleichen Plasmaproben wurden auch die Konzentrationen an IL-6 gemessen. Bei beiden Rattenstämmen wurde nach LPS-Stimulation ein deutlich erhöhter Gehalt an IL-6 im Plasma nachgewiesen, der zu allen Zeitpunkten signifikant über dem der PBS-behandelten Tiere lag. Bei beiden Stämmen stieg der zirkulierende IL-6-Spiegel nach LPS-Gabe kontinuierlich an (siehe **Abbildung 65**), nach 180 min waren die bei den WKY-Ratten gemessenen Konzentrationen signifikant höher als bei den SH-Ratten (p= 0,0297; F= 8,0).

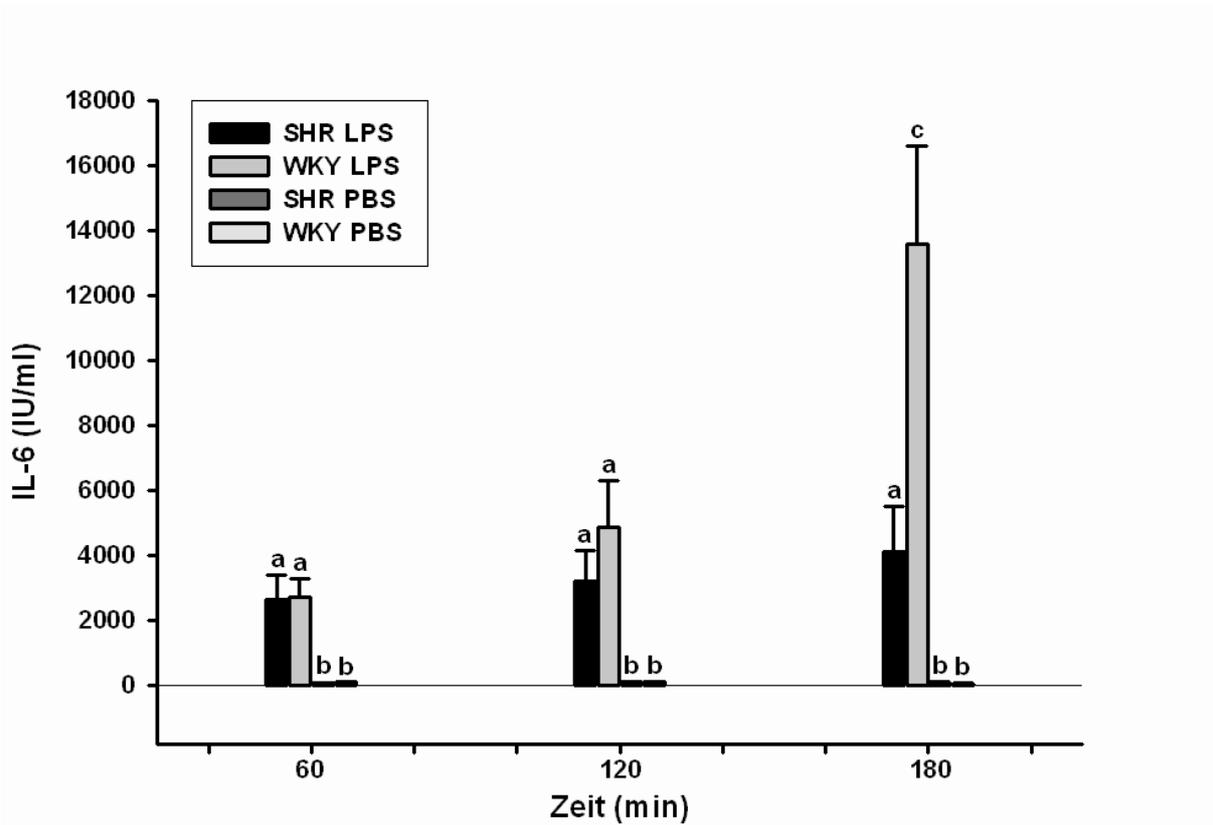


Abbildung 65: IL-6-Entwicklung 60 min nach LPS-Applikation im Vergleich zu den PBS-Kontroll-Gruppen. Die Säule repräsentiert den Mittelwert \pm S.E.M. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen an.

3.5.3. Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach intraperitonealer Injektion von LPS

3.5.3.1. Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3

Auch in diesem Versuch wurde die Stärke der durch LPS induzierten inflammatorischen Aktivierung fieberrelevanter Gehirnstrukturen durch Quantifizierung der nukleären STAT3-Signale ermittelt. Dies erschien bei gerade diesem Versuch von besonderem Interesse, da die nukleäre STAT3-Aktivierung im ZNS unter inflammatorischen Bedingungen größtenteils durch IL-6 vermittelt wird und bezüglich der zirkulierenden Konzentrationen dieses Zytokins zumindest zu einem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Rattenstämmen festgestellt wurde (siehe **Abbildung 66**).

STAT-3-aktivierte Zellen nach LPS-Stimulation	SHR	WKY
OVLT	83 ± 18,6	88 ± 12,3
SFO	131 ± 30,1	107 ± 21,3
ME	36 ± 8,3	23 ± 3,4
AP	30 ± 9,8	30 ± 5,5

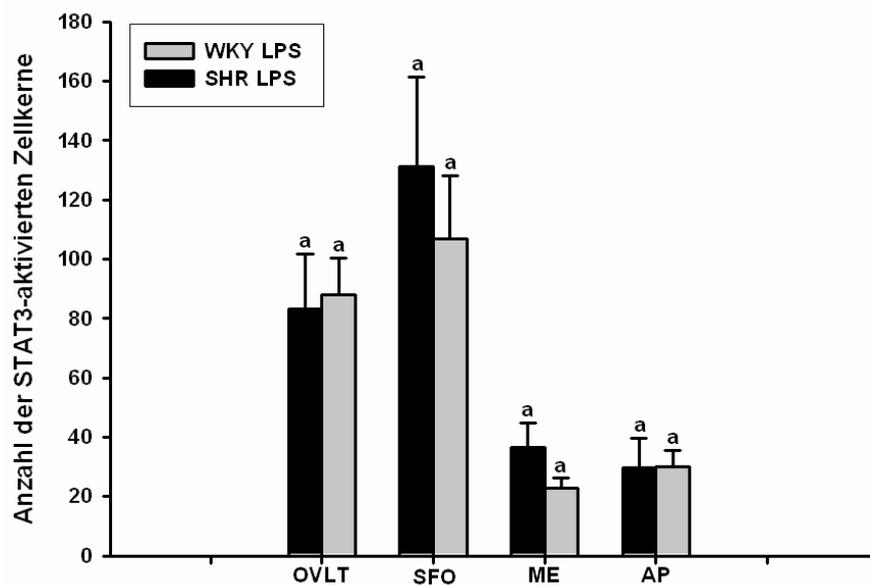


Abbildung 66: Vergleich der mittleren ausgezählten STAT-3-Signale der LPS-behandelten SHR und WKY-Ratten 120 Minuten post injectionem. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. Die identischen Buchstaben über den Säulen zeigen an, dass in keiner Struktur ein signifikanter Unterschied zwischen SHR und WKY-Ratten bezüglich der Zahl der STAT-3-positiven Zellkerne vorlag.

Die Zahlen der STAT-3-Signale nach LPS-Gabe entsprachen etwa der nach MALP-2-Gabe, fielen jedoch etwas geringer aus, die beiden Rattenstämmen zeigten keinerlei statistisch signifikante Unterschiede in der Ausprägung der LPS-induzierten nukleären STAT-3-Signale.

Auch nach LPS-Gabe erfolgte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 bei beiden Rattenstämmen in etwa gleicher Stärke.

STAT-3-aktivierte Zellen nach PBS-Stimulation	SHR	WKY
OVLT	1 ± 0,3	4 ± 1,6
SFO	0 ± 0,2	1 ± 0,9
ME	0 ± 0,3	1 ± 0,6
AP	0 ± 0	1 ± 0,7

Nach Behandlung der Ratten mit PBS traten, wie bereits erwähnt, nur vereinzelte STAT3-positive Zellkerne in Strukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke auf.

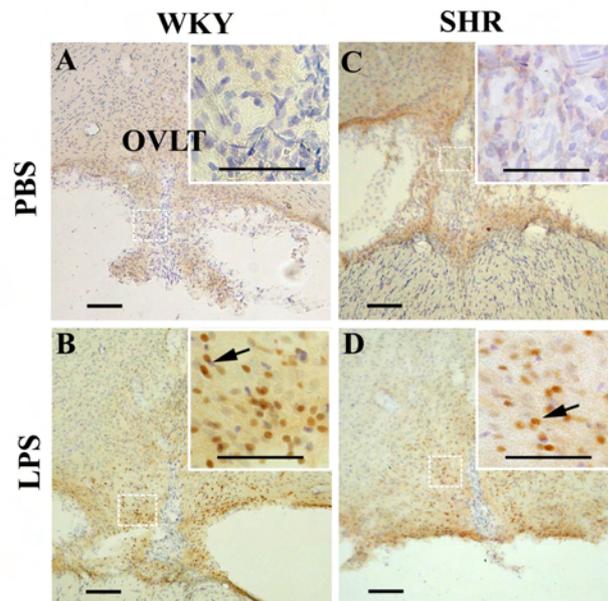


Abbildung 67: OVLT nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und LPS (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende Abb. 43. LPS führte nach Applikation von LPS sowohl bei den SHR (Abb. D) wie auch bei den WKY (Abb. B) zu einer großen Anzahl positiver STAT3-Signale im Kern, die bei beiden Rattenstämmen gleich stark ausgeprägt war. PBS hingegen führte weder bei den SHR (Abb. C) noch bei den WKY (Abb. A) zu einer relevanten Aktivierung der STAT3-Signale.

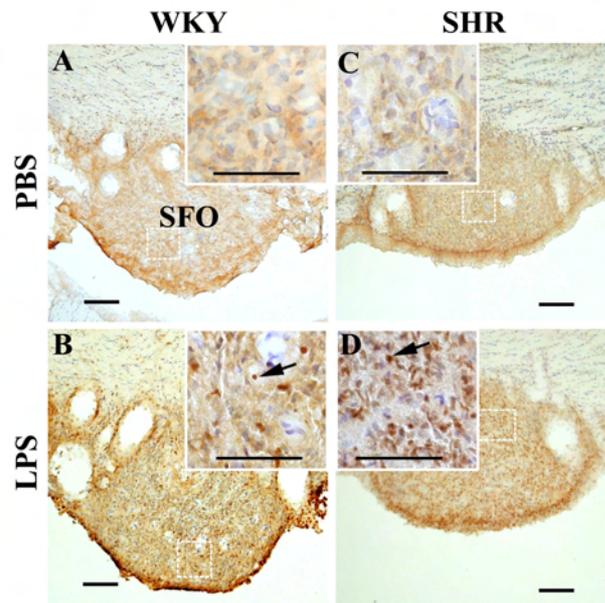


Abbildung 68: SFO nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und LPS (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende Abb. 43. Ähnlich wie beim OVLT konnten auch im SFO nach Stimulation mit LPS eine hohe Anzahl nukleärer STAT3-Signale ermittelt werden (SHR Abb. D, WKY Abb. B), deren Anzahl sogar etwas über den Werten des OVLT lagen. PBS führte auch im SFO zu keiner deutlichen Aktivierung der STAT3-Signale (SHR Abb. C, WKY Abb. A).

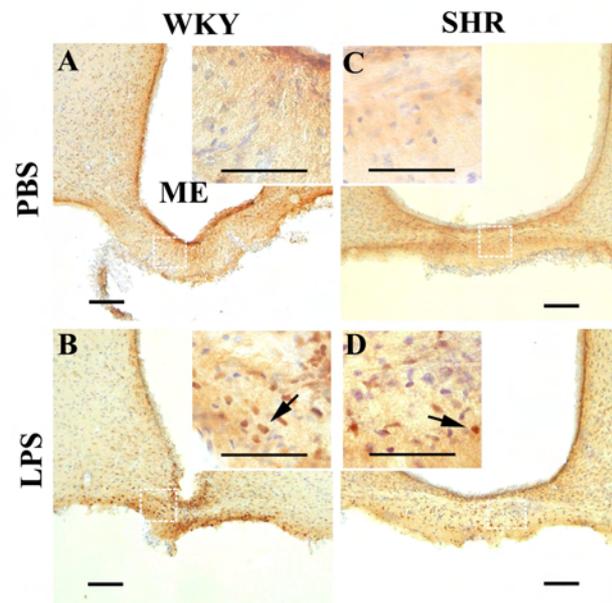


Abbildung 69: ME nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und LPS (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende Abb. 43. In der ME konnte bei beiden Rattenstämmen eine Aktivierung der STAT3-Signale nachgewiesen werden, sie lagen zahlenmässig aber deutlich unter den Werten der im OVLT und SFO ermittelten Werte. Auch hier konnte PBS zu keiner nennenswerten Aktivierung der STAT3-Signale führen.

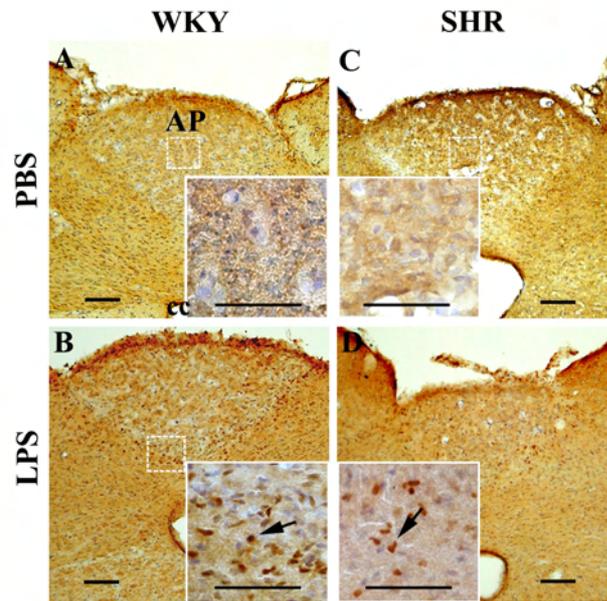


Abbildung 70: AP nach Injektion von PBS (Abb. A SHR, Abb. C WKY) und LPS (Abb. B WKY, Abb. D SHR). Siehe Legende Abb. 43. Der ME gleichen kam es auch bei der AP nach LPS-Gabe zu einer geringradigen Aktivierung der STAT3-Signale, die aber deutlich unter den Werten des OVLT und des SFO lagen. Zwischen den Rattenstämmen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.5.4. Zirkulierendes PGE2 bei WKY- und SH-Ratten nach intraperitonealer Stimulation mit FSL-1, MALP-2 oder LPS

Zu allen untersuchten Zeitpunkten waren in den Kontrollgruppen beider Rattenstämme basale Spiegel an PGE2 im Blutplasma messbar, die im Mittel bei Werten von 90 bis 150 pg/ml lagen. Durch die Behandlung mit den drei Pyrogenen stiegen die Konzentrationen an PGE2 zu allen Zeitpunkten nach i.p. Injektion von FSL-1, MALP-2 oder LPS bei den meisten Tieren im Vergleich zu den mit PBS oder Cremophor behandelten Ratten auf das 2-4-fache an. Bei einzelnen Ratten waren jedoch zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit dem jeweiligen Pyrogen lediglich basale PGE2-Spiegel im Blut messbar. Insgesamt konnten bezüglich der PGE2-Konzentrationen im Blut keine Unterschiede zwischen WKY- und SH-Ratten nachgewiesen werden.

IV. Diskussion

Zentrales Ziel der Studie war es, eine mögliche essentielle Bedeutung von TLR-2 sowie von CD36 bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome nach systemischer Stimulation mit mykoplasmaalen Lipopeptiden FSL-1 und MALP-2 zu untersuchen.

Wie bereits einleitend beschrieben, agieren die TLR-Rezeptoren als Schlüsselrezeptoren zur Erkennung sogenannter PAMPs, welche als beständige, spezifische Strukturen von Pathogenen angesehen werden können. Der hier untersuchte TLR2-Rezeptor ist in der Lage, eine Vielzahl mikrobieller Bestandteile wie z.B. diacylierte Lipopeptide (MALP-2/FSL-1) zu erkennen und so frühzeitig das angeborene Immunsystem zu aktivieren. Um MALP-2 oder FSL-1 erkennen zu können, geht der TLR2-Rezeptor eine Verbindung mit dem TLR6 ein und bildet mit diesem ein Heterodimer (Schnare *et al.*, 2006), das nach Aktivierung durch die spezifischen PAMPs eine Signalkaskade ins Zellinnere auslöst und über eine Zytokinfreisetzung die Akute-Phase-Reaktion auslöst (Conti *et al.*, 2004; Dinarello, 2004). Neben dem Heterodimer TLR2/6 wird eine Beteiligung des CD36 an der Aktivierung und Signalweiterleitung vermutet (Hoebe *et al.*, 2005). Der CD36 soll die Bindung der Liganden an die TLR2/6-Heterodimere vereinfachen und deren Antwort verstärken (Hoebe *et al.*, 2005; Lubick & Jutila, 2006).

1. Reaktivität der TLR2-ko-Mäuse gegenüber mykoplasmaalen Lipopeptiden und LPS

Wie bereits beschrieben, bildet der TLR2 jeweils ein Heterodimer mit zwei weiteren TLRs, dem TLR1 und TLR6. Es existieren bereits *in vitro* Studien, in denen beschrieben wird, dass Makrophagen von TLR6-ko-Mäusen nach Stimulation mit diacylierten Lipopeptiden keine gesteigerte inflammatorische Zytokinproduktion vorweisen konnten (Takeuchi *et al.*, 2001), und somit der TLR6 von entscheidender Bedeutung bei der Induktion von Zytokinen zu sein scheint. Es ist jedoch noch unklar, ob der TLR6-Defekt *in vivo* im Zusammenhang mit der Zytokinproduktion zu veränderten Krankheitssymptomen führt. Auch für TLR2-ko-Tiere lagen bisher noch keine genaueren Untersuchungen zu Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome vor, so dass sich die Frage stellte, ob auch dieser Gendefekt zu einer verminderten Ansprechbarkeit der Tiere auf mykoplasmaale Lipopeptide führen kann.

Unsere Untersuchungen ergaben, dass durch das Fehlen des TLR2 keinerlei inflammatorische Effekte durch mykoplasmale Lipopeptide zu induzieren waren. Während die C57/BL-6-Mäuse nach Stimulation mit MALP-2 und FSL-1 ca. 1,5-5 Stunden nach Injektion der Lipopeptide mit einem monophasischen Fieber reagierten, waren bei den ko-Mäusen bis auf den Stresspeak keinerlei Temperaturerhöhungen zu verzeichnen. Ebenso war der für Mäuse charakteristische Aktivitätsrhythmus mit hoher Nacht- und niedriger Tagaktivität bei den TLR2-ko-Mäusen nach Stimulation mit MALP-2 oder FSL-1 nicht beeinträchtigt. Bei den C57/BL-6-Mäusen war dagegen am Injektionstag die Nachtaktivität stark eingeschränkt. Dieser Befund zeigt, dass nicht nur Fieber, sondern auch „sickness behavior“, induziert durch mykoplasmale Lipopeptide, auf der Anwesenheit des TLR2 beruht. Auch die Zytokinwerte der TLR2-ko-Mäuse wichen deutlich von denen der Kontrollmäuse ab. Während die Kontrollmäuse 90 Minuten nach Stimulation durch Lipopeptide mit einer deutlichen Zunahme der TNF- sowie der IL-6-Werte auf bis zu 70000 pgTNF/ml nach MALP-2 und 25000 pgTNF/ml nach FSL-1 sowie 2300 bzw. 1200 IU/ml IL-6 nach MALP-2/FSL-1-Gabe reagierten, konnte bei den TLR2-ko-Mäusen kein Anstieg der Zytokinwerte im Vergleich zu den PBS- und Cremophor-Kontrollen verzeichnet werden.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der TLR2 für die Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome durch mykoplasmale Lipopeptide wie MALP-2 oder FSL-1 essentiell ist, und dass sein Fehlen das Ausbleiben der durch das angeborene Immunsystem verursachten Krankheitssymptome zur Folge hat. Die Entwicklung der Krankheitssymptome scheint zytokingesteuert zu sein, da die erhöhten IL-6-Werte mit der Entwicklung der Körpertemperatur korrelieren (LeMay *et al.*, 1990; Roth & De Souza, 2001). Diese führen über die Beteiligung an der APR zur Entwicklung des „sickness behavior“ (LeMay *et al.*, 1990). Die TNF-Werte korrelieren nicht mit der Fieberentwicklung, es ist aber bekannt, dass TNF als zuerst auftretendes Zytokin (Roth *et al.*, 1993; Jansky *et al.*, 1995) in der Lage ist, die Expression von IL-1 β (Dinarello *et al.*, 1986) und IL-6 zu induzieren, und somit die APR in Gang zu setzen. Viele Versuche zeigten, dass die Zytokine, als Injektion appliziert, selbst in der Lage sind, eine Fieberreaktion auszulösen (IL-1 β (Anforth *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998b), TNF (Dinarello *et al.*, 1986; Goldbach *et al.*, 1996), IL-6 (Blatteis *et al.*, 1990; Harre *et al.*, 2002)).

Es wäre sinnvoll, ergänzende Untersuchungen mit TLR6-ko-Mäusen vorzunehmen, um das genauere Zusammenspiel des Heterodimers aus TLR2/6 so wie die Gewichtung der einzelnen Rezeptoren bei der Signaltransduktion vergleichend untersuchen zu können.

Die Versuche mit dem Lipopolysaccharid (LPS), welches mit dem TLR4 reagiert, zeigten bei den C57/BL-6- wie auch bei den TLR2-ko-Mäusen vergleichbare Ergebnisse. Beide Mäusestämme bildeten nach Stimulation mit LPS Fieber aus, das bei den Kontrollmäusen allerdings etwas länger andauerte. In der ersten Nacht konnte bei beiden Mäusestämmen ein deutlicher Rückgang der Aktivität verzeichnet werden. Die IL-6- und TNF-Werte waren in beiden Fällen auf bis zu 14000 IU/ml bzw. 100000 pgTNF/ml stark erhöht und unterschieden sich innerhalb der verschiedenen Tiergruppen statistisch nicht voneinander.

Hiermit konnte deutlich gezeigt werden, dass TLR2-ko-Mäuse durchaus in der Lage sind, bei entsprechender Stimulation zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome auszubilden, dass bei der Induktion der LPS-vermittelten Krankheitssymptome der TLR2 nicht einmal anteilig mitwirkt und dass somit die bei den vorherig angesprochenen Versuchen verwendeten mykoplasmaalen Lipopeptide nicht mit Lipopolysacchariden verunreinigt waren. Auch hier korreliert bei beiden Mäusestämmen die Temperaturerhöhung mit den IL-6-Werten.

2. Reaktivität der CD36- defizienten SH-Ratten gegenüber mykoplasmaalen Lipopetiden und LPS

Hoebe veröffentlichte 2005 Ergebnisse, die darauf schließen ließen, dass neben dem TLR 1 und 6, die mit TLR2 ein Heterodimer bilden, ein weiterer Rezeptor für einen Teil der TLR2-spezifischen PAMP-Erkennung mit verantwortlich ist (*Hoebe et al.*, 2005). Er beschrieb, dass der CD36-Rezeptor dem TLR2 die Erkennung von MALP-2 und Lipoteichoinsäure (LTA) zu erleichtern und positiv zu beeinflussen scheint und TLR2 so in der Lage ist, eine adäquate frühe Immunantwort auszulösen. In den aufgezeigten Versuchen wurden Makrophagen CD36-defizienter Mäuse verwendet, die mit verschiedenen PAMPs wie den diacylierten Lipopeptiden MALP-2 und LTA sowie triacylierte Lipopeptiden wie PAM₃CSK₄ und Zymosan oder aber dem viralen PAMP Poly I:C (synthetische Doppelstrang RNA) stimuliert wurden. Die Ergebnisse zeigten bei den Makrophagen der CD36-defizienten Mäuse eine deutliche Reduktion der TNF-Werte nach Stimulation mit MALP-2 und LTA im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die TNF-Produktion wurde also nicht vollständig unterdrückt, aber deutlich abgeschwächt, was für den positiven Einfluss des CD36 auf die

Signalweiterleitung und Signalstärke des TLR2 spricht. Die anderen verwendeten PAMPs führten zu einer uneingeschränkten Zytokinbildung in Abwesenheit von CD36.

Des Weiteren untersuchten Hoebe et al. die Anfälligkeit der CD36-defizienten Mäuse gegenüber *Staphylokokkus aureus*, das als PAMP neben den Peptidoglykanen auch Lipoteichonsäure enthält. Hierzu verwendete er neben den Kontrolltieren und den CD36-ko-Mäusen auch TLR2-ko sowie Tirap-ko-Mäuse. Er injizierte ihnen *Staph. aureus* und untersuchte die Überlebensraten. Die TLR2-ko-Mäuse erlagen der Staphylokokken-Infektion innerhalb von 5 Tagen. Die CD36- und die Tirap-ko-Mäuse zeigten eine nicht ganz so deutlich ausgeprägte Anfälligkeit gegenüber dem Bakterium. Sie siedelten jedoch mehr Bakterien im Organismus an und verstarben häufiger als die Kontrolltiere, die keinen genetischen Defekt aufzeigten.

In weiteren Untersuchungen übertrug er CD36, TLR2 und/oder TLR6 sowie das NF- κ B-Rezeptorgen auf neutrale HEK-293 Zellen mit dem Ergebnis, dass sowohl MALP-2 wie auch LTA zu einer starken NF- κ B-Produktion führten. CD36 und TLR6 allein führten zu keiner NF- κ B-Bildung, der TLR2-Rezeptor konnte hingegen auch im Alleingang eine Bildung von NF- κ B auslösen, allerdings in geringerem Maße. Bereits eine Addition von CD36 oder TLR6 führte zu einer Steigerung der NF- κ B-Bildung, was darauf rückschließen ließ, dass CD36 und TLR6 die Antwort des TLR2 auf die PAMPs MALP-2 und LTA unterstützen.

Hoebe et al. kam zu dem Schluss, dass der CD36-Rezeptor die Erkennung diazylierter Lipopeptide vereinfacht und dem Heterodimer TLR2/6 als Co-Rezeptor, ähnlich dem CD14 bei der Signaltransduktion des TLR4 bei der LPS-Erkennung zurarbeitet.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend suchten wir nach geeigneten Möglichkeiten, die CD36-Defizienz im Zusammenhang mit zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen nach systemischer Stimulation mit mykoplasmaalen Lipopeptiden FSL-1 und MALP-2 zu untersuchen. Wir entschieden uns für die spontan hypertensiven Ratten als Tiermodell, da sie aufgrund einer Mutation auf dem Chromosom 4 eine CD36-Defizienz aufweisen, zudem gut erhältlich waren und bei ihnen zusätzlich die inflammatorische Aktivierung des Gehirns mittels Immunhistochemie untersucht werden konnte.

Die Stimulation mit den mykoplasmaalen Lipopeptiden MALP-2 und FSL-1 führte bei den SHR wie bei den WKY-Kontrollratten zu einer Fieberentwicklung, bei der nur im Falle

der MALP-Stimulation der SHR eine leichte Reduktion des Fiebers mit signifikantem Unterschied im Zeitraum von 170-435 min post injectionem festgestellt werden konnte.

Im Falle der restlichen gemessenen Parameter des „sickness behaviors“ (Futteraufnahme, Wasseraufnahme, Gewichtsentwicklung und Aktivität) konnten bei MALP-2-Stimulation keinerlei statistisch relevante Unterschiede zwischen den SHR und den WKY-Ratten festgestellt werden. Einzig bei Verwendung von FSL-1 zeigten sich am ersten Tag nach Stimulation Unterschiede zwischen den SHR und Kontrolltieren, da die SHR weder eine Einschränkung ihrer Aktivität, noch ihrer Futter- und Wasseraufnahme sowie ihrer Gewichtsentwicklung zeigten, die bei den WKY-Tieren jeweils ausgeprägt waren.

Die Messung der Zytokinwerte brachte weder bei MALP-2 noch bei FSL-1 feststellbare Unterschiede zu Tage. Die TNF- wie auch die IL-6-Werte waren bei den SHR und WKY-Ratten durch die Stimulation deutlich erhöht und zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede. Die anfangs bei 60 min post injectionem stark angestiegenen TNF-Werte sanken im Verlauf der weiteren Messungen jeweils wieder ab. Dieser treppenartige Verlauf zeigt, dass TNF für die anfängliche Induktion, jedoch nicht für die Aufrechterhaltung des Fiebers verantwortlich sein kann. Er induziert die Bildung von IL-1 β , welches dann die Freisetzung von IL-6 induzieren kann (Luheshi *et al.*, 1996). Deutlich zu sehen ist auch die zeitabhängige Zunahme der IL-6-Werte im Versuchsverlauf. Die anfangs leicht erhöhten Werte bei 60 min post injectionem steigerten sich bei den zwei weiteren Messungen bei 120 und 180 min jeweils deutlich. Diese Erhöhung korreliert sehr gut mit der Fieberentwicklung der Tiere und identifiziert IL-6 als verantwortliches Zytokin der Fiebererhaltung (LeMay *et al.*, 1990; Roth & De Souza, 2001).

Den Zytokinwerten gleichend konnten auch bei der inflammatorischen Aktivierung des Gehirns, die mittels Quantifizierung der STAT3-Signale in den relevanten Gehirnstrukturen untersucht wurde, keine relevanten Unterschiede zwischen den SHR und den WKY festgestellt werden. Beide Pyrogene führten zu einer deutlichen Ausbildung der STAT3-Signale in den Zellkernen, die besonders gut im OVLT und dem SFO ausgeprägt war.

Bei der LPS-Stimulation beider Rattenstämme trat unerwarteter Weise eine recht deutliche Reduktion der Fieberantwort der SHR gegenüber den WKY-Ratten auf. Auch die SHR entwickelten im Bereich von 150-300 min nach der Stimulation ein deutliches Fieber, welches aber in statistisch signifikantem Ausmaß im Zeitraum von 270-510 min nach Injektion von LPS unter dem der WKY-Ratten lag.

Auch die anderen Parameter des „sickness behavior“ unterschieden sich zumindest am ersten Tag nach der Stimulation mit LPS zwischen den Rattenstämmen. So zeigten zwar die SHR wie die WKY eine Reduktion der Futter- und Wasseraufnahme, sowie daraus folgend eine Einschränkung in ihrer Gewichtsentwicklung. Allerdings fielen diese Veränderungen bei den WKY deutlicher und in signifikantem Ausmaß stärker aus. Auch die Aktivität war bei den WKY im Vergleich zu den SHR deutlicher gesenkt.

Die Zytokinmessungen lieferten dazu passende Ergebnisse. Während sich die Entwicklung der TNF-Konzentration zwischen den Ratten zwar nicht statistisch voneinander unterschied (wobei trotz allem zu erwähnen ist, dass die gemessenen TNF-Werte bei den SHR deutlich unter denen der WKY lagen), zeigten sich bei den 180-min-Werten der IL-6-Konzentrationen statistisch relevante Unterschiede, bei denen die Werte der WKY-Ratten mit ca. 13500 IU/ml deutlich über denen der SHR (ca. 4500 IU/ml) lagen. Bei den SHR konnte im zeitlichen Verlauf keine deutliche Steigerung der IL-6-Werte festgestellt werden.

Die inflammatorische Aktivierung relevanter Gehirnstrukturen erbrachte hingegen keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen. In allen Hirnregionen wurden ähnliche Anzahlen der in Zellkernen vorkommenden STAT3-Signale ermittelt und entsprach somit den Ergebnissen nach Stimulation mit den mykoplasmaalen Lipopeptiden.

Wie sind diese Ergebnisse nun aber mit den Ergebnissen von Hoebe (Hoebe *et al.*, 2005) in Einklang zu bringen? Prinzipiell zeigten die SHR gegenüber den WKY zwar eine reduzierte Fieberantwort, was den Schluss zuließe, eine Beteiligung von CD36 an der TLR2/6 vermittelten Immunantwort zu vermuten, jedoch zeigten die restlichen Parameter des „sickness behaviors“ keinerlei Einschränkung bei den SHR. Der CD36 scheint für die Erkennung von MALP-2 also nicht essentiell zu sein, könnte den TLR2/6 aber moderat unterstützen. Die sich nicht unterscheidende Zytokinbildung zeigt jedoch deutlich, dass die CD36-Defizienz die Zytokinproduktion in keinster Weise beeinträchtigt, und daraus folglich auch die inflammatorische Aktivierung des Gehirns keinerlei Beeinträchtigung erfährt, wie wir durch die Auswertung der STAT3-Signale bestätigen konnten. Auch bei der Stimulation mit FSL-1 zeigte sich, dass die Einflüsse des CD36 auf die Fieberentwicklung kaum ausgeprägt sind, da das ohnehin eher moderat ausgeprägte Fieber beider Rattenstämme bei den SHR in keinster Weise verringert wurde.

Die unerwartete Reduktion der inflammatorischen Krankheitserscheinungen der SHR auf eine LPS-Stimulation hin war in Vergleich, zu den bei MALP-2-Injektion erhobenen Befunden, bei den SHR stärker ausgeprägt und unterschied sich damit zu den Ergebnissen der

WKY in deutlicherem Ausmaß, obwohl keinerlei CD36-Beteiligung an der Reaktivität gegenüber LPS bekannt ist. Dies fiel im besonderen Maße bei der Fieberentwicklung auf, zeichnete sich aber auch bei der Futteraufnahme, der Wasseraufnahme, der Gewichtsentwicklung sowie der Aktivität der Tiere ab. Selbst die gemessenen IL-6-Werte bei 180 min post stimulationem zeigten eine deutliche Reduktion bei den SHR im Vergleich zu den WKY-Ratten.

Daraus lässt sich schließen, da die LPS-Responsivität bei den SHR sogar in deutlicherem Maße eingeschränkt ist als bei der bereits vermutet reduzierten MALP-2-Responsivität, dass dies nicht CD36-abhängig zu sein scheint, und somit nichts mit der CD36-Defizienz der SH-Ratten zu tun hat. Bei *in vivo*-Versuchen konnten die Ergebnisse von Hoebe also nicht bestätigt werden. Wie kann man die verminderte Reaktivität gegenüber MALP-2, FSL-1 und LPS aber dann erklären? Welche Ursachen kommen hierfür in Frage? Gegebenenfalls treten bei den SHR in dem großen Spektrum an genetischen Veränderungen auch solche auf, die antipyretisch wirkende Effekte erzielen und somit zu einer geringeren Fieberentwicklung führen.

Wie bereits erwähnt sind SHR nur vermindert in der Lage, eine Temperaturerhöhung durch zitterfreie Thermogenese via braunem Fettgewebe durchzuführen. Diese Art der Temperaturerhöhung scheint bei der Fieberentwicklung, zumindest beim Meerschweinchen, aber nur unter niedrigen Außentemperaturen stattzufinden (Blatteis, 1976).

Pausova beschrieb 1999, dass bei den SHR eine Veränderung auf dem Chromosom 20 vorliegt, welches für den TNF codiert (Pausova *et al.*, 1999). Er beobachtete, dass SHR mit einer geringeren Hypo- und Hyperthermie nach Gabe hoher Dosen von LPS reagierten, und dass dieser Temperaturunterschied nach Behebung der chromosomalen Veränderung verschwand. Bei unseren TNF-Messungen lagen die Werte der SHR zwar meistens unter denen der WKY-Ratten, dies jedoch nicht in signifikantem Ausmaß. Daher bringt dies keine Erklärung für unsere Ergebnisse.

Houssier beschrieb erst letztes Jahr, dass es bei den SHR durch die CD36-Defizienz zu einer Down-Regulation der COX2 im Bereich der Retina kommt (Houssier *et al.*, 2008). Falls es auch in anderen Körperregionen durch das Fehlen des CD36 zu einer Herabregulierung der COX2 käme, wäre dies eine Erklärung für die allgemein verminderte Reaktivität der SHR gegen die hier verwendeten Pyrogene, was aber rein spekulativ zu sehen ist, da hierzu bisher keine weiteren Untersuchungen betrieben wurden.

Des weiteren liegen Untersuchungen vor, die eine vermehrte IL-10-Produktion bei bakteriell erkrankten SH-Ratten zeigt (Bauhofer *et al.*, 2003). IL-10 ist antipyretisch wirksam

(Roth, 2006) und könnte bei erhöhter Expression in diesem Rattenstamm zu einer erniedrigten Reaktivität der Ratten gegenüber Pyrogen führen.

Neben dem IL-10 zeigen die SHR weitere Veränderungen in der Expression antipyretisch wirkender Substanzen. So zeigen sie in der Epiphyse eine 2-4 mal höhere Expression der Proopiomelanocortin (POMC)-RNA (Autelitano & van den Buuse, 1997). Eventuell liegt bei den SHR auch in anderen temperaturregulatorisch wichtigen Gehirnregionen eine erhöhte Expression des POMC vor, dem antipyretische Funktionen zugeschrieben werden (Roth, 2006).

Wie bereits bei der Charakterisierung der SHR erwähnt, liegt bei ihnen eine geringere Expression der GABA_B-Rezeptoren im Hypothalamus vor, was zu einem herabgesetzten negativen Feedback der ACTH- und Vasopressinbildung führt (Ichida & Kuriyama, 1998). Dies führt dann ggf. zu erhöhten Glukokortikoidwerten bei den SHR, da die negative Rückkopplung nicht ausreichend greifen kann. Glukokortikoide gehören zu den am stärksten wirkenden Entzündungshemmern, die zu einer verringerten Prostaglandinsynthese nach Pyrogengabe führen könnten, was somit eine erniedrigte Fieberantwort nach sich ziehen würde (Roth, 2006).

Skrede untersuchte die Aktivität der bei SHR in erhöhter Anzahl vorliegenden peritonealen Leukozyten und stellte fest, dass sie eine deutlich niedrigere Aktivität im Gegensatz zu den Leukozyten der WKY-Ratten zeigten (*Skrede et al.*, 1996). Er stellte ebenfalls eine erniedrigte Sensitivität der SHR gegenüber Dexamethason fest und deutlich erhöhte ACTH-Plasmawerte, die jedoch seiner Meinung nicht zu einer erhöhten Produktion von Kortikoiden führte. *Kenyon* hingegen berichtet von erhöhten ACTH-Werten, welche bei den SHR durchaus zu erhöhten Glukokortikoidspiegeln im Blut führen (*Kenyon et al.*, 1993). Auch *Hishimoto* stellte bei SHR erhöhte Plasmakortikosteronwerte fest (*Hashimoto et al.*, 1989). Erhöhte Cortisonwerte könnten also ggf. an der verminderten Reaktivität der SHR gegenüber den von uns verwendeten Pyrogenen sein. Die verminderte Aktivität der Leukozyten, die in der Peripherie die Produktion von Zytokinen übernehmen, könnte des weiteren ein Grund für das geringere Ansprechen der SHR gegenüber Entzündungsreizen sein.

Auch die bei den SHR beschriebene verstärkte Bildung und Freisetzung von Vasopressin kann zumindest zur Erklärung der abgeschwächten Fieberreaktion der Tiere nach Stimulation mit MALP-2 bzw. LPS herangezogen werden. Vasopressin (Synonym: Antidiuretisches Hormon, ADH) ist eine der am längsten bekannten antipyretisch wirksamen Substanzen (Roth, 2006). Hierbei spielen jedoch nicht die vasopressinergen Projektionen der

Hypothalamuskern Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis zur Neurohypophyse die entscheidende Rolle. Vielmehr sind die Projektionen kleinzelliger Neurone des Nucleus paraventricularis zur Septumregion des limbischen Systems für die antipyretische Wirkung des Vasopressin ausschlaggebend (Kasting & Wilkinson, 1989; Roth *et al.*, 2004; Roth, 2006). Es konnte jedoch experimentell nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der Vasopressinsystems in der Regel simultan die Freisetzung dieses Neuropeptids in die Blutbahn und in das limbische System steigert (Landgraf *et al.*, 1990; Roth & Zeisberger, 1992). Die gesteigerte Bildung von Vasopressin bei den SHR (Ichida & Kuriyama, 1998) sollte dem zufolge mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die zentralen Projektionen ins limbische System betreffen. Dieser Mechanismus kann zu einer Reduktion des Fiebers führen, ohne dass die peripheren inflammatorischen Signale vermindert sein müssen.

Es liegen somit eine Reihe von Möglichkeiten vor, um die in den hier durchgeführten Versuchen beobachteten Abschwächungen des Fiebers bei den SH-Ratten unabhängig von einem CD36-abhängigen Mechanismus zu erklären.

3. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mykoplasmale Lipopeptide wie MALP-2 und FSL-1 bei Abwesenheit des TLR-2 nicht in der Lage sind, die Induktion zentralnervös gesteuerter Krankheitssymptome auszulösen, der TLR2 also für die Erkennung der Lipopeptide und der anschließenden Signalweiterleitung essentiell ist und zu einer nachgeschalteten Zytokinproduktion von TNF und IL-6 führt.

Der CD36 hingegen scheint für die Erkennung der mykoplasmaalen Lipopeptide oder für die folgende Signalweiterleitung nicht essentiell zu sein. Durch die erniedrigte Reaktivität der SHR gegenüber MALP-2, FSL-1 sowie gegen das TLR4-abhängige LPS ist der CD36-Defekt als Ursache eher unwahrscheinlich, da CD36 weder auf die LPS-Erkennung durch den TLR4 noch auf die folgende Signalkaskade Einfluss nimmt. Die Ursachen, die zu den gewonnenen Ergebnissen führte, bleiben somit zumindest teilweise spekulativ. Die SHR weisen ein großes Spektrum genetischer Veränderungen auf, deren Auswirkungen sich auf unsere Versuche nur erahnen lassen. Zwei Dinge könnten die eingeschränkte Reaktivität der SHR gegenüber den hier verwendeten Pyrogenen aber erklären. Zum einen scheinen bei diesen Ratten erhöhte Werte an ACTH und Vasopressin vorzuliegen, die entweder selbst antipyretische Eigenschaften aufweisen (Vasopressin), oder aber wie das ACTH zur Bildung stark antipyretisch wirkender Substanzen wie den Glukokortikoiden führen. Des weiteren treten bei

diesen Ratten erhöhte IL-10-Plasmawerte auf. Da es sich bei IL-10 um ein antipyretisch wirkendes Zytokin handelt, könnte auch dieses Einfluss auf die Temperaturentwicklung nehmen.

Um die hier begonnenen Untersuchungen zu vervollständigen, sollten noch weitere Versuche durchgeführt werden. Zur Überprüfung unserer Resultate wäre der Einsatz von CD36-ko-Mäusen sinnvoll, um abschließend sicher zu klären, ob CD36 Einfluss auf die TLR2/6-vermittelte Immunantwort hat. Ebenfalls wären vergleichbare Untersuchungen mit TLR6-ko-Mäusen sinnvoll, um das genauere Zusammenspiel des Heterodimers aus TLR2/6, so wie die Gewichtung der einzelnen Rezeptoren bei der Induktion von zentral gesteuerten Krankheitssymptomen beurteilen zu können.

V. Zusammenfassung

Das Makrophagen-aktivierende Lipopeptid-2 (MALP-2) von *Mycoplasma fermentans* und das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1) von *Mycoplasma salivarium* scheinen durch die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) 2 und 6 die angeborene Immunantwort zu induzieren. CD36 gilt als zellulärer Sensor für diacylierte Lipopeptide wie MALP-2 und FSL-1 und könnte für die durch solche Lipopeptide ausgelösten Effekte in vivo erforderlich sein. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie die Ansprechbarkeit von TLR2-ko-Mäusen (TLR2-ko), ihrer Wildtyp-Mäuse (C57/BL-6) sowie die von CD36-defizienten spontan hypertensiven Ratten (SHR) und ihren genetischen Kontrollen, den Wistar Kyoto Ratten (WKY), auf die systemische Stimulation mit TLR2/6-Agonisten MALP-2 und FSL-1 sowie mit dem TLR4-Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) untersucht.

Hierzu wurde den verwendeten Mäusen und Ratten ein Radiotransmitter intraabdominal implantiert, der die Körpertemperatur und die motorische Aktivität aufzeichnete. Um weitere charakteristische Merkmale des „sickness behaviors“ überprüfen zu können, wurde bei den Ratten zusätzlich die Futter- und Wasseraufnahme gemessen, um die Entwicklung von Anorexie und Adipsie ermitteln zu können. Des Weiteren wurden bei den Ratten und Mäusen die im Blut zirkulierenden Tumor Nekrose Faktor (TNF)- und Interleukin-6 (IL-6)-Gehalte mit Hilfe von Bioassays ermittelt. Die inflammatorische Aktivierung des Gehirns wurde über die Quantifizierung der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) in fieber- und sickness behavior-relevanten Gehirnstrukturen überprüft.

Bei den TLR2-ko-Mäusen fiel die Fieberantwort sowie die Bildung der beiden Zytokine IL-6 und TNF nach intraperitonealer Stimulation mit MALP-2 und FSL-1 im Vergleich zu den Kontrolltieren komplett aus, wohingegen die Reaktivität der Ko-Mäuse nach intraperitonealer Injektion von LPS im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen unbeeinträchtigt blieb. Die CD36 defizienten SHR zeigten nach MALP-Stimulation eine Abschwächung der Fieberantwort und des sickness behaviors, diese Reduktion der Responsivität fiel jedoch nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den WKY noch stärker aus. Die zirkulierenden Zytokine sowie die Anzahl der STAT3-Signale in den relevanten Gehirnstrukturen waren allerdings bei SHR wie WKY nach Stimulation beider Pyrogene weitgehend identisch, was zeigt, dass die inflammatorische Aktivierung des Gehirns als Antwort auf die MALP-2-, FSL-1 und LPS-Stimulation durch die CD36-Defizienz nicht beeinträchtigt wird.

Diese Ergebnisse demonstrieren eindeutig, dass der TLR2 für die Manifestation der MALP-2- und FSL-1-induzierten, nicht aber für die LPS-induzierten inflammatorischen Antworten essentiell ist. Eine geringgradige Beteiligung des CD36-Rezeptors an der MALP-2-induzierten Krankheits- und Zytokinantwort ist nicht auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich, da die LPS-Antwort bei SHR ebenfalls verringert war. Die beobachtete Reduktion des MALP-2- und LPS-induzierten Fiebers rührt wahrscheinlich eher von weiteren endokrinen Abnormalitäten der SHR her, die bei diesen Tieren stärkere antipyretische Kapazitäten bewirken.

VI. Summary

Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) from *Mycoplasma fermentans* and fibroblast-stimulating Lipopeptid-1 from *Mycoplasma salivarium* seem to induce an innate immune response via activation of Toll-like receptors (TLRs) 2 and 6. CD36 is regarded as a cellular sensor of diacylated lipopeptides such as MALP-2 or FSL-1 and may be required for the array of MALP-2/FSL-1-induced effects *in vivo*. We therefore tested the responses of TLR2-knockout mice (TLR2-ko) and wildtype mice (C57/BL-6), and of CD36 deficient spontaneously hypertensive rats (SHR) and their genetic controls (Wistar Kyoto rats, WKY) to systemic stimulations with the TLR2/6 agonists MALP-2 and FSL-1 and the TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS).

TLR2-ko, C57/BL-6, SHR and WKY were intraabdominally implanted with radiotransmitters for recording of body temperature (fever) and motor activity. Food and water intake were also measured to determine a possible development of anorexia and adipsia as characteristic components of brain-controlled sickness responses. Circulating levels of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6) were measured by use of specific bioassays. Inflammatory activation of the brain was determined by quantification of a nuclear translocation of the transcription factor STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) in brain areas, relevant for the manifestation of fever and sickness behaviour.

Fever and formation of TNF and IL-6 induced by intraperitoneal injections of MALP-2 and FSL-1 were completely blunted in TLR2-ko mice, while LPS-induced responses were not impaired in these animals when compared to those of C57/BL-6 wildtype mice. In SHR lacking CD36 an attenuation of fever and sickness behaviour was observed in response to MALP-2, but even to a higher degree in response to LPS, when compared to WKY controls. Circulating cytokines and numbers of nuclear STAT3 signals in relevant areas of the brain were identical in SHR and WKY after stimulation with both pyrogens, indicating that the inflammatory activation of the brain in response to MALP-2 (and LPS) is not impaired by the lack of CD36.

These results demonstrate unequivocally that TLR2 is essential for the manifestation of MALP-2/FSL-1-induced (but not for LPS-induced) inflammatory responses. A moderate participation of CD36 in MALP-2-induced sickness- and cytokine-responses can not be ruled out, but is rather unlikely since LPS-induced inflammatory responses were also attenuated in SHR. The observed attenuations in MALP-2 and LPS-induced fever in SHR may rather be

caused by some of the endocrine abnormalities in these rats resulting in stronger endogenous antipyretic capacities.

VII. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AG	Antigen
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Area Postrema
AP-1	Activator Protein 1
APP	Akute- Phase Protein
APR	Akute- Phase Reaktion
BBB	Blut- Hirn- Schranke, Blood- Brain Barrier
BSF-2	B-Zell-stimulierender-Faktor-2
°C	Grad Celsius
C5a	Komplementfaktor
CD	Cluster of Differentiation
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-1/2/3	Zyklooxygenase-1/2/3
CRF	Corticotropin-releasing Factor
CSF	Colony stimulating Factor
CT-1	Cardiotropin-1
CVOs	Zirkumventrikuläre Organe
Δ	Differenz
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid
DD	Death Domain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EP-Rezeptor	Prostaglandinrezeptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOS	FOS- Protein, Transkriptions-faktor
FSL-1	Fibroblasten Stimulierendes Lipopeptid 1
GABA	gamma aminobutyric acid, gamma-Amino-n-buttersäure
gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glycosylphosphatidyl Inositol

HDL	High Density Lipoproteins
HGF	Hybridoma Growth Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPA- Achse	Hypothalamo-Hypophysen-Nebennierenrinden- Achse
HRP	Meerrettichperoxidase, Horseradish Peroxidase
Hz	Frequenz in Hertz
ia	intraarteriell
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
icv	intracerebroventrikulär
IFN β	Interferon β
IKK	Inhibitorischer Faktor κ B- Kinase
I κ B	Inhibitorischer Faktor κ B
IL-	Interleukin-
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IL-1Ra	IL-1 Rezeptorantagonist
IL-1RacP	akzessorisches IL-1R-Protein
im	intramuskulär
ip	intraperitoneal
IP-10	IFN-inducible Protein of 10 kDa
IRAK	Rezeptorassoziierte Kinase
IU	Internationale Einheiten
iv	intravenös
JAK	Janus Kinase
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
KO	knock-out
LAF	leucocyte activating factor
LDL	Low Density Lipoproteins
LIF	Leukemia Inhibiting Factor
LRR	leucin-rich repeat domain
LP	Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid

LTA	Lipoteichoic Acid
M	molar
MAL	MyD88 Adaptor Like
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid 2kDa
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MD2	Myeloid Differentiation Protein-2
MDHM	Mycoplasma fermentans- derived high- molecular weight material
MDP	Muramyldipeptid
ME	Eminentia mediana
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MIP	Makrophagen- Inflammatorisches Protein
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyl-Tetrazolium- bromid
MyD88	Adapterprotein des IL-1R, myeloid differentiation factor 88
n	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Kochsalz
n. d.	nicht detektierbar (unterhalb der Nachweisgrenze)
NF-κB	Nuclear Factor κB
NHS	Normal Horse Serum
NL	Neurohypophyse
NLR	NOD- like Receptors
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NTC	negativer Temperaturkoeffizient
NTS	Nucleus tractus solitarius
OSM	Oncostatin M
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehydlösung

PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
p. i.	post injektionem
PLA ₂	Phospholipase A ₂
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
POA	Area praeoptica des anterioren Hypothalamus
POMC	Proopiomelanocortin
PRR	Pattern Recognition Receptors
PVN	paraventriculärer Nucleus
sc	subkutan
SCO	Organum subcommisurale
sCVOs	sensorische CVOs
S.E.M.	Standard Error of the Mean
SFO	Subfornicalorgan
sIL-6R	löslicher IL-6- Rezeptor
SHP-2	Tyrosin-Phosphatase-2
SHR	spontan hypertensive Ratten
SOCS	Supressor of Cytokine Signaling
Solvent	Lösungsmittel, Cremophor
STAT	Signalübersetzer und Aktivator der Transkription, Signal Transducer and Activator of Transcription
sTNFR	löslicher TNF- Rezeptor
t	Zeit in Minuten
T _b	Körpertemperatur
TACE	TNF- converting Enzyme
TAK1	TGFβ- Activated Kinase
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TIM	TRAF- Interacting Motifs
TIR-Domain	Toll/IL-1-Domain
TIRAP/MAL	TIR-domain-containing adaptor protein/MyD88 adapter like
TLR	Toll- like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TNF-bp	TNF- Bindungsprotein
TRAF	TNF- Rezeptor- assoziierter Faktor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain containing adapter-inducing IFN-β

TRF β	Transforming Growth Factor β
TYK2	Tyrosinkinase 2
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
VMH	ventromedialer Nucleus des Hypothalamus
VMPO	Nucleus praeopticus ventromedialis
WKY-Ratten	Wistar-Kyoto-Ratten
ZNS	Zentralnervensystem

VIII. Literaturverzeichnis

- AARDEN, DEGROOT E.R., SCHAAP O.L. & P.M., L. (1987). Production of hybridoma growth factors by human monocytes. *Eur J Immunol* **17**.
- AGGARWAL, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756.
- AITMAN, T. J., GLAZIER, A. M., WALLACE, C. A., COOPER, L. D., NORSWORTHY, P. J., WAHID, F. N., AL-MAJALI, K. M., TREMBLING, P. M., MANN, C. J., SHOULDERS, C. C., GRAF, D., ST LEZIN, E., KURTZ, T. W., KREN, V., PRAVENEK, M., IBRAHIMI, A., ABUMRAD, N. A., STANTON, L. W. & SCOTT, J. (1999). Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* **21**, 76-83.
- AKIRA, S. (2006). TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 1-16.
- ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOV, R. & FLAVELL, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738.
- ANDERSSON, J., NAGY, S., BJORK, L., ABRAMS, J., HOLM, S. & ANDERSSON, U. (1992). Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev* **127**, 69-96.
- ANFORTH, H. R., BLUTHE, R. M., BRISTOW, A., HOPKINS, S., LENCZOWSKI, M. J., LUHESHI, G., LUNDKVIST, J., MICHAUD, B., MISTRY, Y., VAN DAM, A. M., ZHEN, C., DANTZER, R., POOLE, S., ROTHWELL, N. J., TILDERS, F. J. & WOLLMAN, E. E. (1998). Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1alpha and interleukin-1beta. *Eur Cytokine Netw* **9**, 279-288.
- ARANCIBIA, S. A., BELTRAN, C. J., AGUIRRE, I. M., SILVA, P., PERALTA, A. L., MALINARICH, F. & HERMOSO, M. A. (2007). Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* **40**, 97-112.
- AUBERT, A. (1999). Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neurosci Biobehav Rev* **23**, 1029-1036.

- AUTELITANO, D. J. & VAN DEN BUUSE, M. (1997). Concomitant up-regulation of proopiomelanocortin and dopamine D2-receptor gene expression in the pituitary intermediate lobe of the spontaneously hypertensive rat. *J Neuroendocrinol* **9**, 255-262.
- BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. (1991). Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems. *Life Sci* **48**, PL117-121.
- BANKS, W. A., KASTIN, A. J. & GUTIERREZ, E. G. (1993). Interleukin-1 alpha in blood has direct access to cortical brain cells. *Neurosci Lett* **163**, 41-44.
- BANKS, W. A., KASTIN, A. J. & GUTIERREZ, E. G. (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* **179**, 53-56.
- 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**, 988-996.
- BAUHOFFER, A., TISCHER, B., MIDDEKE, M., PLAUL, U., LORENZ, W. & TOROSSIAN, A. (2003). The genetic background of hypertensive, septic rats determines outcome improvement with antibiotic and G-CSF prophylaxis. *Shock* **20**, 326-331.
- BAZAN, J. F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* **11**, 350-354.
- BEESON. (1948). Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes. *J Clin Invest* **27**, 524-548.
- BEMELMANS, M. H., VAN TITS, L. J. & BUURMAN, W. A. (1996). Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* **16**, 1-11.
- BERKENBOSCH, F., VAN OERS, J., DEL REY, A., TILDERS, F. & BESEDOVSKY, H. (1987). Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* **238**, 524-526.
- BEUTLER, B., GREENWALD, D., HULMES, J. D., CHANG, M., PAN, Y. C., MATHISON, J., ULEVITCH, R. & CERAMI, A. (1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552-554.

- BHATNAGAR, S., MEANEY, M. J. & AMIR, S. (1993). The effects of prostaglandin E2 injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus on brown adipose tissue thermogenesis in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* **613**, 285-287.
- BLANCHARD, A. & MONTAGNIER, L. (1994). AIDS-associated mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* **48**, 687-712.
- BLATTEIS, C. M. (1976). Fever: exchange of shivering by nonshivering pyrogenesis in cold-acclimated guinea pigs. *J Appl Physiol* **40**, 29-34.
- BLATTEIS, C. M. (2006). Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther* **111**, 194-223.
- BLATTEIS, C. M. (2007). The onset of fever: new insights into its mechanism. *Prog Brain Res* **162**, 3-14.
- 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**, 519-526.
- 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**, 1255-1260.
- 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**, 895-901.
- BLONDIN, C., LE DUR, A., CHOLLEY, B., CAROFF, M. & HAEFFNER-CAVAILLON, N. (1997). Lipopolysaccharide complexed with soluble CD14 binds to normal human monocytes. *Eur J Immunol* **27**, 3303-3309.
- BLUTHE, R. M., MICHAUD, B., KELLEY, K. W. & DANTZER, R. (1996). Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* **7**, 2823-2827.
- BORSUTZKY S, F. V., EBENSEN T, TRIPICIANO A, RHABAQUI F, SCOGLIO A, LINK C, NAPPI F, MORR M, BUTTO S, CAFARO A, MUHLRADT PF, ENSOLI B, GUZMAN CA. (2003). Efficient mucosal delivery of the HIV-1 TAT protein using the synthetic lipopeptide MALP-2 as adjuvant. *Eur J Immunol*. **33**, 1548-1556.

- BRAUN, R. & WILLNOW, E. (1996). Die "Knockout"-Maus als Krankheitsmodell: Prinzipien und klinische Relevanz. *Dtsch Arztebl* **93**.
- BUWITT-BECKMANN, U., HEINE, H., WIESMULLER, K. H., JUNG, G., BROCK, R., AKIRA, S. & ULMER, A. J. (2005). Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol* **35**, 282-289.
- CARSWELL, E. A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N. & WILLIAMSON, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670.
- 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**, 171-180.
- 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.
- 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**, 311-316.
- CHIRGWIN, K. D., CUMMINGS, M. C., DEMEO, L. R., MURPHY, M. & MCCORMACK, W. M. (1993). Identification of mycoplasmas in urine from persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 1**, S264-266.
- COBURN, C. T., HAJRI, T., IBRAHIMI, A. & ABUMRAD, N. A. (2001). Role of CD36 in membrane transport and utilization of long-chain fatty acids by different tissues. *J Mol Neurosci* **16**, 117-121; discussion 151-117.
- COCEANI, 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**, 165-171.
- COLLINS, M. G., HUNTER, W. S. & BLATTEIS, C. M. (1987). Factors producing elevated core temperature in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* **63**, 740-745.
- CONTI, B., TABAREAN, I., ANDREI, C. & BARTFAI, T. (2004). Cytokines and fever. *Front Biosci* **9**, 1433-1449.

- COONS. (1958). Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* **1**, 399-422.
- COOPER. (1995). Fever and antipyresis-the role of the nervous system. Cambridge (Great Britain) : University Press.
- COOPER, A. L., BROUWER, S., TURNBULL, A. V., LUHESHI, G. N., HOPKINS, S. J., KUNKEL, S. L. & ROTHWELL, N. J. (1994). Tumor necrosis factor-alpha and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am J Physiol* **267**, R1431-1436.
- CULLINAN, E. B., KWEE, L., NUNES, P., SHUSTER, D. J., JU, G., MCINTYRE, K. W., CHIZZONITE, R. A. & LABOW, M. A. (1998). IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J Immunol* **161**, 5614-5620.
- CUNNINGHAM, E. T., JR., WADA, E., CARTER, D. B., TRACEY, D. E., BATTEY, J. F. & DE SOUZA, E. B. (1992). In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci* **12**, 1101-1114.
- DANTZER, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* **15**, 7-24.
- 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**, 46-56.
- DAVIDSON, J., ABUL, H. T., MILTON, A. S. & ROTONDO, D. (2001). Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain. *Pflugers Arch* **442**, 526-533.
- DEITERS, U., BARSIG, J., TAWIL, B. & MUHLRADT, P. F. (2004). The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Exp Dermatol* **13**, 731-739.
- DESSING, M. C., SCHOUTEN, M., DRAING, C., LEVI, M., AULOCK, S. V. & POLL, T. V. (2008). Role Played by Toll-Like Receptors 2 and 4 in Lipoteichoic Acid-Induced Lung Inflammation and Coagulation. *J Infect Dis* **197**, 245-252.
- DINARELLO, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147.

- DINARELLO, C. A. (2004). Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* **10**, 201-222.
- DINARELLO, C. A., CANNON, J. G., WOLFF, S. M., BERNHEIM, H. A., BEUTLER, B., CERAMI, A., FIGARI, I. S., PALLADINO, M. A., JR. & O'CONNOR, J. V. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* **163**, 1433-1450.
- DINARELLO, C. A. & SAVAGE, N. (1989). Interleukin-1 and its receptor. *Crit Rev Immunol* **9**, 1-20.
- DRENNAN, M. B., NICOLLE, D., QUESNIAUX, V. J., JACOBS, M., ALLIE, N., MPAGI, J., FREMOND, C., WAGNER, H., KIRSCHNING, C. & RYFFEL, B. (2004). Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. *Am J Pathol* **164**, 49-57.
- ENGBLOM, D., SAHA, S., ENGSTROM, L., WESTMAN, M., AUDOLY, L. P., JAKOBSSON, P. J. & BLOMQVIST, A. (2003). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci* **6**, 1137-1138.
- ESEN, N. & KIELIAN, T. (2005). Recognition of Staphylococcus aureus-derived peptidoglycan (PGN) but not intact bacteria is mediated by CD14 in microglia. *J Neuroimmunol* **170**, 93-104.
- 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**, 99-105.
- FISCHER, E., VAN ZEE, K. J., MARANO, M. A., ROCK, C. S., KENNEY, J. S., POUTSIKA, D. D., DINARELLO, C. A., LOWRY, S. F. & MOLDAWER, L. L. (1992). Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood* **79**, 2196-2200.
- FITZGERALD, K. A., ROWE, D. C. & GOLENBOCK, D. T. (2004). Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect* **6**, 1361-1367.
- FOEY, A. D., PARRY, S. L., WILLIAMS, L. M., FELDMANN, M., FOXWELL, B. M. & BRENNAN, F. M. (1998). Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* **160**, 920-928.

- FORTIER, M. E., KENT, S., ASHDOWN, H., POOLE, S., BOKSA, P. & LUHESHI, G. N. (2004). The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R759-766.
- 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**, 689-694.
- FRY, M. & FERGUSON, A. V. (2007). The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiol Behav* **91**, 413-423.
- GANTNER, B. N., SIMMONS, R. M., CANAVERA, S. J., AKIRA, S. & UNDERHILL, D. M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**, 1107.
- GAYKEMA, R. P., DIJKSTRA, I. & TILDERS, F. J. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* **136**, 4717-4720.
- GEARING, A.J.H., CARTWRIGHT, J. E. & Wadhwa, M. (1994). Biological and immunological assay for cytokines. pp.507-524. In A.W. Thomson [ed.], *The Cytokine Handbook*, 2nd ed. Academic Press Ltd., London
- GLAZIER, A. M., SCOTT, J. & AITMAN, T. J. (2002). Molecular basis of the Cd36 chromosomal deletion underlying SHR defects in insulin action and fatty acid metabolism. *Mamm Genome* **13**, 108-113.
- 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**, R749-754.
- GOLDBACH, J. M., ROTH, J. & ZEISBERGER, E. (1997). Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. *Am J Physiol* **272**, R675-681.
- GOURINE, A. V., RUDOLPH, K., TESFAIGZI, J. & KLUGER, M. J. (1998). Role of hypothalamic interleukin-1beta in fever induced by cecal ligation and puncture in rats. *Am J Physiol* **275**, R754-761.

- GREENWALT, D. E., WATT, K. W., HASLER, T., HOWARD, R. J. & PATEL, S. (1990). Structural, functional, and antigenic differences between bovine heart endothelial CD36 and human platelet CD36. *J Biol Chem* **265**, 16296-16299.
- GRUARIN, P., THORNE, R. F., DORAHY, D. J., BURNS, G. F., SITIA, R. & ALESSIO, M. (2000). CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 446-454.
- GUTIERREZ, E. G., BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. (1993). Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol* **47**, 169-176.
- GUTIERREZ, E. G., BANKS, W. A. & KASTIN, A. J. (1994). Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* **55**, 153-160.
- HAJISHENGALLIS, G., MARTIN, M., SCHIFFERLE, R. E. & GENCO, R. J. (2002). Counteracting interactions between lipopolysaccharide molecules with differential activation of toll-like receptors. *Infect Immun* **70**, 6658-6664.
- HAJRI, T., IBRAHIMI, A., COBURN, C. T., KNAPP, F. F., JR., KURTZ, T., PRAVENEK, M. & ABUMRAD, N. A. (2001). Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem* **276**, 23661-23666.
- HANSEN, M. K. & KRUEGER, J. M. (1997). Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep- and fever-promoting effects of interleukin-1beta. *Am J Physiol* **273**, R1246-1253.
- HARRE, E. M., ROTH, J., PEHL, U., KUETH, M., GERSTBERGER, R. & HUBSCHLE, 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**, 2657-2666.
- HASHIMOTO, K., MAKINO, S., HIRASAWA, R., TAKAO, T., SUGAWARA, M., MURAKAMI, K., ONO, K. & OTA, Z. (1989). Abnormalities in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats during development of hypertension. *Endocrinology* **125**, 1161-1167.

- HAYASHI, S., WICKLER, S. J., GRAY, S. & HORWITZ, B. A. (1988). Nonshivering thermogenesis and brown fat in spontaneously hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **188**, 435-439.
- HELLMAN, J., LOISELLE, P. M., TEHAN, M. M., ALLAIRE, J. E., BOYLE, L. A., KURNICK, J. T., ANDREWS, D. M., SIK KIM, K. & WARREN, H. S. (2000). Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by *Escherichia coli* bacteria into serum. *Infect Immun* **68**, 2566-2572.
- HIRANO, T., TAGA, T., NAKANO, N., YASUKAWA, K., KASHIWAMURA, S., SHIMIZU, K., NAKAJIMA, K., PYUN, K. H. & KISHIMOTO, T. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5490-5494.
- HOEBE, K., GEORGEL, P., RUTSCHMANN, S., DU, X., MUDD, S., CROZAT, K., SOVATH, S., SHAMEL, L., HARTUNG, T., ZHRINGER, U. & BEUTLER, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523-527.
- HOPKINS, P. A. & SRISKANDAN, S. (2005). Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clinical and Experimental Immunology* **140**, 395-407.
- HORI, T., SHIBATA, M., NAKASHIMA, T., YAMASAKI, M., ASAMI, A., ASAMI, T. & KOGA, H. (1988). Effects of interleukin-1 and arachidonate on the preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Brain Res Bull* **20**, 75-82.
- HORNEF, M. W., NORMARK, B. H. & VANDEWALLE, A. E. A. (2003). Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* **198**, 1225-1235.
- HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**, 3749-3752.
- HOUSIER, M., RAOUL, W., LAVALETTE, S., KELLER, N., GUILLONNEAU, X., BARAGATTI, B., JONET, L., JEANNY, J. C., BEHAR-COHEN, F., COCEANI, F., SCHERMAN, D., LACHAPPELLE, P., ONG, H., CHEMTOB, S. & SENNLAUB, F. (2008). CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med* **5**, e39.

- HSU, S. M., RAINE, L. & FANGER, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**, 577-580.
- HUBSCHLE, T., MATHAI, M. L., MCKINLEY, M. J. & OLDFIELD, B. J. (2001a). Multisynaptic neuronal pathways from the submandibular and sublingual glands to the lamina terminalis in the rat: a model for the role of the lamina terminalis in the control of osmo- and thermoregulatory behavior. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 558-569.
- HUBSCHLE, T., MUTZE, J., MUHLRADT, P. F., KORTE, S., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2006). Pyrexia, anorexia, adipsia, 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**, R180-187.
- HUBSCHLE, T., THOM, E., WATSON, A., ROTH, J., KLAUS, S. & MEYERHOF, W. (2001b). Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci* **21**, 2413-2424.
- ICHIDA, T. & KURIYAMA, K. (1998). Age-related development of gamma-aminobutyric acid (GABA)_B receptor functions in various brain regions of spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res* **23**, 89-95.
- IEMITSU, M., MIYAUCHI, T., MAEDA, S., SAKAI, S., FUJII, N., MIYAZAKI, H., KAKINUMA, Y., MATSUDA, M. & YAMAGUCHI, I. (2003). Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* **26**, 829-837.
- INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, C. F. T. P. (2001). Glossary of terms for thermal physiology. *Jpn J Physiol* **51**, 245-280.
- JANEWAY, C. A., JR. & MEDZHITOV, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216.
- JANSKY, L., VYBIRAL, S., POSPISILOVA, D., ROTH, J., DORNAND, J., ZEISBERGER, E. & KAMINKOVA, J. (1995). Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinology* **62**, 55-61.
- JOHNSON, R. W. (2002). The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet Immunol Immunopathol* **87**, 443-450.

- JOHNSON, R. W., GHEUSI, G., SEGRETI, S., DANTZER, R. & KELLEY, K. W. (1997). C3H/HeJ mice are refractory to lipopolysaccharide in the brain. *Brain Res* **752**, 219-226.
- KASTING, N. W. & WILKINSON, M. F. (1989). Antipyretic doses of centrally administered vasopressin reach physiologically meaningful concentrations in the brain of the rat as evaluated by microdialysis. *Neurosci Lett* **105**, 131-136.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. (2005). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* **7**, 12-19.
- KENYON, C. J., PANARELLI, M., HOLLOWAY, C. D., DUNLOP, D., MORTON, J. J., CONNELL, J. M. & FRASER, R. (1993). The role of glucocorticoid activity in the inheritance of hypertension: studies in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* **45**, 7-11.
- KIELIAN, T. (2006). Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* **83**, 711-730.
- KIELIAN, T., ESEN, N. & BEARDEN, E. D. (2005a). Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia. *Glia* **49**, 567-576.
- KIELIAN, T., HANEY, A., MAYES, P. M., GARG, S. & ESEN, N. (2005b). Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess. *Infect Immun* **73**, 7428-7435.
- KIELIAN, T., MAYES, P. & KIELIAN, M. (2002). Characterization of microglial responses to *Staphylococcus aureus*: effects on cytokine, costimulatory molecule, and Toll-like receptor expression. *J Neuroimmunol* **130**, 86-99.
- KIRBY, R. F., SOKOLOFF, G., PERDOMO, E. & BLUMBERG, M. S. (1999). Thermoregulatory and cardiac responses of infant spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats to cold exposure. *Hypertension* **33**, 1465-1469.
- KISHIMOTO, T., HIBI, M., MURAKAMI, M., NARAZAKI, M., SAITO, M. & TAGA, T. (1992). The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. *Ciba Found Symp* **167**, 5-16; discussion 16-23.
- 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**, R480-486.
- KLUGER, M. J. (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* **71**, 93-127.
- KNORR, C., HUBSCHLE, T., MURGOTT, J., MUHLRADT, P., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2008). Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Res* **1205**, 36-46.
- KOBE, B. & DEISENHOFER, J. (1995). A structural basis of the interactions between leucin-rich repeats and protein ligands. *Nature* **374**, 183-186.
- KOEDEL, U., ANGELE, B., RUPPRECHT, T., WAGNER, H., ROGGENKAMP, A., PFISTER, H. W. & KIRSCHNING, C. J. (2003). Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* **170**, 438-444.
- KOTANI, S., TAKADA, H., TSUJIMOTO, M., OGAWA, T., TAKAHASHI, I., IKEDA, T., OTSUKA, K., SHIMAUCHI, H., KASAI, N., MASHIMO, J. & ET AL. (1985). Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* re-mutant. *Infect Immun* **49**, 225-237.
- KOZAK, W., CONN, C. A., KLIR, J. J., WONG, G. H. & KLUGER, M. J. (1995a). TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice. *Am J Physiol* **269**, R23-29.
- KOZAK, W., KLUGER, M. J., SOSZYNSKI, D., CONN, C. A., RUDOLPH, K., LEON, L. R. & ZHENG, H. (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., ZHENG, H., CONN, C. A., SOSZYNSKI, D., VAN DER PLOEG, L. H. & KLUGER, M. J. (1995b). Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol* **269**, R969-977.
- LABOW, M., SHUSTER, D., ZETTERSTROM, M., NUNES, P., TERRY, R., CULLINAN, E. B., BARTFAI, T., SOLORZANO, C., MOLDAWER, L. L., CHIZZONITE, R. & MCINTYRE, K. W. (1997). Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* **159**, 2452-2461.

- LANDGRAF, R., MALKINSON, T., HORN, T., VEALE, W. L., LEDERIS, K. & PITTMAN, Q. J. (1990). Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am J Physiol* **258**, R155-159.
- LANDSDROP. (1986). A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol* **132**, 105-113.
- LAYE, S., GHEUSI, G., CREMONA, S., COMBE, C., KELLEY, K., DANTZER, R. & PARNET, P. (2000). Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R93-98.
- LAZARUS, M., YOSHIDA, K., COPPARI, R., BASS, C. E., MOCHIZUKI, T., LOWELL, B. B. & SAPER, C. B. (2007). EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci* **10**, 1131-1133.
- LEMAITRE, B. (2004). The road to Toll. *Nat Rev Immunol* **4**, 521-527.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.-M. & HOFFMANN, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- LEMAITRE, M., HENIN, Y., DESTOUESSE, F., FERRIEUX, C., MONTAGNIER, L. & BLANCHARD, A. (1992). Role of mycoplasma infection in the cytopathic effect induced by human immunodeficiency virus type 1 in infected cell lines. *Infect Immun* **60**, 742-748.
- LEMAY, L. G., VANDER, A. J. & KLUGER, M. J. (1990). Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol* **258**, R798-803.
- 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**, 163-173.
- 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**, 86-94.
- LUBICK, K. & JUTILA, M. A. (2006). LTA recognition by bovine gammadelta T cells involves CD36. *J Leukoc Biol* **79**, 1268-1270.

- LUHESHI, G., 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**, E91-95.
- LUHESHI, G. & ROTHWELL, N. (1996). Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol* **109**, 301-307.
- LUHESHI, G. N., BLUTHE, R. M., RUSHFORTH, D., MULCAHY, N., KONSMAN, J. P., GOLDBACH, M. & DANTZER, R. (2000). Vagotomy attenuates the behavioural but not the pyrogenic effects of interleukin-1 in rats. *Auton Neurosci* **85**, 127-132.
- MACKOWIAK, P. A., BARTLETT, J. G., BORDEN, E. C., GOLDBLUM, S. E., HASDAY, J. D., MUNFORD, R. S., NASRAWAY, S. A., STOLLEY, P. D. & WOODWARD, T. E. (1997). Concepts of fever: recent advances and lingering dogma. *Clin Infect Dis* **25**, 119-138.
- 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**, 73-81.
- MANTOVANI, A., LOCATI, M., VECCHI, A., SOZZANI, S. & ALLAVENA, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* **22**, 328-336.
- MARDH, P. A. & WESTROM, L. (1970). Antibodies to Mycoplasma hominis in patients with genital infections and in healthy controls. *Br J Vener Dis* **46**, 390-397.
- MCKINLEY MJ, M. R., MENDELSON FAO, ALLEN AM, CHAI SY, OLDFIELD BJ. (1990). Circumventricular organs: Neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Front Neuroendocrinology* **11**, 91-127.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A., JR. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397.
- MERCIER, F., KITASAKO, J. T. & HATTON, G. I. (2003). Fractones and other basal laminae in the hypothalamus. *J Comp Neurol* **455**, 324-340.

- 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**, R857-861.
- MILLS, E. M., RUSYNIAK, D. E. & SPRAGUE, J. E. (2004). The role of the sympathetic nervous system and uncoupling proteins in the thermogenesis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Mol Med* **82**, 787-799.
- 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**, 325-336.
- MORLEY, R. M., CONN, C. A., KLUGER, M. J. & VANDER, A. J. (1990). Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* **258**, R1064-1069.
- MORR, M., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., SIMON, M. M. & MUHLRADT, P. F. (2002). Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur J Immunol* **32**, 3337-3347
- MUHLRADT, P. F., KIESS, M., MEYER, H., SUSSMUTH, R. & JUNG, G. (1997). Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* **185**, 1951-1958.
- MUHLRADT, P. F. & SCHADE, U. (1991). MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect Immun* **59**, 3969-3974.
- MUIR, A., SOONG, G. & SOKOL, S. E. A. (2004). Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **30**, 777-783.
- 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**, 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**, 3456-3468.
- NAKAMURA, J., SHIBATA, K., HASEBE, A., INTO, T., WATANABE, T. & OHATA, N. (2002). Signaling pathways induced by lipoproteins derived from *Mycoplasma salivarium* and a synthetic lipopeptide (FSL-1) in normal human gingival fibroblasts. *Microbiol Immunol* **46**, 151-158.
- NAKAMURA, K., KANEKO, T., YAMASHITA, Y., HASEGAWA, H., KATOH, H. & NEGISHI, M. (2000). Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *J Comp Neurol* **421**, 543-569.
- NAKAMURA, K., MATSUMURA, K., HUBSCHLE, T., NAKAMURA, Y., HIOKI, H., FUJIYAMA, F., BOLDOGKOI, Z., KONIG, M., THIEL, H. J., GERSTBERGER, R., KOBAYASHI, S. & KANEKO, T. (2004). Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J Neurosci* **24**, 5370-5380.
- NILSEN, N. J., DEININGER, S., NONSTAD, U., SKJELDAL, F., HUSEBYE, H., RODIONOV, D., VON AULOCK, S., HARTUNG, T., LIEN, E., BAKKE, O. & ESPEVIK, T. (2008). Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol.*
- OKA, T., OKA, K., KOBAYASHI, T., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., USHIKUBI, F., NARUMIYA, S. & SAPER, C. B. (2003a). Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol* **551**, 945-954.
- OKA, T., OKA, K. & SAPER, C. B. (2003b). Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain Res* **968**, 256-262.
- OKA, T., OKA, K., SCAMMELL, T. E., LEE, C., KELLY, J. F., NANTEL, F., ELMQUIST, J. K. & SAPER, C. B. (2000). Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol* **428**, 20-32.
- OKAMOTO, K. & AOKI, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* **27**, 282-293.
- OKUSAWA, T., FUJITA, M., NAKAMURA, J., INTO, T., YASUDA, M., YOSHIMURA, A., HARA, Y., HASEBE, A., GOLENBOCK, D. T., MORITA, M., KUROKI, Y., OGAWA, T. & SHIBATA, K. (2004). Relationship between structures and

- biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* **72**, 1657-1665.
- OLDFIELD, B. J. & MCKINLEY, M. J. (1995). *Circumventricular Organs*. Academic Press.
- PAUSOVA, Z., KUNES, J., KREN, V., KRENOVA, D., PRAVENEC, M., TREMBLAY, J. & HAMET, P. (1999). Contribution of the TNF alpha gene region of rat chromosome 20 to the body temperature response to endotoxin. *Transplant Proc* **31**, 1622-1623.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. & BEUTLER, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- POUPART, P., VANDENABEELE, P., CAYPHAS, S., VAN SNICK, J., HAEGEMAN, G., KRUYSS, V., FIERS, W. & CONTENT, J. (1987). B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF). *Embo J* **6**, 1219-1224.
- PRAVENEC, M. & KURTZ, T. W. (2002). Genetics of Cd36 and the hypertension metabolic syndrome. *Semin Nephrol* **22**, 148-153.
- PRAVENEC, M., LANDA, V., ZIDEK, V., MUSILOVA, A., KAZDOVA, L., QI, N., WANG, J., ST LEZIN, E. & KURTZ, T. W. (2003). Transgenic expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances but has no effect on hypertension. *Physiol Res* **52**, 681-688.
- PRAVENEC, M., LANDA, V., ZIDEK, V., MUSILOVA, A., KREN, V., KAZDOVA, L., AITMAN, T. J., GLAZIER, A. M., IBRAHIMI, A., ABUMRAD, N. A., QI, N., WANG, J. M., ST LEZIN, E. M. & KURTZ, T. W. (2001). Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* **27**, 156-158.
- PRAVENEC, M., ZIDEK, V., LANDA, V., KOSTKA, V., MUSILOVA, A., KAZDOVA, L., FUCIKOVA, A., KRENOVA, D., BILA, V. & KREN, V. (2000). Genetic analysis of cardiovascular risk factor clustering in spontaneous hypertension. *Folia Biol (Praha)* **46**, 233-240.
- PRAVENEC, M., ZIDEK, V., SIMAKOVA, M., KREN, V., KRENOVA, D., HORKY, K., JACHYMOVA, M., MIKOVA, B., KAZDOVA, L., AITMAN, T. J., CHURCHILL,

- P. C., WEBB, R. C., HINGARH, N. H., YANG, Y., WANG, J. M., LEZIN, E. M. & KURTZ, T. W. (1999). Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *J Clin Invest* **103**, 1651-1657.
- PRICE, J. M. & WILMOTH, F. R. (1990). Elevated body temperature and increased blood vessel sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* **258**, H946-953.
- QUENTMEIER, H., SCHMITT, E., KIRCHHOFF, H., GROTE, W. & MUHLRADT, P. F. (1990). Mycoplasma fermentans-derived high-molecular-weight material induces interleukin-6 release in cultures of murine macrophages and human monocytes. *Infect Immun* **58**, 1273-1280.
- QUESNIAUX, V., FREMOND, C., JACOBS, M., PARIDA, S., NICOLLE, D., YEREMEEV, V., BIHL, F., ERARD, F., BOTHA, T., DRENNAN, M., SOLER, M. N., LE BERT, M., SCHNYDER, B. & RYFFEL, B. (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* **6**, 946-959.
- RAETZ, C. R. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* **59**, 129-170.
- RANELS, H. J. & GRIFFIN, J. D. (2003). The effects of prostaglandin E2 on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Res* **964**, 42-50.
- RE, F., SIRONI, M., MUZIO, M., MATTEUCCI, C., INTRONA, M., ORLANDO, S., PENTON-ROL, G., DOWER, S. K., SIMS, J. E., COLOTTA, F. & MANTOVANI, A. (1996). Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function. *J Exp Med* **183**, 1841-1850.
- REILING, N., HOLSCHER, C., FEHRENBACH, A., KROGER, S., KIRSCHNING, C. J., GOYERT, S. & EHLERS, S. (2002). Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* **169**, 3480-3484.
- REJA, V., GOODCHILD, A. K., PHILLIPS, J. K. & PILOWSKY, P. M. (2006). Upregulation of angiotensin AT1 receptor and intracellular kinase gene expression in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**, 690-695.

- REJA, V., GOODCHILD, A. K. & PILOWSKY, P. M. (2002). Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR. *Hypertension* **40**, 342-347.
- RHARBAOUI F, D. B., BORSUTZKY S, WINCKLER U, MORR M, ENSOLI B, MUHLRADT PF, GUZMAN CA. (2002). The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *Eur J Immunol.* **32**, 2857-2865.
- RIETSCHEL, E. T., KIRIKAE, T., SCHADE, F. U., MAMAT, U., SCHMIDT, G., LOPPNOW, H., ULMER, A. J., ZHRINGER, U., SEYDEL, U., DI PADOVA, F. & ET AL. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* **8**, 217-225.
- RIVEST, S., LACROIX, S., VALLIERES, L., NADEAU, S., ZHANG, J. & LAFLAMME, N. (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* **223**, 22-38.
- ROBERTS, I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**, 285-315.
- ROMANOVSKY, A. A., ALMEIDA, M. C., ARONOFF, D. M., IVANOV, A. I., KONSMAN, J. P., STEINER, A. A. & TUREK, V. F. (2005). Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci* **10**, 2193-2216.
- ROMANOVSKY, A. A., SIMONS, C. T., SZEKELY, M. & KULCHITSKY, V. A. (1997). The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *Am J Physiol* **273**, R407-413.
- ROSS, G., HUBSCHLE, T., PEHL, U., BRAUN, H. A., VOIGT, K., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2003). Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* **94**, 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**, 305-313.
- ROTH, J. (2006). Endogenous antipyretics. *Clin Chim Acta* **371**, 13-24.

- 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**, R653-658.
- 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**, 301-314.
- ROTH, J., GOLDBACH, J. M., STORR, B. & ZEISBERGER, E. (1997). Studies on the role of tumor necrosis factor alpha in the responses to bacterial pyrogenic stimuli. *Ann N Y Acad Sci* **813**, 255-263.
- ROTH, J., HUBSCHLE, 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**, 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., STORR, B., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (1998b). Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1beta-induced fever in rats. *Life Sci* **62**, PL 345-350.
- ROTH, J. & ZEISBERGER, E. (1992). Evidence for antipyretic vasopressinergic pathways and their modulation by noradrenergic afferents. *Physiol Res* **41**, 49-55.
- ROTH, J., ZEISBERGER, E., VYBIRAL, S. & JANSKY, L. (2004). Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. *Front Biosci* **9**, 816-826.
- ROTHWELL, N. J. (1991). Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 430-436.
- RUTER, M. & WENTHOLT, H. M. (1953). Isolation of a pleuropneumonia-like organism (G-strain) in a case of fusospirillary vulvovaginitis. *Acta Derm Venereol* **33**, 123-129.
- RUMMEL, C., HUBSCHLE, T., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2004). Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *J Physiol* **557**, 671-687.

- 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**, R1316-1326.
- RUSCHMEYER, D., THUDE, H. & MUHLRADT, P. F. (1993). MDHM, a macrophage-activating product of *Mycoplasma fermentans*, stimulates murine macrophages to synthesize nitric oxide and become tumoricidal. *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**, 223-229.
- SAIKI, Y., WATANABE, T., TAN, N., MATSUZAKI, M. & NAKAMURA, S. (1997). Role of central ANG II receptors in stress-induced cardiovascular and hyperthermic responses in rats. *Am J Physiol* **272**, R26-33.
- SAPOLSKY, R., RIVIER, C., YAMAMOTO, G., PLOTSKY, P. & VALE, W. (1987). Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* **238**, 522-524.
- SARRIAS, M. R., GRONLUND, J., PADILLA, O., MADSEN, J., HOLMSKOV, U. & LOZANO, F. (2004). The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* **24**, 1-37.
- 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**, 6246-6254.
- SCAMMELL, T. E., GRIFFIN, J. D., ELMQUIST, J. K. & SAPER, C. B. (1998). Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. *Am J Physiol* **274**, R783-789.
- SCHAEVERBEKE, T., GILROY, C. B., BEBEAR, C., DEHAIS, J. & TAYLOR-ROBINSON, D. (1996). *Mycoplasma fermentans*, but not *M. penetrans*, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. *J Clin Pathol* **49**, 824-828.
- SCHMIDT, J., WELSCH, T., JAGER, D., MUHLRADT, P. F., BUCHLER, M. W. & MARTEN, A. (2007). Intratumoural injection of the toll-like receptor-2/6 agonist 'macrophage-activating lipopeptide-2' in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Br J Cancer* **97**, 598-604.
- SCHNARE, M., ROLLINGHOFF, M. & QURESHI, S. (2006). Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. *Int Arch Allergy Immunol* **139**, 75-85.

- SCHNEIDER, C., SCHMIDT, T., ZISKE, C., TIEMANN, K., LEE, K. M., UHLINSKY, V., BEHRENS, P., SAUERBRUCH, T., SCHMIDT-WOLF, I. G., MUHLRADT, P. F., SCHMIDT, J. & MARTEN, A. (2004). Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *GUT* **53**, 355-361.
- SCHWANDNER, R., DZIARSKI, R., WESCHE, H., ROTHE, M. & KIRSCHNING, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**, 17406-17409.
- SEHIC, E. & BLATTEIS, C. M. (1996). Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* **726**, 160-166.
- SHIBATA, K., HASEBE, A., INTO, T., YAMADA, M. & WATANABE, T. (2000). The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J Immunol* **165**, 6538-6544.
- SHIMAZU, R., AKASHI, S., OGATA, H., NAGAI, Y., FUKUDOME, K., MIYAKE, K. & KIMOTO, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**, 1777-1782.
- SHINGU, K., KRUSCHINSKI, C., LUHRMANN, A., GROTE, K., TSCHERNIG, T., VON HORSTEN, S. & PABST, R. (2003). Intratracheal macrophage-activating lipopeptide-2 reduces metastasis in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 316-321.
- SIMS, J. E., GIRI, J. G. & DOWER, S. K. (1994). The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol* **72**, 9-14.
- SKREDE, K. K., ROSHOL, H., AERO, C. E. & WIIK, P. (1996). Peritoneal leucocytes from spontaneously hypertensive rats have reduced chemiluminescence response and lowered sensitivity to dexamethasone in vivo. *Acta Physiol Scand* **158**, 169-179.
- SOLORZANO, C. C., KAIBARA, A., HESS, P. J., EDWARDS, P. D., KSONTINI, R., ABOUHAMZE, A., MCDANIEL, S., FRAZIER, J., TRUJILLO, D., KIEFT, G., SEELY, J., KOHNO, T., COSENZA, M. E., CLARE-SALZLER, M., MACKAY, S. L., MARTIN, S. W., MOLDAWER, L. L. & EDWARDS, C. K., 3RD. (1998). Pharmacokinetics, immunogenicity, and efficacy of dimeric TNFR binding proteins in healthy and bacteremic baboon. *J Appl Physiol* **84**, 1119-1130.

- SPRAGUE, J. E., BANKS, M. L., COOK, V. J. & MILLS, E. M. (2003). Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and sympathetic nervous system involvement in hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 159-166.
- 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.
- STROBER, W., MURRAY, P. J., KITANI, A. & WATANABE, T. (2006). Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* **6**, 9-20.
- STROMBERG, H., SVENSSON, S. P. & HERMANSON, O. (2000). Distribution of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 in the rat central nervous system and dorsal root ganglia. *Brain Res* **853**, 105-114.
- SU, J. Z., FUKUDA, N., JIN, X. Q., LAI, Y. M., SUZUKI, R., TAHIRA, Y., TAKAGI, H., IKEDA, Y., KANMATSUSE, K. & MIYAZAKI, H. (2002). Effect of AT2 receptor on expression of AT1 and TGF-beta receptors in VSMCs from SHR. *Hypertension* **40**, 853-858.
- SUGIMOTO, Y., SHIGEMOTO, R., NAMBA, T., NEGISHI, M., MIZUNO, N., NARUMIYA, S. & ICHIKAWA, A. (1994). Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *neuroscience* **62**, 919-928.
- SZELENYI, Z. & SZEKELY, M. (2004). Sickness behavior in fever and hypothermia. *Front Biosci* **9**, 2447-2456.
- TAGA, T. (1992). [The interleukin-6 signal transducer, gp130, functioning in immune, hematopoietic, and neural systems]. *Nippon Rinsho* **50**, 1802-1810.
- TAGA, T. (1997). The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann Med* **29**, 63-72.
- TAGA, T., HIBI, M., HIRATA, Y., YAMASAKI, K., YASUKAWA, K., MATSUDA, T., HIRANO, T. & KISHIMOTO, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**, 573-581.

- TAGA, T. & KISHIMOTO, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* **15**, 797-819.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2003). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* **16**, 3-9.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14.
- TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376.
- TAKEUCHI O, HORIUCHI, T., HOSHINO, K., TAKEDA, K., DONG, Z., MODLIN, R. L. & AKIRA, S. (2002). Role of TLR1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKEDA, K., OGAWA, T. & AKIRA, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451.
- TAKEUCHI, O., KAWAI, T., MÜHLRADT, P. F., MORR, M., RADOLF, J. D., ZYCHLINSKY, A., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology* **13**, 933-940.
- TAYLOR-ROBINSON, D. & SCHAEVERBEKE, T. (1996). Mycoplasmas in rheumatoid arthritis and other human arthritides. *J Clin Pathol* **49**, 781-782.
- TOLLNER, 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**, 925-932.
- TRIAANTAFILOU, M., GAMPER, F. G., HASTON, R. M., MOURATIS, M. A., MORATH, S., HARTUNG, T. & TRIANTAFILOU, K. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* **281**, 31002-31011.
- TRIAANTAFILOU, M., MIYAKE, K., GOLENBOCK, D. T. & TRIANTAFILOU, K. (2002). Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in

- lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* **115**, 2603-2611.
- UEMATSU, S. & AKIRA, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* **84**, 712-725.
- UENO, Y., TAKANO, N., KANEGANE, H., YOKOI, T., YACHIE, A., MIYAWAKI, T. & TANIGUCHI, N. (1989). The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. *Clin Exp Immunol* **76**, 337-342.
- ULEVITCH, R. J. & TOBIAS, P. S. (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **11**, 19-22.
- USHIKUBI, F., SEGI, E., SUGIMOTO, Y., MURATA, T., MATSUOKA, T., KOBAYASHI, T., HIZAKI, H., TUBOI, K., KATSUYAMA, M., ICHIKAWA, A., TANAKA, T., YOSHIDA, N. & NARUMIYA, S. (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* **395**, 281-284.
- VALLIERES, 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**, 1668-1683.
- VOSS, T., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HUBSCHLE, 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**, 379-389.
- WATKINS, L. R., GOEHLER, L. E., RELTON, J. K., TARTAGLIA, N., SILBERT, L., MARTIN, D. & MAIER, S. F. (1995). Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett* **183**, 27-31.
- WATKINS, L. R., WIERTELAK, E. P., GOEHLER, L. E., MOONEY-HEIBERGER, K., MARTINEZ, J., FURNESS, L., SMITH, K. P. & MAIER, S. F. (1994). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res* **639**, 283-299.
- WERTS, C., TAPPING, R. I., MATHISON, J. C., CHUANG, T. H., KRAVCHENKO, V., SAINT GIRONS, I., HAAKE, D. A., GODOWSKI, P. J., HAYASHI, F., OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., KIRSCHNING, C. J., WAGNER, H., ADEREM, A., TOBIAS, P. S. & ULEVITCH, R. J. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide

activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* **2**, 346-352.

WOOTEN, R. M., MA, Y., YODER, R. A., BROWN, J. P., WEIS, J. H., ZACHARY, J. F., KIRSCHNING, C. J. & WEIS, J. J. (2002). Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* **168**, 348-355.

WRIGHT, S. D., RAMOS, R. A., TOBIAS, P. S., ULEVITCH, R. J. & MATHISON, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433.

XIN, L. & BLATTEIS, C. M. (1992). Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 in tissue slices: effects of indomethacin and naloxone. *Brain Res Bull* **29**, 27-35.

ZHANG, D., ZHANG, G. & HAYDEN, M. S. E. A. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-1526.

IX. Anhang

1. Publikationen

1.1. Zitierbare Kongressmitteilungen:

Welsch J, Hübschle T, Kirschning C, Mühlradt P, Murgott J, Gerstberger R, Roth J (2008)

Die Bedeutung des Toll-like-Rezeptors 2 bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome nach Stimulation mit mycoplasmalen Lipopeptiden

Leipziger Blaue Hefte 4: Proceedings 18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie: 101

Ausgezeichnet mit dem Posterpreis der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft

Welsch J, Hübschle T, Mühlradt P, Murgott J, Gerstberger R, Roth J (2008)

Die Bedeutung von CD36 bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome nach Stimulation mit mycoplasmalen Lipopeptiden

Leipziger Blaue Hefte 4: Proceedings 18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie: 102

Welsch J, Hübschle T, Murgott J, Kirschning C, Mühlradt PF, Gerstberger R, Roth J (2009)

Fever, sickness behavior and circulating cytokines in response to macrophage-activating lipopeptide-2 and lipopolysaccharide in toll-like receptor-2-deficient mice and CD36-deficient rats.

Acta Physiologica 195 (Suppl): pp. 128-129 (Proceedings of the 88th Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft)

Welsch J, Hübschle T, Murgott J, Kirschning C, Mühlradt PF, Gerstberger R, Roth J (2009)

Fever, cytokines and illness responses after stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 and lipopolysaccharide in toll-like receptor-2-deficient mice and CD36-deficient rats.

Proceedings of the 3rd International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation (Matsue, Japan): in press

1.2. Originalarbeiten

Welsch J, Hübschle T, Murgott J, Kirschning C, Mühlradt PF, Gerstberger R, Roth J (2009)

Fever and formation of cytokines in response to macrophage-activating lipopeptide-2 and lipopolysaccharide in toll-like receptor-2-deficient TLR2-KO-mice and in CD36-deficient spontaneously hypertensive rats.

American Journal of Physiology: vorbereitet zur Publikation

2. Danksagung

Allen voran möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Joachim Roth für die hervorragende und unkomplizierte Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich Frau Jolanta Murgott für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Assays.

Meinen Freunden Daniela Ott und Florian Wuchert danke ich für die moralische und emotionale Unterstützung, welche bei der Anfertigung dieser Arbeit doch so manches Mal benötigt wurde, sowie für die Beseitigung so von so manchem Arbeitsproblem.

Alle Mitarbeiter der Physiologie haben mir eine schöne Zeit beschert und ich hoffe, dass es noch so manchen Doktoranden ebenso ergehen mag.

Ich danke meinem Freund Jens Kieselbach, der mich während des Anfertigen der Arbeit doch so manches mal wieder auf den Boden der Tatsachen zurückholte und mir die Ruhe und Gelassenheit gab, die ich zum Schreiben brauchte.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie danken, die mir das Studium ermöglichte und durch die ich soweit kommen konnte.

All meinen Freunden, die ebenso immer an meiner Seite standen sei hier ebenfalls gedankt.

3. Erklärung

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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.“

edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5566-7



© Fotolia XI - Fotolia.com