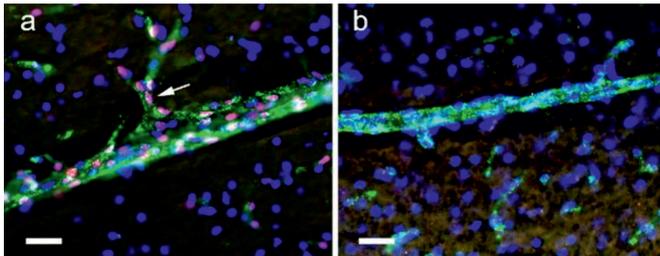


Charakterisierung der pyrogenen Wirkung
der synthetischen doppelsträngigen RNA
Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly I:C)



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2021

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2021

© 2021 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
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

**Charakterisierung der pyrogenen Wirkung
der synthetischen doppelsträngigen RNA
Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly I:C)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Thilo Voß

Tierarzt aus Ruit auf den Fildern

Gießen 2021

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

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

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth

zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation: 29.06. 2021

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
1.1	THERMOREGULATION UND FIEBER	5
1.1.1	THERMOREGULATION	6
1.1.2	FIEBER	11
1.1.2.1	Biologischer Nutzen	12
1.1.2.2	Fieberentstehungshypothesen	13
1.2	PATHOGEN ASSOZIIERTE MOLEKULARE STRUKTUREN	16
1.2.1	POLYINOSINIC-POLYCYTIDYLIC ACID	17
1.2.2	LPS	18
1.2.3	MURAMYL-DIPEPTID	20
1.2.4	DI-ALKYL LIPOPEPTIDE	20
1.2.5	ERKENNUNG PATHOGENER MUSTER	21
1.2.5.1	TLR	21
1.2.5.2	Signalwege der TLR	24
1.2.5.3	Zytoplasmatische Erkennung pathogener Muster	29
1.3	ZYTOKINE ALS ENDOGENE PYROGENE	30
1.3.1	TNF- α	31
1.3.1.1	TNF an sich	32
1.3.1.2	Sein Rezeptor	32
1.3.1.3	Biologische Wirkung	33
1.3.2	IL-6	34
1.3.2.1	IL-6 an sich	34
1.3.2.2	Sein Rezeptor	34
1.3.2.3	Biologische Wirkung	35
1.3.2.4	Prostaglandine	36
1.3.3	BEEINFLUSSUNG VON ZIELZELLEN	38
1.3.3.1	STAT 3	38
1.3.3.2	COX-2	39
1.4	TOLERANZERSCHEINUNGEN GEGENÜBER PYROGENEN	40
1.5	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	41

2.1	MATERIAL	43
2.1.1	GERÄTE	43
2.1.2	GEBRAUCHSMATERIAL	44
2.1.3	VERBRAUCHSMATERIAL	44
2.1.4	REAGENZIEN UND LÖSUNGEN	45
2.1.4.1	Injektionen	45
2.1.4.2	Zytokinanalytik	46
2.1.4.3	Immunhistochemie	46
2.1.4.4	In situ Hybridisierung	47
2.1.5	VERWENDETE LÖSUNGEN, PUFFER UND ANTIKÖRPER	48
2.1.5.1	NaCl	48
2.1.5.2	Phosphatpuffer	48
2.1.5.3	Paraformaldehyd-Lösung	48
2.1.5.4	Saccharose	49
2.1.5.5	Polyinosinic-polycytidylic acid (PIPC)	49
2.1.5.6	Diclofenac	50
2.1.5.7	Solvent (Diclofenac)	50
2.1.5.8	Nimesulide	50
2.1.5.9	Solvent (Nimesulide)	51
2.1.5.10	Heparin	51
2.1.5.11	Interferon- α	51
2.1.5.12	Interferon- γ	51
2.1.5.13	Primäre Antikörper	52
2.1.5.14	Sekundäre Antikörper und Detektionssystem	52
2.2	METHODEN	53
2.2.1	TIERMODELL	53
2.2.1.1	Haltung und Aufzucht	53
2.2.1.2	Telemetrie	54
2.2.1.3	Katheter	54
2.2.1.4	Kammer	55
2.2.1.5	Narkose	55

2.2.1.6	Operationen	56
2.2.1.6.1	Implantation des intraarteriellen Katheters	56
2.2.1.6.2	Implantation der subkutanen Kammer	57
2.2.1.6.3	Implantation des Senders	58
2.2.1.7	Durchführung der in vivo Versuche	58
2.2.1.8	Blutproben	60
2.2.1.9	Perfusionen	61
2.2.1.10	Präparationen	61
2.2.2	ZYTOKINANALYTIK	62
2.2.2.1	Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)	62
2.2.2.2	Interleukin-6	65
2.2.3	IMMUNHISTOCHEMIE	66
2.2.3.1	Antikörper	67
2.2.3.2	Amplifizierungen	67
2.2.3.3	Immunezymatische Methode	68
2.2.3.4	Mehrfachmarkierungen für Fluoreszenzmikroskopie	71
2.2.4	IN SITU HYBRIDISIERUNG	73
2.3	AUSWERTUNG UND STATISTIK	76
2.3.1	TELEMETRIE	76
2.3.2	ZYTOKINANALYTIK	77
2.3.3	IMMUNHISTOCHEMIE	78
2.3.3.1	Mikroskopie und Auswertung	78
3	<u>ERGEBNISSE</u>	80
3.1	EINFACHE INJEKTIONEN VON PIPC	80
3.1.1	INDUKTION PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE DURCH PIPC	84
3.1.1.1	Tumor Nekrose Faktor α	84
3.1.1.2	Interleukin-6	85
3.2	EFFEKT WIEDERHOLTER PIPC INJEKTIONEN AUF FIEBERREAKTION UND ZYTOKINPRODUKTION	88
3.2.1	FIEBERREAKTIONEN	88
3.2.2	ZYTOKINSPIEGEL NACH WIEDERHOLTER INJEKTION VON PIPC	92
3.2.2.1	Tumor Nekrose Faktor α	93

3.2.2.2	Interleukin-6	94
3.3	EINFLUSS VON CYCLOOXYGENASEINHIBITOREN	96
3.3.1	DICLOFENAC	96
3.3.2	NIMESULIDE	100
3.4	NACHWEIS DER COX-2 INDUKTION IM GEHIRN	104
3.5	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER NUKLEÄREN TRANSLOKATION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS STAT3	106
3.6	CHARAKTERISIERUNG DER STAT3 AKTIVierten ZELLTYPEN	109
3.7	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	117
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>119</u>
4.1	PIPC ALS EXOGENES PYROGEN	119
4.2	TOLERANZERSCHEINUNGEN GEGENÜBER PIPC	122
4.3	ROLLE DER ZYKLOOXYGENASEN	124
4.4	NUKLEÄRE STAT3 AKTIVIERUNG IM GEHIRN	126
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>128</u>
<u>6</u>	<u>SUMMARY</u>	<u>129</u>
<u>7</u>	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>131</u>
<u>8</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>135</u>

1 EINLEITUNG

1.1 Thermoregulation und Fieber

Aus dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik, der besagt, dass die Entropie in einem abgeschlossenen System niemals abnimmt, ergibt sich, dass ein Objekt, welches eine höhere Temperatur als seine Umgebung besitzt, Wärme an diese abgibt, im umgekehrten Fall nimmt das Objekt Wärme von der Umgebung auf. Dieser allgemeingültige Satz gilt auch für belebte Objekte. Die physikalischen Prinzipien, denen dieser Wärmetransport zugrunde liegt, sind Leitung (Konduktion), Strömung (Konvektion), Verdunstung (Evaporation) und Strahlung (Radiation).

Im Gegensatz zu den ektothermen Lebewesen, deren Körpertemperatur mit der Umgebungstemperatur schwankt, sind die endothermen Lebewesen (Säugetiere und Vögel) in der Lage ihre Körperkerntemperatur weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen und der eigenen motorischen Aktivität auf einem stabilen Niveau zu halten. Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Stoffwechselprozesse als chemische Reaktionen im Allgemeinen mit der Temperatur steigt, wird durch eine gleichmäßige Temperatur ein bestimmtes Niveau der Reaktionsgeschwindigkeit gewährleistet. Gleichzeitig liegt die Körpertemperatur der endothermen Tiere in den meisten Fällen deutlich über der Umgebungstemperatur. Somit bietet die Fähigkeit die Körpertemperatur auf einem relativ hohen Niveau festzulegen einen klaren Vorteil. Dieser wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass der Energieumsatz endothermer Lebewesen um das fünf bis zehnfache über dem ektothermer Tiere liegt und damit nicht zuletzt die Ausbildung eines komplexen zentralen Nervensystems und komplexer Verhaltensweisen begünstigt (Ivanov, 2006).

Zur Aufrechterhaltung dieses stabilen Niveaus muss der Organismus Strukturen aufweisen, die in der Lage sind die aktuelle Körpertemperatur zu erfassen. Diese Temperaturinformationen dienen zur Steuerung von thermoregulatorischen Endorganen, die eine Anpassung der Körpertemperatur an die jeweiligen Bedingungen zur Aufgabe haben.

1.1.1 Thermoregulation

Die Erfassung der Körpertemperatur wird von thermosensiblen Neuronen vorgenommen, die sich in kalt- und warm-sensitive Neurone unterteilen lassen. Warm-sensitive Neurone steigern

die Frequenz ihrer Aktionspotentiale mit steigender Temperatur, kalt-sensitive Neurone steigern ihre Aktivität bei sinkender Temperatur.

Thermosensible Strukturen finden sich in der Körperperipherie v.a. in Dermis und Epidermis, aber auch in der Schleimhaut des oberen Verdauungstraktes und des Urogenitaltraktes. Diese stellen freie Nervenendigungen dar, die im Fall der kalt-sensitiven Neuron v.a. über schwach myelinisierte A δ -Fasern den Temperaturreiz weiterleiten. Warm-sensitive Neurone besitzen meist unmyelinisierte C-Fasern (Spray, 1986). Zentrale thermosensible Regionen finden sich in Rückenmark, *Medulla oblongata*, rostralem Hypothalamus und der präoptischen Region (POA) (Magoun *et al.*, 1938; Chai & Lin, 1973; Simon, 1974). Des Weiteren sind thermosensible Strukturen außerhalb des ZNS in Teilen des Intestinums, retropleuralen und retroperitonealen Räumen sowie den Skelettmuskeln vorhanden (Simon 1974; Simon 2000).

Im Gegensatz zu den peripheren Rezeptoren, die überwiegend Kaltrezeptoren sind, sind zentral nur vereinzelt Kaltrezeptoren vorhanden. In der präoptischen Region/ anteriorem Hypothalamus (POA/AH) wurden beispielsweise ein Drittel der Neurone als warm-sensitiv, über die Hälfte als nicht temperatursensitiv, und ein geringer Anteil als kalt-sensitiv bestimmt (Boulant & Dean, 1986). Die Klassifizierung als warm- bzw. kalt-sensitives Neuron wurde aufgrund der temperaturabhängigen Änderung der Anzahl der Aktionspotentiale pro Sekunde vorgenommen. Neurone, deren Frequenz der Aktionspotentiale um mehr als 0,8 Aktionspotentiale pro Sekunde pro Grad Celsius Temperaturanstieg steigt, werden als warm-sensitive Neurone angesehen. Um als kalt-sensitiv zu gelten, muss die Anzahl der Aktionspotentiale um 0,5 pro Sekunde pro Grad Celsius Temperaturanstieg abfallen. Hierbei muss erwähnt werden, dass die Existenz primärer kalt-sensitiver Neurone im ZNS angezweifelt wird, und der Anstieg der Aktionspotentiale bei niedrigeren Temperaturen auf inhibitorische Effekte warm-sensitiver Neurone zurückgeführt werden kann (Kelso & Boulant, 1982; Boulant & Dean, 1986; Wechselberger *et al.*, 2006). Dabei bewirkt die sinkende Frequenz der Aktionspotentiale warm-sensitiver Neurone eine schwächere synaptische Hemmung der „kalt-sensitiven Neurone“, die dann ihrerseits verstärkt Aktionspotentiale entwickeln.

Als rezeptive Strukturen für Temperaturreize kommen eine Reihe von Ionenkanälen in Frage, die zu den *transient receptor potential* (TRP) Kanälen gehören. Die Thermosensoren TRPV 1-4, TRPM8 und TRPA1 stellen nichtselektive Kationenkanäle mit hoher Ca²⁺-Permeabilität an freien Nervenendigungen somatosensorischer Neurone dar (Tominaga & Caterina, 2004), die aus sechs transmembranären Domänen bestehen, von denen zwei (TM5 und TM6) die kationendurchlässige Pore formen (Montell, 2001; Gunthorpe *et al.*, 2002; Okazawa *et al.*,

2002). Sie werden durch sehr unterschiedliche Stimuli aktiviert, z.B. Protonen, Eicosanoide, Änderungen der extrazellulären Osmolarität, Dehnung der Zellmembran oder Veränderungen in der Temperatur. Aufgrund der RGT Regel steigt die Leitfähigkeit aller Kanäle mit der Temperatur, allerdings üblicherweise mit einem Q_{10} Wert von etwa 2. Die TRPV Kanäle hingegen weisen Q_{10} Werte >10 auf, bei den Kältesensoren TRPM8 und TRPA1 muss dieser Wert hingegen negativ sein.

Der Capsaicin Rezeptor war der erste Rezeptor, dessen Thermosensibilität erkannt wurde, obwohl es sich dabei um den wohl wichtigsten Schmerzsensor handelt (Caterina et al. 1997). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten des Capsaicin mit Vanilloiden erhielt der Rezeptor den Namen VR1 (*vanilloid receptor*), woraus nach seiner Zuordnung zu den TRP Kanälen der Name TRPV1 wurde. Thermische Stimulation dieses Rezeptors führt bei einem pH-Wert von 7,4 ab einer Temperatur von 43°C zu steigendem Kationeneinstrom in die Zelle. Geringere pH-Werte und Phosphorylierung verringern die Reizschwelle (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Vellani et al., 2001). Der TRPV2 Kanal besitzt 49% Strukturhomologie zu TRPV1 und wird ebenfalls durch hohe Temperaturen ($>52^{\circ}\text{C}$) aktiviert, aber nicht durch Protonen oder Vanilloide (Caterina et al., 1999). TRPV3 zeigt ab 34-37°C eine kontinuierlich steigende Aktivität (Peier et al., 2002b; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002; Patapoutian et al., 2003) und erfasst somit Veränderungen im physiologischen Bereich der Körperkerntemperatur. Der Aktivitätsbereich des TRPV4 Kanals umfasst ebenfalls die physiologisch und pathologisch vorkommenden Temperaturen, beginnt ab 27°C einzusetzen und steigt bis zu einem Maximalwert bei 42°C an, um dann steil abzufallen (Guler et al., 2002; Watanabe et al., 2002; Patapoutian et al., 2003). Heute weiß man jedoch, dass diese durch hohe Temperaturen aktivierbaren Kanäle keinen direkten Bezug zur Thermoregulation haben. Der physiologische Warmsensor, der TRPM2 Kanal, wird bei Temperaturen oberhalb von 38°C aktiviert. Seine Aktivierung sorgt für die Rekrutierung von Wärmeabgabemechanismen und limitiert die Höhe des Fiebers. Er wurde erst vor kurzem identifiziert und charakterisiert (Song et al. 2016; Siemens & Kamm 2018).

Als Rezeptor für Kälte gilt der TRPM8 Kanal, der durch Temperaturen unter einem Grenzwert von 25-28°C aktiviert wird (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). Von nozizeptiven Neuronen wird TRPA1 exprimiert, der in einer Studie durch Temperaturen unter 20°C aktiviert werden konnte (Story et al., 2003). Weitere Studien konnten dies jedoch nicht reproduzieren und identifizierten Senfölglycoside, und scharfe Komponenten von Ingwer, Zimt und Nelken, die allesamt nicht mit der subjektiven Empfindung von Kälte verbunden sind, als Agonisten von TRPA1 (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004). Menthol, Kampfer

und Capsaicin, die Agonisten von TRPM8, TRPV3 und respektive TRPV1 sind, bewirken ein Temperaturempfinden, das mit dem Temperaturbereich ihrer Aktivität übereinstimmt. Ein wahrscheinlicherer Kandidat für das schmerzhaft Kälteempfinden scheint hingegen der tetrodotoxinresistente spannungsgesteuerte Natrium Kanal Nav1.8 zu sein, der unbeschadet von niedrigen Temperaturen noziceptive Neurone zu aktivieren vermag und dessen Abwesenheit in Nav1.8 Null-Mutanten Kältereaktionen verhindert (Zimmermann *et al.*, 2007). Von den durch Kälte aktivierbaren Rezeptoren / Kanälen ist TRPM8 als der physiologische Kältesensor inzwischen allgemein anerkannt (Peier *et al.* 2002; Ott *et al.*, 2015).

Der Temperaturreiz gelangt von sekundären somatosensorischen Neuronen im dorsalen Horn des Rückenmarks (*substantia gelatinosa*) einerseits über den Thalamus in den primären somatosensorischen Cortex als Sinneseindruck (Craig *et al.*, 1996) und andererseits über den lateralen parabrachialen Nucleus (LPB) (Cechetto *et al.*, 1985) zum medianen präoptischen Nucleus (MnPO) und periventriculärer POA (Nakamura & Morrison, 2008b).

Die POA weist ein eigenes thermosensitives Potential auf. Durch Erwärmung und Abkühlung dieser Region ließen sich thermoregulatorische Reaktionen des Gesamtorganismus hervorrufen, die der hypothalamischen Temperaturänderung entgegenliefen (Kundt *et al.*, 1957; Hammel *et al.*, 1960). Verantwortlich hierfür können die thermosensiblen Neurone dieser Region gemacht werden (s.o.). Die TRPV Kanäle 1-4 sind im Gehirn weit verbreitet und wurden mit Ausnahme von TRPV3 im Hypothalamus nachgewiesen (Liedtke *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Wainwright *et al.*, 2004; Cristino *et al.*, 2006). Ein Anzeichen ihrer Beteiligung an der zentralen Temperaturerfassung stellt die Aktivierung nicht selektiver Kationenkanäle und Auslösung von Aktionspotentialen in hypothalamischen Neuronen nach Erwärmung über einen Grenzwert dar (Hori *et al.*, 1999). Speziell in der präoptischen Region gibt es zahlreiche Neurone, die auf Erwärmung mit einem Calciumeinstrom reagieren (Leisengang *et al.* 2018). Dieser Calciumeinstrom erfolgt über den TRPM2-Kanal, dem physiologischen Warmsensor (Song *et al.* 2016; Siemens & Kamm 2018).

Daneben existiert ein weiteres Modell zur Erklärung der Thermosensibilität von Neuronen des ZNS. Danach bestimmt der Abfall des Membranpotentials die Zeit bis zum Erreichen des Grenzwertes zur Auslösung eines Aktionspotentials und damit die Frequenz mit der das jeweilige Neuron „feuert“. Temperaturinsensitive Neurone weisen geringe Änderungen dieses depolarisierenden Präpotentials auf, warm-sensitive Neurone hingegen haben mit steigenden Temperaturen deutlich steigende Potentialverläufe (Curras *et al.*, 1991; Griffin *et al.*, 1996) Dies wird durch eine Verringerung der hyperpolarisierenden Leitfähigkeit, hervorgerufen

durch verringerten Kaliumausstrom, bewirkt (Griffin *et al.*, 1996). Im Anschluss an ein Aktionspotential und nachfolgender Hyperpolarisierung werden HCN- (*Hyperpolarization activated nucleotide gated*) Kanäle geöffnet, über die Natriumionen in die Zelle strömen und die Membran langsam depolarisieren. Diese Schrittmacherfunktion wird durch bestimmte Kaliumkanäle (potassium-A channel) verzögert, da sich im Anschluss an die Hyperpolarisation diese Kanäle öffnen, und durch Kaliumausstrom das Membranpotential stabilisiert wird. Die Ausstattung der Zelle mit weiteren Kaliumkanälen (TASK-1, TREK-1 und TRAAK), die „Kaliumlecks“ darstellen, beeinflusst das Verhalten der Zelle bei Temperaturänderungen. Wird dieser Kaliumverlust durch den TASK-1 Kanal dominiert, weist die Zelle eine hohe Änderung des Quotienten aus AP/s pro °C auf und reagiert folglich warm-sensitiv. Steigt die Bedeutung der TREK-1 und TRAAK Kanäle, reagiert die Zelle zunehmend temperaturinsensibel (Wechselberger *et al.*, 2006).

Unabhängig von Art und Weise, wie der Temperaturreiz zentral wahrgenommen wird, sind die thermosensitiven präoptischen Neurone nicht nur zur Erfassung thermischer Reize im ZNS befähigt. Sie werden, im Gegensatz zu den temperaturinsensitiven Neuronen, auch durch Afferenzen von den peripheren Thermorezeptoren beeinflusst (Boulant & Hardy, 1974; Nakamura & Morrison, 2008b). Kältereize aus der Peripherie stimulieren Neurone des medianen präoptischen Nukleus (MnPO) durch excitatorische Übertragung aus Neuronen des lateralen parabrachialen Nukleus (LPB). Über GABA-erge Inhibition wird die Aktivität der warm-sensitiven Neurone des medialen präoptischen Nukleus (MPO) gehemmt (Nakamura & Morrison, 2008a; Nakamura & Morrison, 2008b). Unter normothermen Bedingungen inhibiert der MPO tonisch Neurone im medialen und posteriorem Hypothalamus sowie in der *Medulla oblongata*, die thermoregulatorische Effektorgewebe steuern (Chen *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2002; Cano *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2005). Der Wegfall dieser Hemmung bewirkt einen Anstieg der Wärmeproduktion und Verringerung der Wärmeabgabe. Das wichtigste thermogene Gewebe bei kleinen Säugetieren ist das braune Fettgewebe (BAT), in dem das „Uncoupling Protein 1“ (UCP1, „Entkopplungsprotein“) den Protonengradienten über der Mitochondrienmembran kurzschließt, so dass die Energie in Form von Wärme frei wird. Alle übrigen Gewebe produzieren Wärme aufgrund gewisser Ineffizienzen der Stoffwechselreaktionen. Die Skelettmuskulatur kann beispielsweise etwa 25% der Energie in Bewegung umwandeln, bei isometrischen Kontraktionen sinkt der Wirkungsgrad auf Null.

Die Temperaturdifferenz zwischen Körperschale und Umwelt bestimmt die Wärmemenge, die an die Umwelt abgeführt wird. Diese wird durch die Durchblutung der Haut beeinflusst. Die

Wärmeabgabe kann insbesondere bei geringen Differenzen durch Evaporation verstärkt werden. Dies geschieht durch vermehrte Schweißproduktion, Hecheln oder Befeuchten des Fells mit Speichel. Neben den autonomen Prozessen stellt das Verhalten einen wichtigen Beitrag zur Homöostase der Körpertemperatur dar. Wärmeverluste können durch den Kontakt zu anderen Tieren, die Einnahme bestimmter Körperhaltungen oder das Aufsuchen von Orten mit anderen thermischen Gegebenheiten moduliert werden.

Bei der Steuerung der thermoregulatorischen Effektorgewebe sind insbesondere der dorsomediale Hypothalamus (DMH) und der Nukleus Raphe pallidus (RPA) in der Mittellinie der Medulla oblongata von Bedeutung. Disinhibition des DMH löst Thermogenese im BAT aus (Zaretskaia *et al.*, 2002). Über Stimulation der RPA wird die neuronale Aktivität der sympathischen Bahnen zum BAT gesteigert (Cao *et al.*, 2004). Nach Bindung von Noradrenalin am β_3 Rezeptor der Adipozyten kommt es durch gesteigerte Lipolyse und vermehrte Expression von UCP1 zur Wärmebildung. Über dieselben zentralen Regionen erfolgt der Anstieg der Herzfrequenz (Samuels *et al.*, 2002), der als Antwort auf einen Kältereiz hervorgerufen wird (Nakamura & Morrison, 2007). Die Wärmebildung durch Zittern ist ebenfalls von der Aktivität dorsomedialer hypothalamischer Neurone abhängig (Tanaka *et al.*, 2001). Des Weiteren sind Neurone in der *Formatio reticularis* des Hirnstamms und der rostralen medullären Raphe an der Steigerung des Muskeltonus und dem Kältezittern beteiligt (Asami *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 2006).

Der Sympathikus vermittelt über Noradrenalin am α_1 Rezeptor der Gefäßmuskulatur periphere Vasokonstriktion. Vasokonstriktive Nuklei der medullären Raphe erhalten inhibitorischen Input von der POA (Tanaka *et al.*, 2002), der sowohl direkt als auch indirekt der POA entstammen könnte. Warm-sensitive Neurone der POA hemmen vasokonstriktive Neurone des ventralen tegmentalen Areals und stimulieren vasodilatative Neurone in einer Region, die sich vom caudolateralem Hypothalamus zum periaqueductalen Grau (PAG) erstreckt, sowie in der *Formatio reticularis* (Zhang *et al.*, 1997), die Efferenzen zur RPA aufweist (Smith *et al.*, 1998). Die Mechanismen und neuroanatomischen Korrelate zur evaporativen Wärmeabgabe sind weniger gut untersucht, da klassische Labortiere nicht in nennenswertem Umfang über Schweißdrüsen verfügen.

Zusammenfassend ergibt sich ein Modell der Thermoregulation, in dem sowohl die periphere als auch die zentrale Erfassung der Ist-Temperatur die Aktivität thermosensibler Neurone im Bereich von MnPO und MPO beeinflussen. Diese modulieren die Aktivität nachgeordneter Gehirnregionen, unter denen vor allem dem DMH eine tragende Rolle zukommt. Über Kerngebiete der medullären Raphe gelangt das Signal zu sympathischen Bahnen, durch die

ein Großteil der thermoregulatorischen Effektorgewebe innerviert wird. Die Entscheidung über die Aktivierung der Effektorgewebe könnte in der Intensität und Anzahl der stimulierten thermosensiblen Strukturen begründet sein. Sobald die Temperatur die Reizschwelle einer thermosensiblen Struktur eines Neurons erreicht, werden Aktionspotentiale generiert und an die Effektoren weitergeleitet, um diese zu steuern. Die thermosensorischen Neurone stellen nach Ansicht einiger Autoren somit autonome „Thermostaten“ oder „Komparatoren“ dar, welche die Effektoren steuern (Kobayashi *et al.*, 2006). Je mehr periphere oder zentrale Thermostaten aktiviert werden, umso stärker fällt die Reaktion der Effektoren aus.

1.1.2 Fieber

Gemäß der Definition der Kommission für Thermophysiology der International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission) ist Fieber eine aktiv herbeigeführte und aufrecht erhaltene Erhöhung der Körperkerntemperatur, die durch Veränderung der Thermokontrolle in Form einer Erhöhung des Temperatursollwertes bedingt wird. Im Gegensatz dazu werden Zustände, bei denen die Körpertemperatur ohne Änderung dieses Sollwertes erhöht ist, Hyperthermie genannt. Sie treten vor allem bei körperlicher Anstrengung und hohen Umgebungstemperaturen auf, wenn die Wärmeabgabe unzureichend ist. Fieber wird hingegen als Erhöhung der Körpertemperatur definiert, die oft, aber nicht notwendigerweise, Teil der körpereigenen Abwehr gegen die Invasion lebender oder unbelebter Pathogene ist (IUPS, 2001).

Der Sollwert (Hammel *et al.*, 1963) sollte nicht als festgesetzter Temperaturwert aufgefasst werden, sondern als Zustand, in dem die Körpertemperatur zwischen den Schwellenwerten zur Aktivierung von Wärmebildung bzw. Wärmeabgabe liegt. In diesem Temperaturbereich können temperaturerhöhende mit temperatursenkenden Mechanismen allein durch rhythmische Veränderung der Vasomotorik (Hautdurchblutung) bewältigt werden. Man spricht von einer „Zwischenschwellenzone“. Beim Fieber werden diese Schwellenwerte zur Aktivierung von Wärmebildung und Wärmeabgabe zu höheren Temperaturen verschoben (Roth & Blatteis, 2014).

1.1.2.1 Biologischer Nutzen

Fieber ist ein Bestandteil der so genannten Akute-Phase-Reaktion (APR). Unter diesem Begriff wird eine Reihe von Maßnahmen zusammengefasst, die vom Organismus als Reaktion auf ein akutes generalisiertes Entzündungsgeschehen veranlasst werden. Neben dem sehr gut dokumentierbaren und quantifizierbaren Fieber treten bei der Akuten-Phase-Reaktion eine Reihe von immunologischen, physiologischen, metabolischen und verhaltensspezifischen Veränderungen auf, die sich in Symptomen wie Anorexie, Adipsie, Somnolenz (oder verändertes Schlafverhalten) Abgeschlagenheit, Bewegungsunlust, endokrine Veränderungen wie die Aktivierung der hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Achse, verringerte soziale Interaktion und verringerter Körperpflege widerspiegeln. Dieser Symptomkomplex wird unter dem Begriff „sickness behavior“ zusammengefasst und ist weniger auf eine Schwächung des Organismus als auf eine systematische Bekämpfungsstrategie der Krankheitsursache zurückzuführen (Hart, 1988).

Fieberhafte Reaktionen können nicht nur bei homoiothermen Lebewesen beobachtet werden, sondern auch bei poikilothermen Vertebraten, Arthropoden und Anneliden (Mackowiak, 2000). Selbst das Pantoffeltierchen *Paramecium caudatum* zeigt thermoregulatorisches Verhalten unter hypoxischen Bedingungen (Malvin & Wood, 1992). Diese weite Verbreitung im Tierreich impliziert eine lang zurückreichende phylogenetische Geschichte und spricht, gepaart mit dem erhöhten Energieaufwand und den Risiken der gesteigerten Körpertemperatur, für einen evolutionären Vorteil. Für eine Reihe von Infektionsmodellen konnte eine verbesserte Überlebensrate der Versuchstiere festgestellt werden, wenn ihnen die Ausbildung einer Fieberreaktion ermöglicht wurde (Bell & Moore, 1974; Vaughn *et al.*, 1974; Bernheim & Kluger, 1976; Covert & Reynolds, 1977; Kluger & Vaughn, 1978; Smith *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1998; Arif *et al.*, 1999; Ostberg *et al.*, 2000; Basu & Srivastava, 2003). Diese günstige Beziehung zwischen Temperaturerhöhung und Mortalität hat jedoch Grenzen. So zeigten mit *Pasteurella multocida* infizierte Kaninchen mit sehr stark ausgeprägtem Fieber geringere Überlebensraten (Kluger & Vaughn, 1978). Einen ebenfalls negativen Einfluss auf die Prognose hat Fieber im Anschluss auf einen Schlaganfall beim Menschen, wobei allerdings nicht die Ursache des Fiebers in die Untersuchung einfluss (Azzimondi *et al.*, 1995).

Der Anstieg der Körpertemperatur bewirkt eine erhöhte Aktivität der Leukozyten (Roberts & Steigbigel, 1977; Smith *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1998; Ostberg *et al.*, 2000; Basu & Srivastava, 2003), eine vermehrte Expression proinflammatorischer Zytokine (Kap. 1.3) (Jiang *et al.*, 1999) und eine Absenkung des Plasma-Eisen-Spiegel. Eisen ist für bakterielles

Wachstum essentiell. Zudem vermindert sich bei febrilen Temperaturen die Fähigkeit von Bakterien Eisen bindende Chelate zu synthetisieren (Weinberg, 1974; Grieger & Kluger, 1978; Kluger & Rothenburg, 1979; Bullen *et al.*, 2005). Ein weiterer positiver Aspekt des Fiebers ist die Hemmung der LPS-Synthese gram-negativer Bakterien, die dadurch insbesondere für das Komplementsystem angreifbarer werden (Green & Vermeulen, 1994).

Dem gegenüber steht die Gefahr, dass insbesondere die Reaktion auf bakterielle Pyrogene in einem septischen Schock mündet, bei dem eine Überexpression der proinflammatorischen Zytokine unter anderem über Endothelschädigung und Koagulopathie in Begleitung von Fieber oder Hypothermie zu multiplen Organversagen führen kann (Horn, 1998).

Nachteilig an der Fieberreaktion ist der bereits erwähnte erhöhte Energieaufwand, der mit einer erhöhten kardiovaskulären Belastung einhergeht (Karjalainen & Viitasalo, 1986). Um die Temperatur um ein Grad anzuheben, ist beispielsweise beim Menschen eine Steigerung des Energieumsatzes von 13% erforderlich (Dantzer, 2004).

Da Fieber sowohl in der Hochträchtigkeit als auch in der neonatalen Phase nicht oder nur schwach ausgebildet werden kann, andere Komponenten der Akuten-Phase-Reaktion aber durchaus auftreten, könnte eine nachteilige Auswirkung der erhöhten Temperatur für diese Lebensphase ursächlich sein (Blatteis *et al.*, 1981; Zeisberger *et al.*, 1981)

Des Weiteren muss das Fieber auf ein bestimmtes Maß beschränkt werden, um die bei hohen Temperaturen eintretende Denaturierung von Proteinen zu vermeiden.

1.1.2.2 Fieberentstehungshypothesen

Die klassische Ansicht der Fieberentstehung besagt, dass Zellen des Immunsystems, insbesondere mononukleäre Phagozyten als Reaktion auf den Kontakt mit pyrogenen Noxen wie z.B. Infektionserregern pyrogene Zytokine produzieren und freisetzen. Diese gelangen mit dem Blut zum ZNS, wo sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden und durch Freisetzung von PGE₂ eine Sollwertverschiebung in den thermoregulatorischen Zentren bewirken.

Grundlage dieser humoralen Fieberentstehungshypothese ist die Entdeckung der sogenannten endogenen Pyrogene, die aus peritonealen Granulozyten extrahiert werden konnten und nach intravenöser Gabe Fieber in Kaninchen hervorriefen (Beeson, 1948). Die wichtigsten pyrogenen Zytokine sind der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α), und die Interleukine IL-1 β und IL-6. Daneben werden einer Anzahl weiterer Zytokine pyrogene Eigenschaften zugesprochen. Hierzu gehören unter anderem die Interferone (IFN), TNF- β , eine Reihe weitere Interleukine und andere Zytokine.

Damit das humorale Fiebersignal aus der Blutbahn in das ZNS gelangt, muss es die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Durch den Kontakt von Endothelzellen mit Astrozyten bilden sich *Zonulae occludentes* (tight junctions) zwischen den Endothelzellen aus und stellen die wichtigste Komponente der Blut-Hirn-Schranke für lösliche Substanzen dar. Zytokine sind hydrophile Peptide mit einem Molekulargewicht im Bereich von 15 bis 25kD. Ihre Fähigkeit, das Gehirnparenchym *per diffusionem* zu erreichen, ist äußerst beschränkt. Daneben existieren für IL-1, IL-6 und TNF- α spezifische sättigbare Transportsysteme (Banks *et al.*, 1991; Gutierrez *et al.*, 1993; Banks *et al.*, 1994). Deren Kapazität ist jedoch ebenso wie die des passiven Transportes zu gering, um im Hirnparenchym weitere pyrogener Zytokine und/oder PGE₂ auf der abluminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke zu induzieren (Banks *et al.* 1995).

In den sensorischen zirkumventrikulären Organen (CVO) existiert hingegen ein gefenstertes Endothel, so dass Zytokine an diesen Orten in Kontakt mit den Zellen des ZNS treten können. Die sensorischen CVO setzen sich aus den in der anterioren Begrenzung des dritten Ventrikels gelegenen Regionen *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und dem Subfornikalorgan (SFO) sowie der *Area postrema* (AP) der *Medulla oblongata* zusammen. Durch das gefensterte Endothel sind die in den sensorischen CVO gelegenen Gliazellen, Neurone und deren Fortsätze im Blut zirkulierenden Substanzen ausgesetzt und können so als Sensoren für humorale Mediatoren dienen. Durch Läsionen der einzelnen Regionen oder die Unterbrechung ihrer efferenten Bahnen konnte deren Beteiligung an der Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem ZNS nachgewiesen werden (Blatteis *et al.*, 1983; Blatteis *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Romanovsky *et al.* 2003). Auf funktioneller Ebene zeigen Neurone des OVLT und des SFO *in vitro* einen Anstieg ihrer Impulsrate nach Perfusion mit Zytokinen oder PGE₂ (Shibata & Blatteis, 1991 ; Matsuda *et al.*, 1992 ; Dessen & Ferguson, 2003). Alle drei sensorischen CVOs zeigen außerdem einen deutlichen Anstieg der fos-Expression nach Stimulation mit mit LPS oder IL-6, was ebenfalls auf eine neuronale Aktivierung durch inflammatorische Stimuli hindeutet (Hare *et al.*, 1995; Vallieres *et al.*, 1997). Rezeptoren für Zytokine, besonders für IL-6, sowie deren Aktivierung (siehe Abschnitt 1.3), wurden in den sensorischen CVOs, aber auch generell im Hirnendothel nachgewiesen (Harré *et al.*, 2002 ; Harré *et al.*, 2003 ; Roth *et al.*, 2004 ; Rummel *et al.*, 2005b). Auch Studien an Primärkulturen der sensorischen CVOs belegen, dass neuronale und gliale Elemente dieser spezialisierten Hirnstrukturen durch Zytokine, PGE₂, aber auch durch

bestimmte Moleküle von Pathogenen (exogene Pyrogene) direkt aktiviert werden (Wuchert *et al.*, 2009 ; Ott *et al.*, 2010 ; Ott *et al.*, 2012 ; Simm *et al.*, 2016).

Gemäß aktueller Vorstellung kommt dem Hirnendothel mindestens eine genauso hohe Bedeutung beim Transfer von Signalen der Fieberentstehung in das Gehirn zu wie den sensorischen CVOs (Roth & Blatteis 2014). Das Hirnendothel im Bereich der präoptischen Region scheint durch Zytokine oder exogene Pyrogene in eine Relaisstation umfunktioniert zu werden, die den Übertritt der inflammatorischen Signale in das Gehirn und damit die Ausbildung von Fieber ermöglicht. Hierbei kommt der Induktion der induzierbaren Enzyme zur Synthese von PGE₂ (Zyklooxygenase-2, COX-2; mikrosomale Prostaglandin E-Synthase-1, mPGES-1) eine besondere Bedeutung zu (Blomqvist & Engblom, 2018). Diese relativ neue Vorstellung basiert im Wesentlichen auf folgenden experimentellen Befunden. Mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden wurden Mäuse generiert, bei denen selektiv in Endothelzellen der Blutgefäße des Gehirns die für COX-2 und mPGES-1 kodierenden Gene ausgeschaltet waren. Bei diesen Mäusen war das in Wildtyp-Tieren durch LPS induzierbare Fieber massiv unterdrückt (Wilhelms *et al.*, 2014). Als Folge einer inflammatorischen Aktivierung des Hirnendothels werden nämlich über die Induktion von COX-2 und mPGES-1 signifikante Mengen an PGE₂ in das Hirnparenchym abgegeben. PGE₂ wiederum kann in der präoptischen Region über den Prostaglandin-Rezeptor EP3 durch eine Beeinflussung von Neuronen der dort lokalisierten thermoregulatorischen Strukturen Fieber erzeugen (Lazarus *et al.*, 2007).

Da signifikante Erhöhungen der Körpertemperatur jedoch bereits nach einer Zeitspanne von weniger als einer viertel Stunde nach LPS Injektionen auftreten können und Zytokine erst neu synthetisiert werden müssen, wird die bislang beschriebene „humorale Hypothese“ für die Induktion der frühen Phase bestimmter Fieberreaktion kontrovers diskutiert (Romanovsky *et al.*, 2005; Roth & Blatteis, 2014). Eine weitere und schnellere Möglichkeit des Immunsystems zur Kommunikation mit dem ZNS stellt die Stimulation peripherer Nerven dar, die das Fiebersignal über afferente Bahnen zu den thermoregulatorischen Zentren leiten könnten.

Hinweise für eine Beteiligung peripherer Nerven an der Fieberreaktion ergaben sich aus dem Auftreten von Fos Signalen, einem Marker neuronaler Aktivierung (Sagar *et al.*, 1988), im Nukleus Tractus Solitarius (NTS), einer Hauptprojektionsregion vagaler Afferenzen, nach pyrogener Stimulation (Elmquist *et al.*, 1993; Wan *et al.*, 1993). Durch Unterbrechung der Leitungsbahnen des *Nervus Vagus* distal des Zwerchfells lassen sich bestimmte Fieberreaktionen (LPS-Fieber nach intravenöser oder intraperitonealer Injektion des

Pyrogens) abschwächen (Goldbach *et al.*, 1997; Sehic & Blatteis, 1996). Als Hypothese für die Entstehung der frühen Phase des LPS-induzierten Fiebers wurde postuliert, dass es nach Auftauchen von LPS im Blut zu einer Aktivierung von Kupffer-Zellen der Leber kommt, die über eine sehr schnell verlaufende Bildung von Komplementfaktoren und PGE₂ eine Aktivierung von Afferenzen des *N. Vagus* bewirken (Blatteis *et al.* 2004). Es gibt auch Hinweise für die Beteiligung weiterer Nerven an der Bildung schnell auftretender Fiebersignale. Injektionen von LPS in eine subkutan implantierte Kammer mit Hautkontakt erzeugen Fieberreaktionen, die durch Lokalanästhetika abgeschwächt werden können (Ross *et al.* 2000), was für eine Beteiligung afferenter Fasern von Hautnerven an der Entstehung von Fieber in diesem Modell spricht. Ähnliche Beobachtungen wurden für den *N. trigeminus* nach Injektion von LPS in periodontales Gewebe publiziert (Navarro *et al.*, 2006). Ein derartiger Transfer peripher entstehender Entzündungssignale hätte den Vorteil, dass das Gehirn bereits sehr frühzeitig über lokale Entzündungsreaktionen informiert wird. Derartige schnelle Alarmsignale könnten ohne großen Zeitverlust für die Einleitung einiger unspezifischer Abwehrreaktionen sorgen, zu denen auch die frühe Phase des Fiebers gehört.

1.2 Pathogen assoziierte molekulare Strukturen

Der Begriff Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP) bezeichnet eine Reihe von molekularen Strukturen, die essentielle Bestandteile von Mikroorganismen darstellen, beziehungsweise zwangsläufig mit der Replikation von Viren assoziiert sind (Uematsu & Akira, 2006). Da diese Molekülstrukturen für das Überleben oder Fortbestehen der pathogenen Erreger benötigt werden, sind sie evolutionär hoch konserviert. Unter den PAMP finden sich Zellwandbestandteile von Bakterien und Pilzen (LPS, MDP, Zymosan), Oberflächenproteine (MALP-2, FSL-1), Nukleinsäuren (dsRNA, CpDNA) oder bakterielle Geißelbestandteile (Flagellin). Gleichzeitig handelt es sich bei den PAMP um Strukturen, die spezifisch für Mikroorganismen sind und nicht, bzw. nur in sehr geringem Ausmaß (CpDNA, dsRNA) von höher entwickelten Lebewesen exprimiert werden und somit spezifisch für mikrobielle Infektionen sind. PAMP werden aufgrund ihrer Herkunft und ihrer Fähigkeit zur Fiebererzeugung auch als exogene Pyrogene bezeichnet.

1.2.1 Polyinosinic-polycytidylic acid (PIPC)

1953 erschien eine Arbeit über eine antivirale Substanz aus *Penicillium funiculosum* (Shope, 1953a). Darin berichtete der Autor von einem Pilz, der auf dem Fischleimüberzug eines Photos, aufgenommen während des zweiten Weltkrieges auf Guam, wuchs. Aus diesem Pilz, der als *Penicillium funiculosum* identifiziert wurde, konnte eine Substanz extrahiert werden, die in *in vivo* Experimenten die Überlebenszeit von Mäusen nach Gabe letaler Dosen verschiedener Viren verlängerte oder die Letalität verringerte (Shope, 1953a, b). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Substanz, die den Namen Helenine erhalten hatte, sich in unpolaren Lösungsmitteln nicht löste, in den zellulären Bestandteilen in höherer Konzentration als in der Nährlösung vorlag und durch Einfrieren nicht inaktiviert wurde. Aufgrund der Tatsachen, dass bei den durchgeführten Versuchen keine *in vitro* Effekte beobachtet werden konnten, dass die antivirale Eigenschaft sich nicht zeigte, wenn die Verabreichung von Helenine mehrere Stunden nach der Infektion mit dem jeweiligen Virus erfolgte, dass die Ausbildung einer Immunität gegen das jeweilige Agens unterdrückt wurde und dass ab einer bestimmten Dosis die maximale Wirkung erreicht war, schloss der Autor, dass die Substanz nur indirekt durch Auslösung wirtseigener antiviraler Mechanismen wirkte (Shope, 1953c).

Nach der Entdeckung von Interferon (Isaacs & Lindenmann, 1957) wurden die Eigenschaften der durch Helenine hervorgerufenen Wirkungen mit denen von Interferon verglichen (Rytel *et al.*, 1966; Shope, 1966a, 1966b) und Helenine als Auslöser für die Interferonproduktion identifiziert.

Mittlerweile war Helenine als Ribonukleoprotein charakterisiert worden (Lewis *et al.*, 1959). Die antiviralen Eigenschaften konnten durch Entfernung inhibitorisch wirkender Proteine gesteigert werden, und eine doppelsträngige RNA wurde als essentielles Prinzip der Interferon Induktion durch Helenine identifiziert (Lampson *et al.*, 1967). Das Vorkommen doppelsträngiger RNA in einem Extrakt eukaryotischer Zellen konnte durch das Vorliegen einer viralen Infektion der Pilzkultur erklärt werden (Ellis & Kleinschmidt, 1967; Lampson *et al.*, 1967; Tytell *et al.*, 1967; Lemke & Nash, 1974).

Aufgrund der Tatsache, dass sich die Mehrsträngigkeit der RNA als das ausschlaggebende Motiv herausstellte, wurden weitere RNA Moleküle auf ihre Wirksamkeit bezüglich der Interferon Induktion untersucht. Hierbei stellte sich besonders die Kombination Polyinosinic-Polycytidylic acid (POLY (I:C)) als hochwirksam heraus, wohingegen die Einzelstränge inaktiv waren (Field *et al.*, 1967b). Die Doppelsträngigkeit als wirksames Motiv wurde in weiteren Arbeiten mit Reovirus RNA (Tytell *et al.*, 1967) und RNA aus einem Coliphagen

(Field *et al.*, 1967a) bestätigt. Hierbei zeigte sich, dass zum einen die Zytokininduktion durch die reine Reovirus RNA schneller erfolgt als nach Applikation vollständiger Viruspartikel. Zum anderen wurde die RNA des Coliphagen zum Vergleich in ihre Einzelstränge zerlegt, die wie die Einzelstränge aus Polyinosinic acid oder Polycytidylic acid keine Aktivität besaßen. Doppelsträngige RNA ist ein Nebenprodukt viraler Replikation (Jacobs & Langland, 1996; Alexopoulou *et al.*, 2001), welche nicht nur bei doppelsträngigen RNA Viren auftritt, sondern auch als Zwischenschritt der Replikation einzelsträngiger RNA Viren (Montagnier & Sanders, 1963; Baltimore *et al.*, 1964; Lee *et al.*, 1994). DNA Viren sind ebenfalls in der Lage die Bildung doppelsträngiger RNA zu induzieren, indem bei der Transkription des Virusgenoms gebildete mRNA zu einem gewissen Grad doppelsträngige Komplexe bildet (Colby & Duesberg, 1969; Duesberg & Colby, 1969; Boone *et al.*, 1979). Traditionell wird PIPC als Interferonstimulator angesehen und häufig zur experimentellen Simulation einer durch virale Infektionen verursachten Akute-Phase Reaktion eingesetzt (Field *et al.*, 1967b; Katafuchi *et al.*, 1991; Fortier *et al.*, 2004; Traynor *et al.*, 2004). Hierbei treten Effekte auf, die PIPC als exogenes Pyrogen charakterisieren. Pyrogene Eigenschaften von PIPC wurden bereits bei verschiedenen Spezies, wie z.B. Kaninchen (Rotondo *et al.*, 1987; Won & Lin, 1988; Chuang *et al.*, 1990; Soszynski *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1994), Ratte (Chuang *et al.*, 1990; Fortier *et al.*, 2004), Maus (Traynor *et al.*, 2004), Meerschweinchen (Cooper *et al.*, 1988) und Mensch (Field *et al.*, 1971; Young, 1971; Champney *et al.*, 1979) beschrieben.

1.2.2 LPS

LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Es bedeckt einen Großteil der Zelloberfläche und ist für das Überleben der Bakterien essentiell (Raetz *et al.*, 1991). Es ist aus einer hydrophoben Komponente, dem Lipid A, einem zentralen Oligosaccharid und einem die Antigenität ausmachenden Polysaccharid aufgebaut. Das in der Membran verankerte Lipid A stellt die toxische Komponente des LPS dar und ist dessen kleinste pyrogene Untereinheit.

Außer nach Lyse der Zelle wird es auch während vitaler Vorgänge an die Außenwelt abgegeben, deshalb ist der ebenfalls für LPS gebräuchliche Begriff Endotoxin irreführend. Da in der Darmflora der meisten Säugetiere gram-negative Bakterien einen bedeutenden Anteil einnehmen, ist diese fortwährend LPS ausgesetzt. Das Vorkommen von LPS im Darm kann somit als physiologisch gelten. In geringen Mengen gelangt bakterielles LPS aus dem Darm

über die Pfortader in die Leber, um dort von den Kupfferzellen phagozytiert zu werden. Das darüber hinaus gehende Vorkommen von LPS im Gewebe oder Gefäßsystem ist hingegen ein eindeutiges Zeichen einer bakteriellen Infektion.

LPS bindet mit dem Lipid A an das LPS Bindungsprotein (LBP), ein 60 kD Serumprotein, dessen Vorkommen in Rahmen der Akuten-Phase Reaktion drastisch ansteigt (Tobias *et al.*, 1986). Der Komplex aus LPS und LBP kann nun wiederum von dem CD14 Rezeptor, sowohl in seiner löslichen als auch membrangebundenen Form, erfasst werden (Wright *et al.*, 1990). Dieser Komplex vermittelt über den TLR4 (Kap. 1.2.5.1) unter Beteiligung von MD-2 (myeloid differentiation protein 2) das LPS Signal an die Zelle (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999; Shimazu *et al.*, 1999). Daneben existieren zytoplasmatische Rezeptoren, die in der Lage sind in die Zelle eingedrungenes LPS zu erkennen, wie z.B. NOD1 und 2 (Inohara *et al.*, 2001).

LPS ist das am ausgiebigsten studierte Pyrogen. In vivo Stimulation führt zu einer dosisabhängigen Reaktion, die mit der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (v.a. TNF- α , IL-1, IL-6), Fieber und weiteren Komponenten des Symptomkomplex des „sickness behaviour“, wie z.B. Anorexie, Adipsie, verminderte soziale Interaktion und Bewegungsunlust einhergeht. Bei hohen Dosierungen kann LPS einen septischen Schock auslösen.

Die jeweiligen Dosierungen zum Erreichen einer Fieberantwort, bzw. des Schockzustandes sind stark Spezies-abhängig. Das Meerschweinchen gehört wie die Ratte zu den Arten, die relativ unsensitiv auf LPS reagieren. Die minimal wirksame Dosis beginnt bei wenigen $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht. Das Kaninchen oder der Mensch entwickeln bereits ab Dosierungen unter einem ng/kg deutliche Symptome (Roth, 1996).

Intramuskuläre Injektionen von $20\mu\text{g}/\text{kg}$ bewirken beim Meerschweinchen beispielsweise ein etwa 6 Stunden andauerndes Fieber, das mit drastischen Produktionen der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 einhergeht. Die Maximalwerte an zirkulierendem TNF- α sind bereits nach 60 Minuten erreicht und fallen schnell wieder ab. IL-6 hingegen korreliert in seiner Kinetik mit der Fieberreaktion, erreicht seinen Spitzenwert nach 3 Stunden zum Zeitpunkt der maximalen Erhöhung der Körpertemperatur und ist am Ende der Fieberreaktion noch nachweisbar (Roth *et al.*, 1993).

Mit intravasalen und intraperitonealen Injektionen ähnlicher Dosen LPS werden Fieberreaktionen von ähnlicher Dauer und Intensität hervorgerufen. Diesen Fieberantworten ist eine Zweiphasigkeit mit Fieberspitzen zu den Zeitpunkten 1h und 3h nach der Injektion zueigen.

Subkutan appliziert sind deutlich höhere LPS Dosen zum Erreichen einer derartigen Fieberreaktion notwendig (Rummel *et al.*, 2004).

1.2.3 Muramyl-Dipeptid

Muramyl-Dipeptid (N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, MDP) ist die kleinste bioaktive Untereinheit des bakteriellen Peptidoglycans (Murein) (Ellouz *et al.*, 1974), welches insbesondere die Zellwand gram-positiver Bakterien prägt und dort ein bis zu 40 Schichten starkes Netz ausbildet. Bei gram-negativen Bakterien ist diese Schicht nur schwach ausgebildet. MDP wird sowohl von vitalen Bakterien als auch durch deren Lyse freigesetzt und wird durch das Immunsystem aufgrund seiner Struktur erkannt (Kap. 1.2.5.3)

MDP dient als Modell für Fieberreaktionen, die durch Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien hervorgerufen werden. Systemische Gaben von MDP rufen beim Meerschweinchen ein biphasisches Fieber mit langer anhaltender zweiter Fieberphase hervor. Diese Fieberreaktion wird von einer massiven Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 begleitet (Roth *et al.*, 1997a; Roth *et al.*, 1997b).

Die Erkennung von Muramyl-Dipeptid findet nicht über Toll Rezeptoren statt, sondern über die zytoplasmatischen Moleküle NOD 1 und NOD 2 (Kap. 1.2.5.3).

1.2.4 Di-Akyl Lipopeptide

Mykoplasmen gehören zu den kleinsten Bakterien und besitzen aufgrund ihrer beschränkten Enzymausstattung einige Besonderheiten. Ihnen fehlt eine Zellwand. Somit können sie auch nicht anhand ihrer Zellwandbestandteile vom Immunsystem eines Wirtes als fremd erkannt werden. Eine weitere Besonderheit sind die in ihrer Zellmembran vorkommenden Di-Akyl Lipopeptide, die im Gegensatz zu Lipopeptiden herkömmlicher Bakterien lediglich zwei Fettsäureketten und somit eine freie NH₂-Gruppe besitzen (Mühlradt *et al.*, 1997). Diese können vom angeborenen Immunsystem mittels eines Heterodimers der TLR 2 und 6 (Kap.1.2.5.1) erkannt werden.

Als experimentelle Pyrogene werden das Makrophagen aktivierende Lipopeptid-2 (MALP-2) und das Fibroblasten stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1) verwendet. Chemisch unterscheiden sie sich in der Länge und Aminosäuresequenz ihrer Peptidketten.

In vitro führen Di-Akyl Lipopeptide zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Mühlradt & Frisch, 1994; Takeuchi *et al.*, 2000a; Takeuchi *et al.*, 2001). In vivo bewirken beide Substanzen eine deutliche Fieberreaktion, die Ähnlichkeiten mit Fieberreaktionen anderer Pyrogene zeigt. (Galanos *et al.*, 2000; Deiters *et al.*, 2003). Diese Fieberreaktionen sind mehrstündig und insbesondere in ihrer Intensität dosisabhängig. Hohe Dosierungen dieser Substanzen lassen bei Ratten dem Fieber eine hypotherme Reaktion vorausgehen. Bei Meerschweinchen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Hübschle *et al.*, 2006; Greis *et al.*, 2007). Gemeinsam mit dem Fieber waren im Plasma der Tiere erhöhte Konzentrationen von TNF- α und IL-6 vorhanden. Des Weiteren reagieren die Tiere mit einer verminderten Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie verminderter motorischer Aktivität.

In einer Dosierung von 100 μ g/kg ergaben sich bei Ratten nur geringfügige Unterschiede für beide Pyrogene im Hinblick auf die Fieberreaktion und Zytokinexpression.

1.2.5 Erkennung pathogener Muster

1.2.5.1 TLR

Das Immunsystem der Wirbeltiere (zumindest der kiefertragenden Wirbeltiere, Gnathostomata), zu dessen Hauptaufgabe die Erkennung und Abwehr infektiöser Agentien gehört, kann in zwei Bereiche unterteilt werden, das spezifische und das unspezifische Immunsystem. Das spezifische Immunsystem zeichnet sich durch eine sehr große Anzahl verschiedener Rezeptoren (Immunglobuline der B-Lymphozyten, T-Zell-Rezeptoren der T-Lymphozyten) aus, die jeweils für eine einzelne pathogene Struktur spezifisch sind. Seine maximale Leistung erreicht das spezifische Immunsystem erst bei wiederholtem Kontakt mit einem Antigen. Bei der Erkennung und Bekämpfung bisher unbekannter Pathogene steht somit das unspezifische Immunsystem in der ersten Reihe. Die Anzahl der diesem System zur Verfügung stehenden Rezeptoren muss geringer sein, da nicht für jede mögliche pathogene Struktur jederzeit eine hinreichende Menge an Rezeptoren vorhanden sein kann.

Aufgrund der Tatsache, dass es bestimmte Strukturen gibt, die für das Überleben und/ oder die Vermehrung von Pathogenen essentiell sind, im Wirtsorganismus in der Regel jedoch nur im Rahmen einer Infektion auftreten (Kap. 1.2), besteht eine Möglichkeit der unspezifischen Abwehr darin diese Muster zu erkennen, als Signal für die Notwendigkeit einer Immunantwort zu deuten und Maßnahmen einzuleiten, die diese Antwort effektiv gestalten. Dazu gehört die Eigenschaft einiger Zellen des unspezifischen Immunsystems die jeweiligen Antigene zu präsentieren und so für das spezifische Immunsystem angreifbar zu machen.

Diese Antigen-präsentierenden Zellen (APC) bestehen aus Monozyten, Makrophagen und den dendritischen Zellen (DC). Des Weiteren leitet das unspezifische Immunsystem durch die Freisetzung diverser Mediatoren eine Vielzahl von Reaktionen des Organismus ein, die die Bekämpfung des Pathogens unterstützen sollen (z.B. Entzündungsreaktionen).

Eine Klasse von Rezeptoren, die erst in relativ junger Vergangenheit mit der Erkennung von Pathogenen in Verbindung gebracht wurde, stellen die Toll-Like-Rezeptoren dar. Bei diesen Toll-Like-Rezeptoren (TLR) handelt es sich um eine Gruppe von zur Zeit 10 (TLR1-10) beim Menschen, bzw. 12 (TLR1-9 und TLR11-13) in der Maus, bekannten Rezeptoren, die ihren Namen von einem Protein der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) ableiten, das ursprünglich für die embryonale dorsoventrale Polarität verantwortlich gemacht wurde (Hashimoto *et al.*, 1988). In adulten Fruchtfliegen spielt es außerdem eine essentielle Rolle in der immunologischen Abwehr von Pilzinfektionen (Lemaitre *et al.*, 1996). Im darauf folgenden Jahr wurde das Vorkommen einer humanen Variante des Proteins Toll nachgewiesen, die einen transmembranären Rezeptor darstellt und über den NF-kappaB Signalweg an der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8) sowie CD-80 Molekülen, die als co-stimulierender Faktor für die Aktivierung von T-Zellen benötigt werden, beteiligt ist (Medzhitov *et al.*, 1997).

Das erste PAMP, das als Ligand eines TLR identifiziert wurde, war LPS (Kirschning *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). In diesen Arbeiten wurde der TLR2 für die LPS Erkennung verantwortlich gemacht. Bereits kurze Zeit später zeigte sich jedoch, dass TLR4 für die LPS Wirkung essentiell ist (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999). In der Folgezeit wurden sowohl für diese, als auch für die weiteren TLR Liganden bestimmt.

Das Spektrum der durch die einzelnen TLR erkannten PAMP variiert stark. Einige TLR erkennen nur einzelne Muster, von anderen ist eine Vielzahl von Agonisten bekannt.

TLR1 erkennt in Interaktion mit TLR2 bakterielle Tri-Acyl-Lipopeptide (Takeuchi *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu ist für die Erkennung von Di-Acyl-Lipopeptiden, die von Mykoplasmen gebildet werden, die Interaktion von TLR2 und 6 notwendig (Takeuchi *et al.*, 2001). Zu weiteren von TLR2 gebundenen Liganden gehören Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Zymosan (Aliprantis *et al.*, 1999; Lien *et al.*, 1999; Schwandner *et al.*, 1999; Underhill *et al.*, 1999; Schroder *et al.*, 2003), wobei Zymosan ebenfalls TLR2/ TLR6 Heterodimere aktiviert (Roeder *et al.*, 2004).

Der Ligand von TLR3 ist doppelsträngige RNA (Alexopoulou *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2002). Diese kann sowohl auf die virale Replikation zurückgehen, als auch deren

synthetisches Analogon PIPC sein. Daneben rezeptiert TLR3 auch endogene RNA aus nekrotischen Zellen (Kariko *et al.*, 2004b) und small interfering RNA (Kariko *et al.*, 2004a).

Der Rezeptor für LPS TLR4 benötigt zu Bindung von LPS Kofaktoren. Der Transport im Serum findet gebunden an das LPS-bindende Protein (LBP) statt (Tobias *et al.*, 1986). Dieses Protein ermöglicht die Bindung von LPS an den membranständigen Rezeptor CD14 (Ulevitch & Tobias, 1995). Des Weiteren beteiligt sich ein kleines Oberflächenprotein (MD-2), das an dem TLR4 assoziiert ist an dem LPS Erkennungskomplex (Shimazu *et al.*, 1999). Dieser Rezeptorkomplex bewirkt eine Multimerisierung der TLR4, die dann die Signaltransduktion ermöglicht (Visintin *et al.*, 2003; Saitoh *et al.*, 2004).

Neben LPS erkennt TLR4 in seiner murinen Form Paclitaxel (Taxol®) (Kawasaki *et al.*, 2000; Byrd-Leifer *et al.*, 2001), ein aus *Taxus brevifolia* gewonnenes Diterpen. Ausserdem konnten verschiedene virale Proteine als Liganden von TLR4 identifiziert werden (Kurt-Jones *et al.*, 2000; Haynes *et al.*, 2001; Rassa *et al.*, 2002)

Der Ligand von TLR5 ist bakterielles Flagellin (Means *et al.*, 2003). TLR7 und TLR8 erkennen virale einzelsträngige RNA (Heil *et al.*, 2004). Daneben werden diverse synthetische Verbindungen mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Nukleinsäuren wie Imidazoquinoline oder Resiquimod von TLR7 bzw. TLR7 und 8 erfasst (Hemmi *et al.*, 2002; Jurk *et al.*, 2002). Von TLR9 wird unmethylierte CpG reiche DNA bakteriellen (Hemmi *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2001; Means *et al.*, 2003) oder viralen Ursprungs (Lund *et al.*, 2003) erkannt, aber auch das Pigment Haemozoin, ein Abbauprodukt des Haemoglobins, das von *Plasmodium falciparum* gebildet wird (Coban *et al.*, 2005). Ein TLR10 Agonist ist bisher nicht identifiziert worden. Der murine TLR11 erkennt sowohl bisher unbekannte Strukturen uropathogener *E. coli* Bakterien (Zhang *et al.*, 2004), als auch das Protein Profilin aus *Toxoplasma gondii* und eventuell weiterer *Apicomplexa* (Yarovinsky *et al.*, 2005; Yarovinsky & Sher, 2006).

Neben diesen exogenen TLR Liganden ist die TLR Aktivierung durch eine Reihe endogener Substanzen beschrieben worden. Hierzu gehören die Hitzeschockproteine HSP22, 60, 70 und gp96 (Ohashi *et al.*, 2000; Asea *et al.*, 2002; Vabulas *et al.*, 2002; Roelofs *et al.*, 2006), Fibrinogen (Smiley *et al.*, 2001), Fibronectin Bestandteile (Okamura *et al.*, 2001), Surfactant Protein A (Guillot *et al.*, 2002), Heparansulfat (Johnson *et al.*, 2002), Chromatin-IgG Komplexe (Leadbetter *et al.*, 2002), mRNA nekrotischer Zellen (Kariko *et al.*, 2004b) und High-Mobilty Group Box-1 (HMGB-1, Lotze & Tracey, 2005). Jedoch konnte zumindest für HSP60 und 70 gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte nicht zwangsläufig auf einer Eigenwirkung des HSP auf die TLR beruhen müssen, sondern durch Verunreinigungen mit

LPS und anderen bakteriellen Komponenten bedingt sein könnten (Bausinger *et al.*, 2002; Wallin *et al.*, 2002; Gao & Tsan, 2003b, a; Tsan & Gao, 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TLR entweder der Unterscheidung zwischen „fremd“ und „eigen“ dienen, oder die Erkennung von Zuständen gewährleisten, die eine Bedrohung darstellen, indem entweder spezifische mikrobielle Komponenten oder Substanzen, die auf den Niedergang von Zellen hindeuten, erkannt werden (Matzinger, 2002; Johnson *et al.*, 2003).

Diese Zustandsüberwachung scheint ein phylogenetisch sehr altes Konzept zu sein, da die Signalkaskaden der TLR denen des Proteins Toll der Fruchtfliege stark ähneln und auch Pflanzen Rezeptoren besitzen, die Homologien zu den TLR aufweisen (Baker *et al.*, 1997; Medzhitov *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997; O'Neill & Greene, 1998; Jordan *et al.*, 2002).

Die Daten über TLR beim Meerschweinchen sind noch lückenhaft. Die Tatsache, dass das Konzept der Erkennung von pathogenen Mustern sich in Armen der Evolution wiederfindet, die sich vor etwa einer halben Milliarden Jahre getrennt haben, lässt vermuten, dass das Meerschweinchen keine Ausnahme von der Regel darstellt und die Erkenntnisse, die zumeist aus humanen oder murinen Zellen stammen, auch auf diese Tierart zutreffen.

1.2.5.2 Signalwege der TLR

Der Aufbau der einzelnen TLR ist homogen. Sie stellen Rezeptoren mit einer extrazellulären (bzw. vesikulären s.u.) Domäne aus einer Aneinanderreihung von 19-25 leucin-reichen Motiven (engl. leucine-rich-repeats, LRRs) dar, die jeweils aus 24-29 Aminosäuren bestehen (Bell *et al.*, 2003). Es folgt eine transmembranäre Domäne und eine zytoplasmatische Domäne. Diese weist eine Homologie zu der Signaldomäne des IL-1 Rezeptors auf und wird Toll/IL-1R homologe Domäne genannt (TIR) (Bowie & O'Neill, 2000).

Die LRRs bilden eine hufeisenförmige Spule, die im Fall des TLR3 aus 23 regulären und 2 irregulären LRRs gebildet werden. Durch die parallele Anordnung der β -Faltblätter der LRR bildet sich die konkave Fläche des Hufeisens, dessen Bogen 270° umspannt (Bell *et al.*, 2005; Choe *et al.*, 2005). In diese Konkave ragen die hydrophoben Reste der LRR und stabilisieren die Grundstruktur. Bis auf eine Seite des Hufeisens ist die gesamte Oberfläche mit oligomannose-reichen Zuckerresten glykolisiert und weist eine negative Ladung auf. Da es sich bei dem Liganden um eine Säure mit ebenfalls negativer Ladung handelt, kommen nur die positiv geladenen glykolisierungsfreien Flächen als Bindungsstellen in Betracht. Sowohl in der Nähe des N-terminalen als auch auf einer lateralen Fläche der extrazellulären Domäne befindet sich eine derartige Stelle (Choe *et al.*, 2005). In der Nähe der lateralen Stellen im

Bereich von LRR12 und 20 finden sich außerdem Sulfatreste, die Phosphate des dsRNA Rückrates binden könnten (Bell *et al.*, 2005). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass von diesen beiden Bindungsstellen die letztere für die direkte Bindung von dsRNA verantwortlich gemacht werden kann. In direkter Nachbarschaft zu LRR20 konnten an den Stellen 539 und 541 der Aminosäurefolge die Aminosäuren Histidin und Asparagin als essentiell für die TLR3 Signaltransduktion ausgemacht werden, wobei nicht gesagt werden konnte, ob LRR20 die Bindung mit dsRNS eingeht oder die Aminosäuren an Stelle 539 und 541. Diese beiden Aminosäuren sind evolutionär konserviert und ließen sich bei diversen Tierarten vom Zebrafisch bis zum Menschen nachweisen (Bell *et al.*, 2006). Aus dieser Erkenntnissen konstruierten Bell *et al.* ein Modell, in dem die dsRNA mit einem nicht an der Esterbindung beteiligtem Sauerstoffatom der Phosphodiestergruppe aus der kleinen Furche der Doppelhelix an den Imidazolrest des Histidins H539 bindet und die 2'OH-Gruppe der Ribose eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Asparagin N541 eingeht. Dabei wird der RNA Strang relativ proximal an der transmembranären Domäne gebunden und liegt „horizontal“, d. h. parallel zur Zelloberfläche. In diesem Modell kann jetzt aufgrund der zweifachen Symmetrie der dsRNA ein weiterer TLR um 180° gedreht an den Nukleotidstrang binden und gleichzeitig mit dem ersten TLR dimerisieren. Auf der zytoplasmatischen Seite kann ebenfalls eine Dimerisierung der TIR Domänen stattfinden. An der linearen Helix können sich auch weitere TLR Mono- oder Dimere anlagern. Für die TLR1, 2, 4, 6 wurde bereits gezeigt, dass zur Signaltransduktion eine Homo- bzw. Heterodimerbildung notwendig ist (Ozinsky *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2001; Alexopoulou *et al.*, 2002; Youn *et al.*, 2006). Auch für den TLR3 war bereits gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne an dsRNS Strängen Oligomere bildet (Bell *et al.*, 2005) und eine Di- oder Multimerisierung des Rezeptors für die Übertragung des Signals erforderlich ist (de Bouteiller *et al.*, 2005).

Der humane TLR3 ist der erste Rezeptor dieser Gruppe, dessen Struktur samt Bindungsstellen aufgeklärt werden konnte.

Die Signalkaskaden, die mit der Ligandenbindung beginnen und über verschiedene Adapterproteine und Kinasen zur Transkription der Zielgene führen, weisen zwischen den einzelnen TLR und dem IL-1 Rezeptor starke Ähnlichkeiten aber auch bestimmte Unterschiede auf (Medzhitov *et al.*, 1998).

Zurzeit sind fünf intrazytoplasmatische Adaptormoleküle bekannt, die an die TIR Domäne der TLR mit eigenen TIR Domänen angelagert werden können und starke Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen (O'Neill *et al.*, 2003). Dabei handelt es sich um den „myeloid differentiation factor 88“ (MyD88), „TIR domain-containing adaptor protein“

(TIRAP), auch „MyD88 adaptor-like“ (MAL) genannt, „TIR domain-containing adaptor inducing interferon (IFN)- β “ (TRIF), auch „TIR domain-containing adaptor molecule-1“ (TICAM-1) genannt, „TIR-containing protein“ (TIRP), auch „TRIF-related adaptor molecule“ (TRAM) oder TICAM-2 genannt und „sterile alpha and HEAT/Armadillo motif protein“ (SARM).

An die TIR Domäne aktivierter TLR kann sich MyD88 mit seiner C-terminalen TIR Domäne anlagern, woraufhin seine N-terminale Death Domäne die IL-1R-assoziierte Kinasen 4 (IRAK4) bindet (Cao *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1997; Wesche *et al.*, 1997). IRAK4 phosphoryliert IRAK1, welches dann mit dem „TNF receptor-associated factor 6“ (TRAF6) assoziiert. Über weitere Schritte wird die Aktivität des I κ B Kinase Komplex (IKK) verstärkt, der den „inhibitor of nuclear-factor-kappa-B“ (I κ B) phosphoryliert und damit inaktiviert, was letztendlich zur nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit zur Transkription inflammatorischer Zytokine wie IL-6, -12, TNF- α , aber auch von Interferonen führt.

Dieser sogenannte MyD88 abhängige Weg des TLR Signals ist allen TLR eigen (Hultmark, 1994; Kawai *et al.*, 1999; Schnare *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2000b; Alexopoulou *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2002), wobei die Beteiligung des MyD88 abhängigen Weges am TLR3 Signal strittig ist. Es konnte die Abhängigkeit der IL-12 Produktion von MyD88 als Reaktion auf PIPC Stimulation nachgewiesen werden (Alexopoulou *et al.*, 2001). Der TIR Region des TLR3 fehlt jedoch an einer Stelle, die bei allen anderen TLR als essentiell für die Bindung von MyD88 ist, die Aminosäure Prolin, die sowohl bei humanen als auch murinen TLR3 durch Alanin ersetzt ist (Xu *et al.*, 2000; Kaisho & Akira, 2001; Akira, 2003). Trotzdem konnte die direkte Interaktion der TIR Domäne des TLR3 mit MyD88 gezeigt werden (Doyle *et al.*, 2003).

Bei den TLR4 und 2 (+1/ +6) ist der Faktor TIRAP zusätzlich zu dem bereits gesagten für die MyD88 abhängige Signaltransduktion notwendig. In TIRAP $^{-/-}$ Mäusen konnte die LPS induzierte Proliferation von Splenozyten ebenso wie die Freisetzung der Zytokine IL-6, -12 und TNF- α aus peritonealen Makrophagen unterbunden werden (Yamamoto *et al.*, 2002). In vivo zeigte sich eine starke Abschwächung dieser Zytokine (Horng *et al.*, 2002).

Daneben existieren MyD88 unabhängige Signalwege. Für TLR3 und 4 konnte gezeigt werden, dass der aktivierte TLR ebenso mit TRIF/TICAM-1 interagieren kann, was zum einen zur Produktion von Typ 1 Interferonen über die Transkriptionsfaktoren „interferon regulatory factor 3 und 7“ (IRF-3, -7) führt (Sato *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 2002; Sharma *et*

al., 2003), aber auch NF- κ B MyD88 unabhängig aktiviert (Yoneyama *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2001).

Neben TRIF ist außerdem der Faktor TRAM/TICAM-2 an der MyD88 unabhängigen Signalkaskade des TLR4 als Adaptermolekül zwischen TLR und TRIF beteiligt (Fitzgerald *et al.*, 2003; Oshiumi *et al.*, 2003). Peritoneale Makrophagen aus TRAM defizienten Mäusen sezernieren kein IL-6, -12 oder TNF- α als Antwort auf LPS Stimulation. Für die Agonisten der übrigen TLR konnte keine Beeinflussung festgestellt werden (Yamamoto *et al.*, 2003).

Ein weiterer essentieller Faktor des TRIF Signalwegs ist TRAF3 (Hacker *et al.*, 2006; Oganessian *et al.*, 2006).

Somit ergibt sich, dass der MyD88 abhängige Weg bei den TLR 2 und 4 vermittelten Reaktionen auf TIRAP/MAL angewiesen ist, bei den übrigen Rezeptoren ist dies nicht der Fall. Daneben existiert ein MyD88 unabhängiger, TRIF/TICAM-1 abhängiger Weg für die TLR3 und 4, der bei TLR 4 zusätzlich TRAM/TICAM-2 zur Signaltransduktion benötigt.

Diese Wege sind aber nicht vollständig voneinander getrennt. Über TRIF kann z.B. TRAF6 aktiviert werden (Jiang *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003), was wie bei dem MyD88 Weg NF- κ B zur nukleären Translokation anregt. Dies geschieht über IKK, die die I κ B phosphoryliert und damit deren hemmende Wirkung auf NF- κ B aufhebt. Kinasen der IKK Gruppe sind auch an der Aktivierung der IRF Proteine beteiligt. Diese komplexen Zusammenhänge, die hier nur partiell ausgeführt sind und sicherlich nicht als vollständig aufgeklärt gelten dürfen, ermöglichen eine Vielzahl von Reaktionen mit einer geringen Anzahl (je nach Spezies 10-13) von Rezeptoren für eine Vielzahl von Pathogenen und einer noch geringeren Anzahl von Adaptermolekülen. Die Fähigkeit der einzelnen TIR Adaptor Proteine, NF- κ B und IRF zu aktivieren, wurde untersucht, indem die Expression ihrer Zielgene quantifiziert wurde (Kaiser & Offermann, 2005). Gerade für den im Rahmen dieser Arbeit besonders relevanten TLR3 wurde eine umfassende Genexpressionsanalyse nach Stimulation mit PIPC durchgeführt (Huang *et al.* 2006).

Im Gegensatz zu der starken Konservierung der Rezeptoren, ihrer Ligandenspezifität und ihren Signalwegen zeigt die Expression der TLR deutliche Speziesunterschiede (Rehli, 2002). Daten über die Expressionsmuster der TLR sind in erster Linie für humane und murine TLR vorhanden.

Generell finden sich TLR vor allem in Gewebe, das Kontakt zur Außenwelt hat oder zum Immunsystem gehört. Für den TLR3 konnte mRNA in diversen Geweben, die in Kontakt mit der Außenwelt stehen, nachgewiesen werden (Gastrointestinaltrakt samt Anhangsorgane, Atmungsorgane, Urogenitaltrakt, Epidermis), aber auch im zentralen Nervensystem (Gehirn,

Rückenmark, Netzhaut), Skelett- und Herzmuskulatur, endokrine Drüsen (Schilddrüse, Nebenniere) sowie Organen, die zentrale Rollen im Immunsystem spielen (Leber, Milz und Thymus) (Zarembek & Godowski, 2002; Kumar *et al.*, 2004; Kollisch *et al.*, 2005; Nishimura & Naito, 2005).

Als Rezeptoren des Immunsystems finden sich TLR auch auf Leukozyten. Diese zeigen je nach Rezeptor und nach Spezies verschiedene Verteilungsmuster. Der TLR3 ist in der humanen Leukozytenpopulation vor allem in dendritischen Zellen zu finden, wohingegen die mRNA des murine TLR3 am stärksten in Makrophagen vertreten ist (Muzio *et al.*, 2000; Applequist *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2003). In humanen Monozyten ist keine TLR3 mRNA nachweisbar. Werden diese stimuliert, sich zu dendritischen Zellen zu differenzieren, wird TLR3 mRNA gebildet (Visintin *et al.*, 2001). Unter den dendritischen Zellen zeigen vor allem unreife myeloische DC und unreife CD11c⁺ DC des Blutes TLR3 Expressionen. DC Vorläufer plasmazellulären Ursprungs (pDC2), der Hauptquelle von Interferon- α aus dem Blut (Siegal *et al.*, 1999), exprimieren kein TLR3 (Kadowaki *et al.*, 2001; Hornung *et al.*, 2002).

Daneben findet sich der hTLR3 auch auf Natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) (Schmidt *et al.*, 2004). Für den murinen TLR ist zusätzlich die Expression auf neutrophilen Granulozyten, Mikroglia, B- und T-Lymphozyten gezeigt worden (Applequist *et al.*, 2002).

Neben diesen speziesspezifischen Unterschieden unterscheidet sich ebenfalls die Induzierbarkeit der Rezeptoren durch inflammatorische Stimuli, wie Interferone oder LPS, in Abhängigkeit von der Spezies, der Zellpopulation und der Art der Stimulation (Heinz *et al.*, 2003). In den myeloischen DC konnte der Rezeptor auf Proteinebene in subzellulären Kompartimenten nachgewiesen werden (Matsumoto *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wird z.B. bei Fibroblasten, einer Hauptquelle von Interferon- β , TLR3 auf der Zellmembran exprimiert (Matsumoto *et al.*, 2002). Eine intrazelluläre Lokalisation an Phagosomen ist bereits für TLR2 beschrieben worden (Underhill *et al.*, 1999).

Die intrazellulär gelegenen TLR ragen mit ihren LRR in das Lumen der Vesikel, ihre TIR Domäne ist zytoplasmatisch gelegen. Dies befähigt sie in Vesikel aufgenommene Pathogene zu erkennen, die sonst außerhalb der Reichweite ihrer Rezeptoren wären, was besonders für die Erkennung intrazellulärer Erreger wie Viren notwendig ist.

Die zellspezifische Expression der einzelnen TLR konnte im ZNS auf der Ebene der mRNA, durch Stimulation mit Liganden und auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die mRNA der humanen TLR1-9 wurde in Mikroglia Zellen gefunden, in humanen Astrozyten vor allem TLR3, in mäßigem Ausmaß TLR1, 2, 4, 5, und 9 und an der Nachweisgrenze TLR6, 7, 8, 10

mRNS (Bsibsi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2005; Prehaud *et al.*, 2005). Daneben wurde in Oligodendrozyten mRNA für hTLR2 und 3 nachgewiesen.

Auf Proteinebene konnten die hTLR3 und 4 sowohl auf Mikroglia als auch auf Astrozyten gefunden werden. Mikroglia exprimiert die Rezeptoren vor allem auf zytoplasmatischen Vesikeln, Astrozyten hingegen auf der Zellmembran (Bsibsi *et al.*, 2002). Der TLR2 wurde außerdem auf der Zellmembran von Mikroglia nachgewiesen (Jack *et al.*, 2005).

Neurone exprimieren das Rezeptorprotein von hTLR3 vornehmlich in Vesikeln, aber auch auf der Zellmembran (Prehaud *et al.*, 2005).

Die Existenz muriner TLR auf Mikrogliazellen ist für die Rezeptoren 1, 4, 7 und 9 auf der Ebene der mRNA nachgewiesen (Applequist *et al.*, 2002). Murine Astrozyten exprimieren ebenfalls mRNA für mTLR3 in starkem Ausmaß, für mTLR1 und 6 in moderaten Mengen, für mTLR2, 4, 5 und 9 in geringem Umfang und für TLR7 und 8 ist die Expression fraglich. Auf Proteinebene konnte aufgrund fehlender spezifischer Antikörper nur das Vorkommen von TLR2 und 4 auf Astrozyten gezeigt werden (Bowman *et al.*, 2003; Esen *et al.*, 2004; Carpentier *et al.*, 2005). In der Ratte ist die Expression des TLR3 auf Astrozyten sowohl als mRNA als auch als Protein nachgewiesen worden (Scumpia *et al.*, 2005)

Die TLR in diversen Zellen des ZNS ermöglichen dem Organismus trotz der Abschottung des ZNS durch die Blut-Hirn Schranke und dem Fehlen von MHC Expressionen eingedrungene pathogene Agentien zu erkennen und zu bekämpfen. Aufgrund ihres Vorkommens an der Blut-Hirn Schranke, ihrer Verteilung im Gehirnparenchym, ihres engen Kontaktes mit Neuronen und der Ausstattung mit Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen haben Astrozyten ideale Voraussetzung eine Wächterrolle im ZNS zu übernehmen.

1.2.5.3 Zytoplasmatische Erkennung pathogener Muster

Neben den membranständigen TLRs gibt es eine Reihe von zytosolischen Rezeptoren zur Erkennung von PAMPs, die in das Zytoplasma eingedrungen sind. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen: NOD-LRR und CARD-Helikase Proteine. NOD steht für „nucleotide binding oligomerization domain“. NOD1 und 2 erkennen beispielsweise die Bestandteile „ γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid“ (iE-DAP) und Muramyl-Dipeptid des bakteriellen Peptidoglycan (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003).

Das in dieser Arbeit verwendete Pyrogen PIPC wird außer von TLR3 auch von dem CARD-Helikase Protein RIG-I erkannt. CARD steht für „caspase recruitment domain“, RIG-I für „retinoic acid inducible gene I“. RNA Helikasen sind weit verbreitete Enzyme, die in Zellen

nahezu aller Organismen RNA Helices entwinden können. RIG-I besitzt neben der C-terminalen Helikase Domäne zwei N-terminale CARD Domänen (Yoneyama *et al.*, 2004). Die Signaltransduktion nach Kontakt mit dsRNA findet über das in der mitochondrialen Membran lokalisierte Protein „Interferon- β promoter stimulator“ statt (IPS-1, auch VISA, CARDIF oder MAVS genannt), und von dort über Kinasen der IKK Gruppe zur Aktivierung von NF κ B, IRF3 und 7 (Kawai *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005).

Ein weiteres Molekül, das an IPS-1 bindet, ist Helicard (auch Melanoma differentiation-associated gene-5, Mda-5). Dieses Molekül ist ähnlich wie RIG-I aus einer C-terminalen dsRNA Helikase und zwei N-terminalen CARD Domänen aufgebaut (Kang *et al.*, 2002; Kovacsovics *et al.*, 2002). Die Bindung der IPS CARD Domäne ist spezifisch für RIG-I und Helicard (Kawai *et al.*, 2005), so dass RIG-I und Helicard zwei verschiedene strukturell ähnliche Moleküle darstellen, die beide durch dsRNA aktiviert an IPS-1 binden, zur Aktivierung von NF κ B, IRF3 und 7 führen und letztendlich die Freisetzung inflammatorischer Zytokine bedingen.

Ein dritter Faktor, der intrazytoplasmatische dsRNA bindet ist die RNA Helikase Lgp2. Da Lgp2 keine CARD Domäne besitzt, findet keine Signaltransduktion über IPS-1 statt. Er fungiert somit als kompetitiver Hemmstoff für RIG-I und Helicard und verhindert bzw. reguliert die Aktivierung von NF κ B, IRF3 und 7 (Rothenfusser *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2005).

1.3 Zytokine als endogene Pyrogene

Gemäß der klassischen Hypothese zum Signalweg der Fieberentstehung wird das Auftauchen von Pathogen-assoziierten Molekülstrukturen im Organismus mit der Bildung von Zytokinen beantwortet, die wiederum als eigentliche Träger der sich entwickelnden Fieberreaktion angesehen werden, und daher als endogene Pyrogene bezeichnet werden (Kluger, 1991; Roth & Blatteis, 2014). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe löslicher, hitzelabiler Proteine mit einem Molekulargewicht von bis zu 30 kD. In erster Linie gehören Interleukine (IL), Tumor Nekrose Faktoren (TNF) und Interferone (IFN), aber auch weitere Zytokine und Chemokine zu den als endogene Pyroge diskutierten Mediatoren. Von den zahlreichen Zytokinen, die bislang identifiziert wurden, kristallisierten sich einige als potentielle endogene Pyrogene heraus, da sie entsprechende Kriterien erfüllten. Diese Kriterien beinhalten, dass das vermutete endogene Pyrogen nach Stimulation mit einem exogenen Pyrogen, im Blut in

Relation zur Fieberreaktion nachweisbar sein muss. Die systemische Injektion eben dieses Zytokins sollte zu einer reproduzierbaren Fieberreaktion führen. Strategien, die zur Reduktion der Produktion oder aber zur Antagonisierung der biologischen Wirkung eines gegebenen Zytokins führen, sollten zur Abschwächung der Fieberreaktion nach Stimulation mit einem exogenen Pyrogen führen (Roth, 1996; Kluger, 1991). Gemäß dieser Kriterien wurden besonders IL-1 β , IL-6 und TNF- α als endogene Pyrogene charakterisiert. Aufgrund der Tatsache, dass sich IL-1 β trotz seiner starken pyrogenen Wirkung nach Injektion eines exogenen Pyrogens (z.B. LPS) nur in sehr geringen Konzentrationen oder aber gar nicht in der Blutbahn nachweisen lässt (Kluger, 1991; Roth & Blatteis, 2014), wurden im Rahmen dieser Arbeit die beiden anderen vermuteten endogenen Pyrogene (IL-6 und TNF- α) in Relation zum durch PIPC induzierten Fieber untersucht. Viele Fieber erzeugende Zytokine, darunter besonders TNF- α und IL-6, entfalten ihre pyrogene Wirkung über die Induktion von Enzymen, die speziell im Gehirn für eine massiv gesteigerte Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) führen (Yamagata *et al.* 2001; Mark *et al.* 2001; Rummel *et al.* 2006). PGE₂ wird als der eigentliche finale Fiebermediator angesehen und seine Rolle bei dem durch PIPC erzeugten Fieber wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. PGE₂ wird daher zusammen mit den endogenen Pyrogenen TNF- α und IL-6 in diesem Abschnitt vorgestellt.

1.3.1 TNF- α

Die Entdeckung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α erfolgte über verschiedene experimentelle Ansätze, wodurch zunächst auch unterschiedliche Bezeichnungen für diese Substanz verwendet wurden. Es wurde eine Substanz identifiziert, die im Blutserum nach Behandlung mit Endotoxin (LPS) auftauchte und bei Mäusen eine nekrotisierende Wirkung auf Hauttumore zeigte (Carswell *et al.*, 1975). Diese Eigenschaft bildete die Grundlage für die Bezeichnung „Tumor Nekrose Faktor“. Eine andere Arbeitsgruppe, die sich mit der bei zahlreichen chronischen Erkrankungen auftretenden Kachexie beschäftigte, konnte eine von Makrophagen freigesetzte Substanz identifizieren und nannte diese „Kachektin“ (Beutler *et al.*, 1986). Es stellte sich heraus, dass es sich bei beiden identifizierten Substanzen um dasselbe Molekül handelte, das in Folge aufgereinigt und kloniert wurde (Pennica *et al.*, 1984).

1.3.1.1 TNF an sich

Bei TNF- α handelt sich um ein Protein aus zunächst 233 Aminosäuren (26 kD). Nach Abspaltung von 76 Aminosäuren entsteht ein 17 kD Protein, das zu einem Trimer (51 kD) mit vielfältigen biologischen Aktivitäten polymerisiert (Tracey & Cerami, 1993). Neben dieser löslichen Form existiert auch eine membrangebundene Form des TNF- α , wobei das ebenfalls 26 kD schwere Vorläufermolekül durch ein TNF- α -converting Enzyme („TACE“), einer Zink-Metalloprotease, proteolytisch zu dem 17 kD Molekül gespalten wird (Rosendahl *et al.* 1997). TNF- α wird eine Beteiligung an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen zugeschrieben. Am wichtigsten hierbei ist seine Rolle als endogener Mediator des septischen Schocks bzw. des „Systemic Inflammatory Response Syndroms“ (SIRS). Diese funktionelle Bedeutung ergab sich anhand mehrerer Beobachtungen. So konnten viele Kardinalsymptome des septischen Schocks (Blutdruckabfall, metabolische Azidose, Organversagen, Lethalität) durch Gabe von hochdosiertem TNF- α hervorgerufen werden (Tracey *et al.* 1986). Umgekehrt war es möglich, durch passive Immunisierung gegen TNF- α Mäuse vor den lethalen Wirkungen einer LPS-Stimulation zu schützen (Beutler *et al.* 1985; Tracey *et al.* 1987). Diese klassischen Beobachtungen führten dazu, dass sich in Folge erhebliche Forschungsaktivitäten auf die biologische Bedeutung von TNF- α , gerade im Rahmen von Infektionserkrankungen, fokussierten.

1.3.1.2 Sein Rezeptor

Seine biologische Wirkung entfaltet TNF- α durch Interaktion mit seinen beiden membranständigen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Diese wurden ursprünglich gemäß ihrer Molekulargewichte auch als p55- und p75-Rezeptoren bezeichnet (Higushi & Aggarwal, 1992). Nach Bindung von TNF- α , können beide Rezeptoren unter Mitwirkung zahlreicher intrazellulärer Adapter- und Signaltransduktionsmoleküle letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und dessen Translokation in den Zellkern führen, was wiederum zur Transkription zahlreicher pro-inflammatorischer Gene führt (Goeddel, 1999). Außerdem kann nach Interaktion TNF- α mit TNFR1 über einen anderen intrazellulären Signalweg unter Mitwirkung von Caspasen Apoptose ausgelöst werden (Micheau & Tschopp, 2003). Von beiden Formen des TNF-Rezeptors gibt es auch lösliche Formen („soluble TNF-Receptors“). Diese können TNF- α binden und damit neutralisieren (Roth *et al.* 1998). Das bereits erwähnte Enzym TACE scheint nicht nur für die Umwandlung von TNF- α in seine biologisch aktive Form verantwortlich zu sein. Vielmehr sorgt es auch dafür, dass nach einer induzierten

Freisetzung von TNF- α seine Rezeptoren aus der Membran freigesetzt werden („receptor shedding“), um durch Neutralisierung von TNF- α den Organismus vor zu hohen TNF-Konzentrationen zu schützen und die Wirkdauer des Zytokins zu begrenzen (Björnberg et al., 1994; Roth *et al.*, 1998; Toellner *et al.*, 2000). Die ursprünglich vielversprechenden therapeutischen Einsatzmöglichkeiten für lösliche TNF-Rezeptoren (Evans et al. 1994; Roth *et al.* 1998; Toellner *et al.* 2000) verschoben sich zugunsten von direkt gegen TNF- α gerichtete monoklonale Antikörper („Infliximab“; Keating & Perry, 2002). Jedoch wird auch das Prinzip eines „falschen“ löslichen TNF-Rezeptors mit neutralisierenden Eigenschaften weiterhin verfolgt („Etanercept“; Jarvis & Faults; 1999).

1.3.1.3 Biologische Wirkung

Die Bedeutung von TNF- α geht weit über seine Rolle als körpereigener Mediator des septischen Schocks hinaus. Es wurde diesem Zytokin eine Beteiligung an der Pathogenese zahlreicher weiterer Erkrankungen zugesprochen. Hierzu gehören unter anderem Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen, (cerebrale) Malaria, maligne Tumore, Rheumatoide Arthritis oder Autoimmunerkrankungen (Tracey & Cerami, 1993).

Im Bezug zu experimentell erzeugten Fieberreaktionen sind die Vorstellungen zur Rolle von TNF- α nicht ganz einheitlich. Die Beobachtungen, dass man TNF- α bereits 15 min nach Injektionen von LPS im Blut von Versuchstieren nachweisen kann, dass der Peak der zirkulierenden TNF-Konzentration bereits nach 60-90 min erreicht wird, und dass seine Konzentration im Plasma danach rasch wieder absinkt, sprechen für eine Funktion dieses Zytokins bei der frühen Induktion des Fiebers (Roth et al. 1993; Jansky *et al.*, 1995). Versuche mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNF- α , löslichen TNF-Rezeptoren oder Mäusen mit defizienten TNF-Rezeptoren führten jedoch zum Teil zu widersprüchlichen Befunden. So wurden bei Mäusen, bei denen beide TNF-Rezeptoren ausgeschaltet wurden (Leon, 2002), bzw. bei Ratten, die mit TNF-Antiserum behandelt wurden (Long et al., 1990), verstärkte Fieberreaktionen nach Gabe von LPS beobachtet. Allerdings führte eine nachgewiesene Neutralisation von TNF nach LPS-Stimulation bei Meerschweinchen zu einer Abschwächung des LPS-Fiebers (Roth *et al.*, 1998). Ob TNF- α auch in der frühen Phase einer durch PIPC induzierten Fieberantwort nachweisbar ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht.

1.3.2 IL-6

Auch IL-6 wurde mehrfach unabhängig voneinander entdeckt und bezüglich der identifizierten Effekte des Zytokins ursprünglich als Interferon- β 2, B-Zell-stimulierender Faktor oder Hepatozyten-stimulierender Faktor genannt. Die beiden letztgenannten Bezeichnungen beruhen auf den Beobachtungen, dass die Substanz Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten stimuliert bzw. in Leberzellen die Bildung von Akute-Phase Proteinen induziert (Akira *et al.*, 1990). Von allen Zytokinen, die im Verlauf von Infektionen oder Entzündungsreaktionen gebildet werden, ist IL-6 dasjenige, das im Blut am längsten und in den höchsten Konzentrationen messbar ist (Roth & Blatteis, 2014).

1.3.2.1 IL-6 an sich

Bei IL-6 handelt es sich um ein Zytokin, das zunächst als Vorläufermolekül aus 212 Aminosäuren von zahlreichen Zelltypen gebildet wird, zu denen Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen, Fibroblasten, Mikroglia und Astrozyten gehören (Hirano *et al.*, 1989). Nach seiner Prozessierung erscheint IL-6 im Organismus als biologisch aktives Molekül; es besteht dann aus 184 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26 kD (Hirano *et al.* 1989; Akira *et al.* 1990).

1.3.2.2 Sein Rezeptor

IL-6 ist bezüglich seines Rezeptors Mitglied einer Familie von Zytokinen, zu der auch IL-11, Ciliary Neurotrophic Factor, Leukemia Inhibitory Factor, Oncostatin-M und Cardiotrophin-1 gehören (Kishimoto *et al.*, 1995). Diese benötigen das die Zellmembran durchspannende Glykoprotein 130 (gp130), um eine Signaltransduktion durchführen zu können. Nach Bindung von IL-6 an seine Rezeptoruntereinheit erfolgt somit die Signalübermittlung in die Zelle über zwei assoziierte gp130 Moleküle des Rezeptorkomplexes (Heinrich *et al.*, 1998). Nach Bindung von IL-6 an seiner Rezeptoruntereinheit, werden im inneren der Zelle zwei gp130 assoziierte Januskinasen (JAKs) phosphoryliert. Hierdurch wird an jeder der beiden gp130 Untereinheiten eine Bindungsstelle für ein Molekül frei, das die Bezeichnung „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“ (STAT3) erhalten hat. Die STAT3 Moleküle werden nun phosphoryliert und dimerisieren. In dieser Form bilden sie den aktiven Transkriptionsfaktor STAT3, der nun durch die Kernmembran zum Zellkern wandert und zur Transkription von Zielgenen führt (Takeda & Akira, 2000).

Auch von den Molekülen des IL-6-Rezeptorkomplexes gibt es lösliche Formen. Im Gegensatz zu den löslichen TNF-Rezeptoren, scheint der lösliche IL-6 Rezeptor verstärkende, agonistische Wirkung zu entfalten (Schöbitz et al. 1995). Lösliche IL-6-Rezeptoren entstehen entweder durch Proteolyse aus der in der Zellmembran verankerten Form („Rezeptor-shedding“) oder aber durch Sekretion nach alternativem „slicing“ der mRNA und anschließender Translation (Müllberg et al. 1993; Heinrich et al. 1998). Nach Bindung von IL-6 an seinen löslichen Rezeptor kann dieser Komplex mit den auf vielen Zelltypen vorhandenen gp130 Molekülen assoziieren und somit eine Signaltransduktion auslösen. Auch von dem Signaltransduktionsmolekül gp130 gibt es eine lösliche Form, die jedoch antagonistische Wirkung bei überschüssiger IL-6-Freisetzung zu vermitteln scheint (Müller-Newen et al., 1998).

1.3.2.3 Biologische Wirkung

Neben seiner zentralen Bedeutung im Rahmen der Akute-Phase Reaktion (Akira *et al.*, 1990), hat IL-6 besondere Bedeutung für Wachstums- und Differenzierungsprozesse bei der Blutbildung, der Immunantwort, aber auch im ZNS und gehört somit zu denjenigen Zytokinen mit hämatopoetischen und neuropoetischen Eigenschaften (Kishimoto *et al.*, 1995). Speziell die neurotrophen Eigenschaften dieses Zytokins legen eine Rolle für IL-6 als physiologischer Neuromodulator nahe, der unterschiedliche Hirnfunktionen beeinflussen kann (Jüttler et al., 2002). IL-6 nimmt im Rahmen der z.B. durch LPS induzierten „Zytokin-Kaskade“ eine Schlüsselstellung ein. TNF- α und IL-1 β , die beide sehr schnell nach einer LPS-Stimulation freigesetzt werden, können die Bildung und Freisetzung von IL-6 stimulieren. Das freigesetzte IL-6 übt wiederum als negatives „feedback“ Signal eine hemmende Wirkung auf die Produktion von TNF- α und IL-1 β aus (Schindler *et al.*, 1990).

Die Rolle von IL-6 als endogenes Pyrogen im Rahmen von (meistens durch LPS) experimentell erzeugtem Fieber wurde intensiv untersucht und diskutiert (Kluger, 1991; Conti *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2004b). Die Evidenz für eine Bedeutung dieses Zytokins als essentieller körpereigener Fiebermediator lässt sich wie folgt kurz zusammenfassen. Von allen während des Fiebers im Blut nachweisbaren Zytokinen korreliert zirkulierendes und im Gehirn nachweisbares IL-6 am besten mit dem Fieberverlauf (LeMay *et al.*, 1990; Roth et al., 1993; Roth *et al.* 1994a; Roth *et al.* 1994b). Behandlung mit neutralisierenden IL-6-Antikörpern schwächt das durch LPS erzeugte Fieber deutlich ab (Cartmell *et al.*, 2000; Rummel *et al.* 2006; Harden et al., 2011). IL-6-defiziente („knockout“) Mäuse entwickeln nach Injektion von LPS kein Fieber (Chai et al. 1996). Eine reduzierte Fieberreaktion wurde

auch bei Mäusen festgestellt, bei denen der IL-6-Rezeptor im Hirnendothel ausgeschaltet wurde (Eskilsson et al., 2014). Zwar lässt sich durch periphere Injektion von spezie-spezifischem IL-6 lediglich ein moderates Fieber erzeugen (Harré et al., 2002; Rummel et al. 2006), Mikroinjektion von IL-6 in das zerebrale Ventrikelsystem rufen jedoch robuste Fieberantworten hervor (LeMay et al., 1990; Lenczowski et al., 1999). IL-6 wird daher auch oft als „zentral wirksames endogenes Pyrogen“ bezeichnet (Conti et al., 2004; Roth et al. 2004b; Roth & Blatteis, 2014). Die Untersuchung der endogenen Bildung und Freisetzung von IL-6 nach Stimulation mit PIPC beinhaltete einen Teilaspekt der vorliegenden Arbeit.

1.3.2.4 Prostaglandine

Zytokine wie TNF- α und IL-6 erzeugen Fieber über eine induzierte Bildung von Prostaglandinen (PG). PG gehören zusammen mit den Thromboxane und Leukotrienen zu den Eikosanoiden, einer Gruppe von Gewebeshormonen, die aus Arachidonsäure gebildet werden. Diese wird durch das Enzym Phospholipase-A₂ (PLA₂) aus Phospholipiden der Zellmembranen freigesetzt. Diese Fettsäurekette wird unter dem Einfluss von Lipooxygenasen zu den linear aufgebauten Leukotrienen umgewandelt.

Prostaglandine und Thromboxane hingegen enthalten einen 5 bzw. 6 gliedrigen Ring. Die Umsetzung der Arachidonsäure zu diesen zyklischen Molekülen erfolgt über die Zwischenschritte zu PGG₂ und PGH₂, der von den Cyclooxygenasen (COX) vollzogen wird. Je nachdem auf welche Weise die Sauerstoff-Sauerstoff Bindung dieses Endoperoxids durch terminale Prostaglandin-Synthasen geöffnet wird, entstehen die verschiedenen Prostaglandine (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂) oder Thromboxane A_{2 α} (Samuelsson, 1983).

Als Rezeptoren fungieren die sogenannten Prostaglandinrezeptoren, die durch ein P gekennzeichnet sind, dem der Kennbuchstabe des jeweiligen Prostaglandins vorangestellt wird (z.B. EP) gefolgt von der Nummer des jeweiligen Rezeptorsubtyp (z.B. EP1-4). Bei diesen handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sich aufgrund ihrer Signaltransduktion in drei Gruppen einteilen lassen. EP1 erhöht den intrazellulären Ca²⁺ Spiegel, die Rezeptoren EP2 und EP4 die cAMP Freisetzung. Ligandenbindung am EP3 hingegen hemmt die cAMP Bildung.

Am Entzündungsgeschehen sind insbesondere PGE₂ und PGI₂ beteiligt (Higgs *et al.*, 1978; Mních *et al.*, 1995; Portanova *et al.*, 1996; Murata *et al.*, 1997). Beide Prostaglandine bewirken eine Herabsetzung der Aktivierungsschwelle nozizeptiver Nervenendigungen (Ferreira *et al.*, 1978; England *et al.*, 1996; Stock *et al.*, 2001), eine erhöhte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation, aber auch Vasokonstriktion in Abhängigkeit von der

Verteilung der EP-Rezeptorsubtypen (FitzGerald *et al.*, 1983). Die vasodilatative Wirkung von PGE₂ ist bei einer Reihe weiterer physiologischer Prozesse beteiligt. In der Niere fördert es beispielsweise den renalen Blutfluss, ebenso wird die Durchblutung der Magenwand gefördert. Gleichzeitig bewirkt es eine Verringerung der Säureproduktion und eine Förderung der Schleimproduktion des Magens.

Daneben wirkt PGE₂ auf Zellen des Immunsystems als negative Rückkoppelung, indem es hemmend auf die Zytokinproduktion und die Aktivität dieser Zellen wirkt (Roth *et al.*, 2002). In der Fieberentstehung nimmt PGE₂ eine wichtige Rolle ein. Warm-sensitive Neurone des anterioren Hypothalamus verringern ihre Impulsrate als Reaktion auf PGE₂, temperaturinsensitive Neurone zeigen dagegen eine Erhöhung (Ranelis & Griffin, 2003). Die warm-sensitiven Neurone reagieren somit auf PGE₂ wie auf eine niedrigere Temperatur und bewirken so eine Anhebung der oberen Grenze des Sollwertes. Warm-sensitive Neurone werden von temperaturinsensitiven Neuronen überwiegend inhibitorisch beeinflusst (Griffin *et al.*, 2001). Deren Anstieg in der Impulsrate in Folge der PGE₂ Gabe könnte also die Verringerung der Impulsrate der warm-sensitiven Neurone verstärken. Außerdem wird für die Neurone, die die Wärmeabgabe kontrollieren, eine inhibitorische Beeinflussung durch temperaturinsensitive Neurone vermutet (Hammel, 1965). Der Anstieg des inhibitorischen Einflusses könnte so die Wärmeabgabe verringern. Somit stellt PGE₂ ein bedeutendes Signal in der zentralen Einstellung des thermoregulatorischen Sollwertes dar; ein Anstieg der PGE₂ Konzentration in der präoptischen Region kann Fieber bewirken.

Die Verhinderung der Prostaglandinsynthese durch Cyclooxygenaseinhibitoren ist ein seit mehreren Jahrtausenden praktiziertes Konzept der Fiebersenkung (Jack, 1997). 1971 konnte gezeigt werden, dass die Hemmung dieses Enzyms und damit die Verhinderung der Prostaglandinsynthese die Wirkungsweise nicht steroidaler Antiphlogistika (NSAID) darstellt (Vane, 1971). Mikroinjektionen eines nichtsteroidalen Antiphlogistikums in die anteroventrale präoptische Region verringern die Fieberreaktion durch Lipopolysaccharide (LPS, Kap. 1.2.2) (Scammell *et al.*, 1998). Prostaglandin Injektionen in die präoptische Region oder die Gehirnv ventrikel bewirken dagegen rapide Anstiege der Körpertemperatur (Milton & Wendlandt, 1970; Feldberg & Saxena, 1971a, b; Milton & Wendlandt, 1971; Nakamura *et al.*, 2002; Oka, 2004). Während der Fieberreaktion können erhöhte Prostaglandinspiegel in der präoptischen Region und den Gehirnv entrikeln gemessen werden (Coceani *et al.*, 1983; Sirko *et al.*, 1989). Im POA reagierten die Regionen OVLT, MnPO, MPO und VMPO besonders sensibel auf PGE₂ mit Erhöhung der Körpertemperatur (Scammell *et al.*, 1996). Der hierfür verantwortliche Rezeptor konnte durch Knock-out Mäuse

als EP3 identifiziert werden (Ushikubi *et al.*, 1998). Der Rezeptor EP3 findet sich über das gesamte Gehirn unterschiedlich intensiv verteilt. Zu den Regionen mit starker Expression von EP3 gehören die thermointegrativen Nuclei MnPO und MPO. Dem efferenten Fiebersignal folgend sind weiter „Stromabwärts“ im DMH, PVN und Raphe magnus, Raphe obscurus und Raphe pallidus Nuclei ebenfalls EP3-Rezeptoren nachweisbar (Nakamura *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2000). Zellen der präoptischen Region exprimieren über Stimulation mit IL-6 das Enzym COX-2 (Rummel *et al.*, 2006). Hierbei spielen Hirndothelzellen eine entscheidende Rolle (Eskilsson *et al.*, 2014; Wilhelms *et al.*, 2014).

Zusammenfassend ergibt sich eine starke Unterstützung für die Vorstellung, dass das Fiebersignal in der präoptischen Region unter anderem durch Zytokine die PGE₂ Synthese bewirkt. Das freigesetzte PGE₂ hemmt inhibitorische Neurone in MPO und MnPO, die unter physiologischen Bedingungen verhindern, dass Neurone vor allem in DMH die Thermogenese stimulieren (Morrison & Nakamura, 2019).

1.3.3 Beeinflussung von Zielzellen

Um nach peripherer Injektion eines exogenen Pyrogens (hier: PIPC) eine Aktivierung von Gehirnstrukturen nachzuweisen, die in direktem Zusammenhang mit der Fieberentstehung stehen, benötigt man geeignete inflammatorisch induzierte Aktivierungsmarker. Diese sollten in Zellen von Gehirnstrukturen, die nach peripherer Injektion von PIPC zur Fieberentstehung beitragen könnten, sichtbar gemacht werden können. Im Rahmen anderer Fiebermodelle, in denen LPS oder mykoplasmale Lipopeptide als exogene Pyrogene herangezogen wurden, hatten sich hierfür der Transkriptionsfaktor STAT3 und das induzierbare Enzym zur Prostaglandinsynthese COX-2 als besonders geeignet herausgestellt (Harré *et al.*, 2002; Harré *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004; Rummel *et al.*, 2005a; Rummel *et al.*, 2005b; Rummel *et al.*, 2006; Knorr *et al.*, 2008; Knorr *et al.*, 2010; Welsch *et al.*, 2012). Diese beiden Moleküle sollten daher auch im Rahmen dieser Studie zum Nachweis einer direkten Aktivierung von Gehirnzellen bzw. Gehirnstrukturen nach Stimulation der Versuchstiere mit PIPC eingesetzt werden.

1.3.3.1 STAT 3

IL-6 hat eine besondere Bedeutung als zirkulierendes endogenes Pyrogen nach experimenteller Stimulation mit unterschiedlichen exogenen Pyrogenen (siehe: Abschnitt

1.3.2.3; Roth et al., 2004a; Roth et al., 2004b). Die Translokation des IL-6-induzierten Transkriptionsfaktors STAT3 in die Kerne von denjenigen Gehirnzellen, die durch zirkulierendes IL-6 erreicht werden können, ist mittels Immunzytochemie sehr gut nachweisbar. So konnte nach Injektion von LPS bei mehreren Spezies von Versuchstieren gezeigt werden, dass speziell in Gehirnstrukturen mit unvollständiger Blut-Hirn Schranke (den CVOs, siehe Abschnitt 1.1.2.2), eine Anreicherung von STAT3 besonders in Astrozyten nachweisbar ist. STAT3 eignet sich somit hervorragend als inflammatorischer Aktivierungsmarker im ZNS im Verlauf systemischer Entzündungsreaktionen. Neben den CVOs stellten sich Endothelzellen von Blutgefäßen sehr unterschiedlicher Hirnregionen als Zielstruktur für zirkulierendes IL-6 heraus (Rummel et al., 2005b; Rummel et al., 2006; Eskillson et al., 2014). Ob sich eine derartige IL-6-vermittelte Aktivierung von Gehirnzellen auch nach Stimulation mit PIPC nachweisen lässt, war Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen.

1.3.3.2 COX-2

Als Folge der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und STAT3, findet im Gehirn die vermehrte Expression und Bildung von COX-2 statt. COX-2 ist zusammen mit mPGES-1 für die Bildung größerer Mengen an PGE₂ im Gehirn, und damit letztendlich für die Ausbildung einer Fieberreaktion zuständig (Roth & Blatteis, 2014). Eine Visualisierung von COX-2 im Gehirn, die unter basalen (nicht-inflammatorischen) Bedingungen dort kaum nachweisbar ist, wäre somit ein hervorragender inflammatorischer Aktivitätsmarker in Bezug zur Fieberreaktion. In einigen Studien gelang es in der Tat, mittels Immunzytochemie die Bildung von COX-2 besonders in Hirnendothelzellen nachzuweisen, auch im Bereich der zur Fieberentstehung besonders wichtigen POA (Matsumura et al., 1998; Yamagata *et al.*, 2001; Konsman *et al.* 2004; Knorr *et al.*, 2010). Diese Studien wurden alle bei der Spezies Ratte durchgeführt, was dadurch möglich war, dass ein Antikörper gegen die COX-2 der Ratte verfügbar ist. Einen Antikörper gegen die COX-2 der Spezies Meerschweinchen gibt es jedoch nicht. Um dennoch eine mögliche Induktion der Expression von COX-2 in den Gehirnen PIPC-behandelter Meerschweinchen durchführen zu können, wurde die Methode der *in situ* Hybridisierung eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.4). Mit Hilfe dieser Methode konnte sowohl bei Ratte (Cao *et al.*, 1995) als auch beim Meerschweinchen (Rummel et al. 2005a) die Induktion von COX-2 auf mRNA-Ebene in LPS-behandelten Tieren in Gehirnschnitten nachgewiesen werden. Somit stand diese Methode auch zur Verfügung, um in relevanten

Gehirnarealen eine Induktion der COX-2 bei Meerschweinchen auch nach Stimulation mit PIPC nachzuweisen.

1.4 Toleranzerscheinungen gegenüber Pyrogenen

Das Phänomen der Entwicklung einer Toleranz gegenüber exogenen Pyrogenen wurde erstmals 1947 für LPS beschrieben (Beeson, 1947), dessen Struktur damals noch nicht bekannt war, und das daher als „Endotoxin“ bezeichnet wurde. Prinzipiell ist unter einer Toleranz gegenüber fiebererzeugenden Substanzen eine vorübergehende Phase reduzierter Responsivität des Organismus nach einer erstmaligen Stimulation mit dem Pyrogen zu verstehen (Zeisberger & Roth, 1998). So führt beispielsweise die Vorbehandlung mit einer nicht-letalen LPS-Dosis dazu, dass eine ansonsten letale Dosis nicht mehr zum Tod von Versuchstieren führt (Liu *et al.*, 2018). Mit Bezug zur Fieberreaktion bedeutet dies, dass sich das Fieber gegenüber wiederholten LPS-Injektionen in kurzen Zeitabständen progressiv abschwächt (Roth *et al.* 1994; Rosenthal *et al.*, 1996). Während dieses Phänomen einer Toleranzentwicklung für LPS sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unter Verwendung von kultivierten Makrophagen reproduzierbar in zahlreichen Spezies nachgewiesen und beschrieben wurde (Zeisberger & Roth, 1998; Liu *et al.*, 2018), sind andere exogene Pyrogene / TLR-Agonisten diesbezüglich nur wenig untersucht. Hierbei handelt es sich um einzelne Studien mit Muramyl-Dipeptid (MDP, eine Studie), Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1 (FSL-1, eine Studie) und PIPC (zwei Studien). Die hierbei beschriebenen Daten ergaben folgendes Bild. Gegenüber wiederholten Injektionen von MDP schwächte sich lediglich eine späte Phase der relativ langen Fieberreaktion ab (Soszynski *et al.*, 1991; Roth *et al.*, 1997b). Wiederholte Injektionen von PIPC führten bei Kaninchen zu keiner Toleranz bezüglich des Fiebers (Soszynski *et al.*, 1991), bei Meerschweinchen kam es zu einer vorübergehenden Toleranz nach der dritten Injektion des Pyrogens, die nach weiteren Injektionen wieder verschwand (Cooper *et al.*, 1988). Keine Abschwächung des Fiebers wurde beim Vergleich der Reaktion auf fünf i.a. Injektionen von FSL-1 in Abständen von jeweils drei Tagen beobachtet (Greis *et al.*, 2009). Wurde FSL-1 jedoch nach demselben zeitlichen Schema i.p. injiziert, manifeste sich eine moderate Toleranzentwicklung bis zur dritten Injektion des Pyrogens, die danach offenbar wieder aufgehoben wurde (Greis *et al.*, 2009).

In einigen Untersuchungen zur Toleranzentwicklung gegenüber exogenen Pyrogenen wurden parallel zur Fieberentwicklung auch die zirkulierenden Zytokine TNF- α und IL-6 gemessen. Hierbei ergaben sich besonders für LPS, aber in gewissem Umfang auch für MDP und FSL-1,

sehr gute Korrelationen zwischen der Abschwächung des Fiebers und der reduzierten Bildung der genannten Zytokine (Roth *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1997b; Greis *et al.*, 2009). Für PIPC lagen experimentelle Studien zur Bildung von Zytokinen nach wiederholten Injektionen des Pyrogens noch nicht vor. Derartige Messungen sollten daher im Rahmen dieser Arbeit erstmals durchgeführt werden.

Die meisten Studien zur Toleranzentwicklung gegenüber LPS, aber auch anderer exogener Pyrogene, stammen aus der Zeit vor der Beschreibung und Charakterisierung der TLRs und ihrer Signalwege. Somit wurden als erste Versuche zur Erklärung der molekularen Mechanismen speziell der Endotoxin-Toleranz zunächst eine Einschränkung der Stabilität der Zytokin-mRNA bei wiederholter Stimulation mit LPS sowie die Beteiligung eines labilen Transkriptions-Repressormoleküls herangezogen (Knopf *et al.*, 1994; LeRue & McCall, 1994). Heute sehen die Vorstellungen zur Erklärung der molekularen Mechanismen der Endotoxin-Toleranz gänzlich anders aus. Von einer Arbeitsgruppe wurde die Unterdrückung der Expression des LPS-Rezeptors TLR4 als Mechanismus zur Entstehung der Endotoxin-Toleranz vorgeschlagen (Nomura *et al.*, 2000). Für diese Hypothese konnten jedoch keine Belege in weiteren Studien dokumentiert werden. Wie bereits in Abschnitt 1.2 ausgeführt führt die Aktivierung von TLR4 durch LPS über eine Reihe von extra- und besonders intrazellulären Adaptermolekülen letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Nach Translokation in den Zellkern sorgt NFκB für die Transkription von inflammatorischen Zielgenen, zu denen auch TNF-α und IL-6 gehören (Zeisberger & Roth, 1998; Biswas & Lopez-Collazo, 2009). NFκB besteht aus zwei Untereinheiten, die normalerweise bevorzugt ein Heterodimer bilden (p50/p65). Mehrere Studien zeigten, dass im Zustand der LPS-Toleranz zu einer Verschiebung der Zusammensetzung von NFκB vom Heterodimer p50/p65 hin zu einer homodimeren Form p50/p50 kommt (Ziegler Heitbrook *et al.*, 1994; Ziegler Heitbrook, 1995). Dieser Wechsel in der Zusammensetzung dieses Transkriptionsfaktors soll dazu führen, dass nach seiner Translokation in den Zellkern die Transkription anti-inflammatorischer Zytokine (IL10) verstärkt wird, die Expression von Zytokinen mit pro-inflammatorischen Zytokinen dagegen reduziert wird (Frankenberger *et al.*, 1995).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die fiebererzeugenden Eigenschaften von PIPC, einer synthetischen doppelsträngigen RNA, untersucht werden. Besonderes Augenmerk

wurde hierbei auf die Abhängigkeit der fiebererzeugenden Potenz von der Art der Applikation gelegt. Hierzu sollten die Effekte von intra-arteriellen (i.a.), intra-peritonealen (i.p.), intramuskulären (i.m.) und subkutanen (s.c.) Injektionen von PIPC im Bezug zur Fieberreaktion und den begleitend auftretenden zirkulierenden Konzentrationen der endogenen Pyrogene TNF- α und IL-6 analysiert werden.

Die nächste zu untersuchende Fragestellung beschäftigte sich einer möglichen Toleranzentwicklung gegenüber in relativ kurzen Zeitabständen wiederholten Injektionen von PIPC. Diese Thematik hat wegen der potentiellen therapeutischen Einsatzmöglichkeiten von TLR-Agonisten als Adjuvantien z.B. bei pharmakologischer Tumorbekämpfung besondere Bedeutung gewonnen (Wiegand, 2012). Als Endpunktparameter zur Charakterisierung einer möglichen Toleranzentwicklung bei wiederholter Gabe von PIPC wurden wiederum die Stärke der begleitend auftretenden Fieberreaktionen und die Konzentrationen von TNF- α und IL-6 im Blutplasma herangezogen.

Schließlich wurde die Beeinflussung von Gehirnstrukturen auf zellulärer Ebene nach Stimulation mit PIPC untersucht. Hierzu wurde die Aktivierung des IL-6-induzierten Transkriptionsfaktors STAT3 anhand seiner Translokation in Zellkerne bestimmter Hirnstrukturen nach Stimulation mit PIPC mittels immunzytochemischer Methoden analysiert. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Expression von COX-2 in den Gehirnen PIPC-behandelten Versuchstiere. Letztgenannter Versuchsansatz wurde durch die Untersuchung des PIPC-induzierten Fiebers unter dem Einfluß eines nicht-selektiven COX-Inhibitors bzw. eines spezifischen COX-2-Inhibitors supplementiert.

Die durchgeführten Untersuchungen beinhalteten somit eine umfassende Charakterisierung des TLR3 Agonisten PIPC als exogenes Pyrogen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

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

Brutschrank NuAire US Autoflw Modell No. Nu 4500E (NuAire, Plymouth MN., USA)

Computer: IBM kompatible Pentiumrechner

Macintosh Performa 5200 (Apple Computer Inc., Cupertino CA., USA)

Elisa – Reader DigiScan 340T (ASYS Hitech GmbH, A- Eugendorf)

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, D- Hamburg) mit Quecksilber-Hochdrucklampe (HBO[®] 100W/2, Osram, D- Augsburg), digitaler schwarz-weiß Kamera (Spot Insight, Diagnostic Instruments - Visitron Systems, D- Puchheim) und dazu gehöriger Software (Spot Insight Software, Diagnostic Instruments, Michigan, USA)

Gefriermikrotom (Modell 1205, Jung, D- Heidelberg)

Kryostat Typ HM 500 O (Microm GmbH, D- Walldorf)

Lötkolben LS DIGI 60 (Conrad Electronic GmbH, D- Hirschau)

Microflow biological safety cabinet (Bioquell UK Ltd., UK- Andover)

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

Pipetten (1000, 500, 200, 100, 50, 20, 100-1000, 10-100, 2-10, 0,5-2 µl) (Eppendorf AG, D- Hamburg)

Schüttler (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)

Telemetrieanlage:

Sender (Transmitter PDT-4000 E-Mitter, Mini Mitter Company Inc., Sunriver Or., USA)

Empfänger (ER-4000 Receiver, Mini-Mitter Company Inc., Sunriver OR. USA)

Tierkäfige (Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, D-Emmendingen)

Tischrühr- und Heizgerät Combimag (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)

Ultraschallgerät Transsonic T460H (Elma, D-Singen-Hohentwiel)

Vortexer Typ VF2 (Jahnke& Kunkel GmbH&Co KG, D- Staufen im Breisgau)

Waagen:

Mettler P1210N (Mettler Toledo, D- Gießen)

Sartorius universal (Sartorius AG, D- Göttingen)

Wolfram-Glühdraht

Zentrifuge Digifuge G1 (Heraeus GmbH, D- Hanau)

Zentrifuge 5414S (Eppendorf AG, D- Hamburg)

2.1.2 Gebrauchsmaterial

Computerprogramme:

Adobe Photoshop, Version 7.0 (Adobe Systems GmbH, D- Unterschleißheim)

GraphPad Prism, Version 3.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA)

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

SigmaPlot 2000, Version 6.0 (Jandel Scientific, Corte Madera CA, USA)

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

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

VitalView 3.1 (Mini Mitter Company, Inc. OR, USA)

Färbeküvetten (MAGV, D- Rabenau-Londorf)

Inkubationskammern- Instrumentenbehälter(Eickemeyer, D- Tuttlingen)

Laborglas (SCHOTT Duran GmbH & Co. KG, D- Mainz)

Objektträgerracks (MAGV, D- Rabenau-Londorf)

Objektträgermappen (MAGV, D- Rabenau-Londorf)

Operationsbesteck (Aesculap- Werke AG, D- Tuttlingen)

Plexiglasplatten für Immunhistochemie (W. G. Kerckhoff-Institut, D- Bad Nauheim)

Polycarbonat Karussells mit acht Sektoren (institutseigene Herstellung)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Aluminiumfolie

Altromin Animal-Bedding -Fibre- (Altromin GmbH, D- Lage-Lippe)

Ascorbinsäure-Pulver, Ph. Eur. 1 (AGA Med, D- Gießen)

Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Hoffmann- La Roche, D- Grenzach-Wyhlen)

50 ml Cent tube PP Zentrifurenröhrchen (Nunc A/S, DK- Roskilde)

Cutasept® F Haut Antiseptikum (Bode Chemie, D- Hamburg)

Deckgläschen 24 x 50 mm (Menzel GmbH, D- Braunschweig)

Einmalkanülen Sterican® 0,45 x 12 mm, 26 G (Braun, D- Melsungen)

Einwegspritzen 1ml (BD Plastipak™, Becton-Dickinson, D- Heidelberg)
Hansaplast® Sprühpflaster (Beiersdorf AG, D- Hamburg)
Mersilene® SH1_{-plus} 1,5 metric, chirurgische Nadel-Fadenkombination (ETHICON,
D– Norderstedt)
Objektträger 76 x 26 mm (Menzel GmbH, D- Braunschweig)
Parafilm® (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
Pelletiertes Meerschweinchen Zuchtfutter Altromin 3113(Altromin GmbH, D- Lage-Lippe)
Pipettenspitzen (Greiner BIO ONE GmbH, D- Frickenhausen)
Polyethylenkatheter (PE– 10, Ref. 800/140/100, Fa. Portex Ltd, Kent England)
Polytetrafluoroethenrohr PTFE (Teflon®)
PS Röhrenchen, steril 12 ml (Greiner BIO ONE GmbH, D- Frickenhausen)
Reaktionsgefäße 1,5ml (Sarstedt AG &Co., D- Nümbrecht)
Vicryl®, 1,5 metric, chirurgisches Nahtmaterial (ETHICON, D– Norderstedt)
Weck Visistat® Hautklammergerät (Teleflex Medical GmbH, D- Kerne)

2.1.4 Reagenzien und Lösungen

2.1.4.1 Injektionen

Antisedan® (Atipamezolhydrochlorid, Pfizer GmbH, D-Karlsruhe)
Diclofenac (Diclofenac Sodium, Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego CA, USA)
Dimethyl Sulfoxid DMSO Hybri-Max® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
Domitor® (Medetomidinhydrochlorid, Pfizer GmbH, D-Karlsruhe)
Ethanol absolut (RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, D- Seelze)
Heparin (Heparin-Natriumlösung Liquemin® N25000, Hoffmann-La Roche AG, D-
Grenzach-Wyhlen)
Recombinant Rat IFN- α (BioSource International Inc., Camarillo CA, USA)
Recombinant Rat IFN- γ (BioSource International Inc., Camarillo CA, USA)
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, Pharmacia Upjohn, D-Erlangen)
Metacam® (Meloxicam, Boehringer Ingelheim GmbH, S-Basel)
Narkoren® (Bentobarbital, Boehringer Ingelheim GmbH, S-Basel)
Nimesulide (Cayman Chemical Company, Ann Arbor MI, USA)
Polyinosinic-polycytidylic acid, PIPC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
Pyrogenfreie physiologische Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen)

2.1.4.2 Zytokinanalytik

Actinomycin D (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Lösung

Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert (PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe)

Gentamycin (Biochrom AG, D-Berlin)

L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe)

IL-6 Standard (Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Großbritannien)

2-Mercaptoethanol (Merck KGaA, D-Darmstadt)

2-Propanol, Isopropanol (Merck KGaA, D-Darmstadt)

Penicillin-Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe)

RPMI Medium 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe)

Salzsäure, HCl 2M (Merck KGaA, D-Darmstadt)

TNF Standard (Referenz-Code 88/532, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Großbritannien).

Trypsin, UV inaktiviert (PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe)

2.1.4.3 Immunhistochemie

Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (MoBiTec GmbH, D- Göttingen)

Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-sheep IgG (MoBiTec GmbH, D- Göttingen)

Anti rabbit IgG – Biotin conjugated AffiniPure Goat anti rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA)

Citifluor AF1 Einbettmedium (Citifluor Ltd, UK- Leicester)

Cy3-gekoppeltes Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove PA, USA)

4',6-Diamidino-2-Phenyindol, Dilactat, DAPI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)

Diaminobenzidin Tetrahydrochloride, DAB (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)

Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 (Merck KGaA, D-Darmstadt)

Entellan[®] (Merck KGaA, D-Darmstadt)

Essigsäure 100%, Eisessig (Merck KGaA, D-Darmstadt)

Gelatine (Serva Feinbiochemica, D- Heidelberg)

GFAP Antikörper – anti glial fibrillary acidic protein made in mouse (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)

Histo-Clear[™] (National Diagnostics, Atlanta GA, USA)

Kresylviolettacetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4 (Merck KGaA, D-Darmstadt)
NeuN Antikörper – anti neuronal specific nuclear protein made in mouse (MoBiTec GmbH, D-Göttingen)
Normal horse serum NHS (PAA Laboratories GmbH, A-Linz)
Paraformaldehyd, PFA (Merck KGaA, D-Darmstadt)
Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
Saccharose (Merck KGaA, D-Darmstadt)
Stat3 Antikörper - anti Stat-3; rabbit polyclonal IgG made in rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz-CA, USA)
Tissue Tek[®] (Leica Instruments GmbH, D-Nussloch)
t- Octylphenoxypolyethoxyethanol, Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
Trockeneis (Balsler, D-Lich)
Tyramin Amplifizierungs Kit TSA[™] Biotin System NEL 700 (NEN[™] Life Science Products Inc., Boston MA, USA)
Vectastain Elite Avidin Biotin Kit (ABC Kit- Standard), (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA)
vWF Antikörper (anti- van Willebrand Faktor made in sheep; Haemochrom Diagnostica GmbH, D-Essen)
Wasserstoffperoxyd 30% (Merck-Schuchardt OHG, D- Hohenbrunn)
Xylol (Merck KGaA, D-Darmstadt)

2.1.4.4 In situ Hybridisierung

50 % deionisiertes Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
5 x Denhardts Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
10 % (w/v) Dextransulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
25 mM EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
250 µg/ml Heringsperma DNA
Hybridisierungs- Puffer, (Boehringer, D-Mannheim)
Hypam, Fixierer (Ilford, UK- Cheshire)
Kodak BioMax Detektionsfilm (Kodak Amersham, D- Freiburg)
0,75 M NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)
Phenisol, Entwickler (Ilford, UK- Cheshire)

25 mM PIPES (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)

0,2 % (w/v) SDS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)

SSC, Standard Saline Citrate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim)

Sonden 7,5-10 x 10⁵ cpm/ul je Oligonukleotid (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)

2.1.5 Verwendete Lösungen, Puffer und Antikörper

2.1.5.1 NaCl

Physiologische Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) diente bei den Perfusionen dazu, das im Körper vorhandene Blut möglichst vollständig zu verdrängen.

2.1.5.2 Phosphatpuffer

Für alle Wasch- und Inkubationsschritte des immunhistochemischen Protokolls stellte 0,1 M Phosphatpuffer die Grundlage dar. Der Phosphatpuffer (PB) wurde aus Stocklösungen einer 0,2 M/l Dinatriumhydrogen-Phosphat (Na₂HPO₄)- und einer 0,2 M/l Natriumdihydrogen-Phosphat (NaH₂PO₄)-Lösung in Aqua bidest hergestellt. Die Stocklösungen konnten bei Raumtemperatur (RT) gelagert werden. Durch Mischung der beiden Stocklösungen (720 ml NaH₂PO₄ und 280 ml Na₂HPO₄) wurde ein 0,2 molarer PB erhalten, welcher mit der gleichen Menge Aqua bidest (1 l) auf eine Molarität von 0,1 M/l verdünnt wurde. Der gewünschte pH-Wert zwischen 7,2 – 7,4 wurde mit pH Indikatorpapier kontrolliert. Der PB wurde immer direkt vor den entsprechenden Versuchen frisch angesetzt.

2.1.5.3 Paraformaldehyd-Lösung

Für die Immunhistologie ist die Belassung des Antigens in seiner natürlichen Umgebung und in seiner natürlichen Konformation von entscheidender Bedeutung. Um dies zu gewährleisten, wurde das Gewebe fixiert, um die Antigene vor der anschließenden chemischen sowie physikalischen Behandlung zu schützen. Die Wirkung des Fixationsmittels Paraformaldehyd beruht auf der Kreuzvernetzung reaktiver Gruppen in Polypeptidketten von Proteinen. Die PFA-Lösung wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch angesetzt. Um eine 4 % PFA-Lösung zu erhalten, wurde zunächst eine entsprechende Menge Paraformaldehyd unter dem Abzug abgewogen und unter Rühren in PB gelöst. Nachdem die Lösung auf 60 °C erhitzt worden war, wurde gerührt bis sich das PFA vollständig gelöst hatte und die Lösung klar war. Abschließend wurde die PFA-Lösung filtriert und auf Eis auf 4 °C gekühlt.

Die 4 % PFA Lösung wurde für Perfusionen eingesetzt, bei denen die Gehirne nach der „free floating Methode“ behandelt wurden.

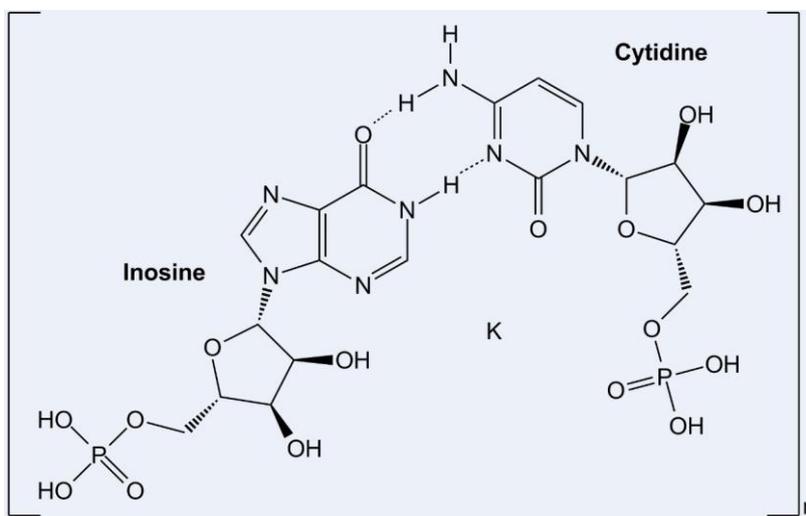
Bei den Mehrfachmarkierungen kam 2 % PFA als Immersionsfixierung zum Einsatz, mit welcher die bereits auf Objektträgern aufgebrauchten Gehirnschnitte fixiert wurden.

2.1.5.4 Saccharose

Die Saccharose diente zum Auswaschen der Fixationslösung sowie zur Kryoprotektion der Gewebeproben, bevor diese eingefroren wurden. Grundlage der 20 % Saccharoselösung war ebenfalls der PB. Saccharose wurde in einer entsprechenden Menge abgewogen und unter Rühren zum PB gegeben. Nach der vollständigen Auflösung der Saccharose wurde die Lösung bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.1.5.5 Polyinosinic-polycytidylic acid (PIPC)

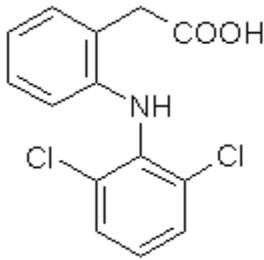
Die Reinsubstanz wurde in pyrogenfreier physiologischer Kochsalzlösung gelöst und in Aliquots von 1000µg/1000µl bei -40°C gelagert. Direkt vor den einzelnen Versuchen wurde die PIPC- Lösung aufgetaut.



Der Buchstabe „n“ hinter der Klammer deutet an, dass es sich bei PIPC um ein Molekül von vergleichsweise hohem Molekulargewicht handelt. Je nach Präparation setzt sich das Molekül aus 1000-6000 Nukleotiden zusammen. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde die gleiche Charge PIPC verwendet.

2.1.5.6 Diclofenac

5 mg Diclofenac wurden in 1ml Solvent (Diclofenac) gelöst



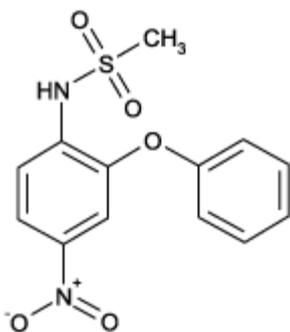
Diclofenac wurde als unspezifischer Inhibitor der Cyclooxygenase verwendet, da sowohl die konstitutive Form Cox-1 als auch die induzierbare Form COX-2 in ihrer Funktion gehemmt wird und Diclofenac sich als potentes Antipyretikum beim Meerschweinchen bewährt hat (Roth *et al.*, 2002; Rummel *et al.*, 2005a). Der Index der Cyclooxygenase (COX)-2 Selektivität (COX-2/COX-1 Ratio) der Prostaglandinsynthese, errechnet aus dem Verhältnis der IC₅₀-Werte für die beiden Enzymvarianten, beträgt bei peritonealen Meerschweinchenmakrophagen 2,2 (Engelhardt *et al.*, 1996). Mit anderen Zellarten (bovine Endothelzellen aus der Aorta, bzw. murine Makrophagen) ergab sich eine COX-2/COX-1 Ratio von 0,7 (Mitchell *et al.*, 1993).

2.1.5.7 Solvent (Diclofenac)

Als Lösungsmittel für Diclofenac kam pyrogenfreie Kochsalzlösung und Ethanol in einem Volumenverhältnis von 20:1 zum Einsatz.

2.1.5.8 Nimesulide

5 mg Nimesulide (N-(4-nitro-2-phenoxyphenyl)-Methansulfonamid) wurden in 1ml Solvent (Nimesulide) gelöst



Nimesulide wurde verwendet um die induzierbare Form der Cyclooxygenase, die COX-2, selektiv zu hemmen, bei möglichst geringer Beeinflussung der Cox-1. Der Index der COX-2 Selektivität (COX-2/COX-1 Ratio) wird abhängig von dem verwendeten Assay mit Werten zwischen 0,76 und 0,0004

angegeben (Grossman *et al.*, 1995; Huff *et al.*, 1995; Famaey, 1997). Nimesulide kann daher zu den relativ selektiven COX-2 Inhibitoren gezählt werden.

2.1.5.9 Solvent (Nimesulide)

Nimesulide wurde in pyrogenfreier physiologischer Kochsalzlösung mit 10% Dimethyl Sulfoxid (DMSO) gelöst. Um den Lösungsprozess zu unterstützen, wurde eine 5minütige Behandlung im Ultraschallbad bei Raumtemperatur angeschlossen. Die Lösung wurde ausschließlich frisch angesetzt verwendet.

2.1.5.10 Heparin

Da Heparin mit Antithrombin III und Thrombin ternäre Komplexe bildet und dadurch die Inaktivierung des Thrombins durch das Antithrombin III um den Faktor 1000 beschleunigt, wurde es als Gerinnungshemmer verwendet, um die intraarteriellen Katheter über einen längeren Zeitraum durchgängig zu halten und eine mögliche Gerinnungsbildung zu verhindern. Die Katheter wurden jeden dritten Tag mit einer heparinhaltigen Lösung gespült. Hierzu wurde ein Volumenteil Heparin (5000 I.E./ml) mit 5 Volumenteil NaCl verdünnt. Von dieser Mischung wurden 0,2 ml in den Katheter injiziert. Somit erhielten die Tiere bei jeder Katheterspülung eine Dosis von 167 I.E. Heparin, von der je nach verbliebener Katheterlänge etwa die Hälfte als Flüssigkeitssäule im Katheter verblieb.

2.1.5.11 Interferon- α

Die Meerschweinchen erhielten eine Dosis von 1200IU Interferon- α unabhängig von ihrem Körpergewicht.

2.1.5.12 Interferon- γ

Die Meerschweinchen erhielten eine Dosis von 10 μ g Interferon- γ unabhängig von ihrem Körpergewicht.

2.1.5.13 Primäre Antikörper

Tabelle 1: Übersicht über die bei der Immunhistologie verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Code	Wirt	Zielstruktur	Hersteller
Anti Stat3 IgG	sc 482	Kaninchen	Stat3 Monomere und Dimere	Santa Cruz Biotechnologie, D- Heidelberg
Anti von Willebrand IgG	STARTW-IG	Schaf	Endothelialer von Willebrand Faktor	Haemochrom Diagnostica GmbH, D- Essen
Anti NeuN IgG	MAB377	Maus	Neuronenspezifisches Nukleäres Protein	MoBiTec GmbH, D- Göttingen
Anti GFAP IgG	D097-3	Maus	Saures gliales Faserprotein	MoBiTec GmbH, D- Göttingen

2.1.5.14 Sekundäre Antikörper und Detektionssystem

Tabelle 2: Übersicht über die bei der Immunhistologie verwendeten Sekundärantikörper und das Detektionssystem zur Erkennung des sekundären Stat3 Antikörpers

Substanz	Wirt	Zielstruktur	Hersteller
Biotin-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Ziege	Anti Stat3 IgG	Vector BA-1000, Linaris Biologische Produkte, D-Wertheim- Bettingen
Alexa Flour [®] 488-Donkey Anti-sheep IgG (vWF)	Esel	Anti von Willebrand IgG	MoBiTec GmbH, D-Göttingen
Alexa Flour [®] 488-Goat Anti-Mouse IgG	Ziege	Anti NeuN IgG Anti GFAP IgG	MoBiTec GmbH, D-Göttingen
Cy3-conjugated Streptavidin		Biotin	Jackson ImmunoResearch West Grove-PA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell

2.2.1.1 Haltung und Aufzucht

Für diese Studie wurden Meerschweinchen (*Cavia aperea porcellus*) verwendet, die aus der institutseigenen Zucht stammten. Die Tiere wurden in vier Gruppen gehalten, die aus zwei bis drei weiblichen, einem männlichen Tier und der jeweiligen Nachzucht bestanden.

Die Jungtiere wurden bei einem Körpergewicht von 220-250 Gramm abgesetzt, um dann nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen ähnlichen Gewichts unterteilt gehalten zu werden. Die Käfige der Zuchttiere hatten eine Grundfläche von 2,28m², die der Absetzer 0,41m². Die Raumtemperatur wurde auf 22 +/- 2 °C konstantgehalten, der Tag/Nacht-Zyklus wurde auf 12 Stunden festgesetzt (Beginn der Helligkeitsperiode um 7:00).

Die Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu frischem Trinkwasser und zu Heu. Zusätzlich erhielten sie pelletiertes Meerschweinchen Zuchtfutter, ebenfalls ad libitum. Einmal wöchentlich wurden den Meerschweinchen mit Vitamin C versetzte Karotten zur Deckung ihres Vitamin C Bedarfs angeboten.

Ab einem Körpergewicht von 380 Gramm wurden die Tiere mittels Operation auf die Versuche vorbereitet. Das durchschnittliche Operationsgewicht lag bei 425 Gramm. Im Anschluss an die Operationen wurden die Tiere einzeln in transparenten Polycarbonatkäfigen mit den Maßen 42 x 26,5x 15 [cm] (Länge x Breite x Höhe) im Versuchsraum gehalten.

Nach der Operation hatten die Meerschweinchen mindestens eine Woche Zeit zur Erholung, bevor die Versuche begannen. In dieser Zeit wurde das für die Versuche notwendige Handling mindestens zweimal simuliert, um die Versuchstiere an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen und die Stressreaktionen zu minimieren. Bei Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Körpergewicht 415 Gramm. Der Gesundheitszustand und die Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser wurden täglich kontrolliert.

Die Versuche wurden mit Genehmigung der lokalen Tierschutzkommission (Projektnummer GI 18/2 Nr. 42/2000) durchgeführt.

2.2.1.2 Telemetrie

Den Versuchstieren wurden zur Messung der Körperkerntemperatur Sender (Transmitter, PDT-4000) operativ in die Bauchhöhle eingesetzt. Die äußere Umhüllung der Sender war von zylindrischer Form, 24 mm lang und 8 mm im Durchmesser. Ein Ende des Zylinders war zu einer Halbkugel abgerundet. Die äußere Umhüllung der Sender bestand aus einem transparenten Kunststoff, der mit einer Silikonschicht überzogen war, welche dem Schutz des Senders vor Feuchtigkeit und der Vermeidung von Fremdkörperreaktionen diene.

Im Inneren dieser Umhüllung befand sich als eigentliche Temperaturmessvorrichtung ein Thermistor, der einen negativen Temperatur-Koeffizienten (NTC) besaß, also bei steigenden Temperaturen einen geringeren elektrischen Widerstand hatte.

Der für die Messung benötigte elektrische Strom wurde über Induktion an einer Kupferspule erzeugt, die Transmitter waren damit unabhängig von Batterien. Die Übertragung der gemessenen Temperatur erfolgte über einen Sender, dessen ausgesandte Frequenz von der erfassten Temperatur abhängig war und mit steigenden / fallenden Temperaturen steigende / fallende Frequenzen im Bereich von 300-700 Hz sendete.

Die von den Transmittern ausgesandten Signale wurden von Empfängerplatten (ER-4000 Receiver) empfangen, die direkt unter den Einzelkäfigen platziert waren.

Diese waren an einem handelsüblichen Personal Computer angeschlossen, welcher die Daten von der Software VitalView erfassen und speichern ließ.

2.2.1.3 Katheter

Um den Tieren im Rahmen des Versuchsablaufs wiederholt und weitgehend stressfrei Blutproben entnehmen zu können und intravasale Injektionen vornehmen zu können, wurden den Meerschweinchen intraarterielle Katheter implantiert.

Zur Herstellung dieser intraarteriellen Katheter wurde ein Polyethylen Schlauch mit einem Außendurchmesser von 0,8 mm und einem Innendurchmesser von 0,4 mm verwendet (PE - 10; Ref. 800/140/100). 38 mm von einem Ende wurde durch zirkuläres Erhitzen mittels einer Glühdrahtschleife eine Verformung bewirkt, die in einer ca. 1-2 mm durchmessenden Blase resultierte. Das 38 mm lange Katheterende wurde durch Einführen einer leicht gekrümmten Drahtschablone und Eintauchen in ein kochendes Wasserbad der Krümmung der Drahtschablone angepasst und durch anschließendes Abkühlen in einem kalten Wasserbad fixiert. Das andere Katheterende wurde ca. 30 bis 40 cm von der Blase entfernt abgeschnitten. 6,5 cm von der Blase entfernt wurde der Schlauch um eine herkömmliche 1 ml Spritze gewickelt, ebenfalls erhitzt und abgekühlt und dadurch zu einer Spirale umgeformt.

2.2.1.4 Kammer

Die subkutane Kammer (Ross *et al.*, 2000) stellt eine Weiterentwicklung des sogenannten "Air-pouch" (Miller *et al.*, 1997a; Miller *et al.*, 1997b; Cartmell *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 2000) dar. Sie besteht aus einem Polytetrafluoroethenrohr PTFE (Teflon®) mit einer Wandstärke von einem Millimeter und einem Durchmesser von einem Zentimeter. Die Länge des zylindrischen Körpers betrug 30 mm, beide Enden wurden unter einem Winkel von 45° angeschrägt, so dass die Kammer in der seitlichen Projektion die Form eines gleichschenkligen Trapezes erhielt. Dadurch entstand ein Rohr, dessen Mantelfläche in der Länge zwischen 30 und 18 mm variierte.

In der Mitte der Stelle der kürzesten Ausdehnung der Mantelfläche wurde ein Katheter durch ein Loch in die Kammer eingeführt und zum einen durch Einschmelzen einer Blase (s.o.) in der Kammer fixiert, zum anderen wurde das in der Kammer liegende freie Ende des Katheters durch thermisches Verformen an die Krümmung einer halbkreisförmigen Drahtschablone mit einem Radius von 2mm angeglichen. Dieser Bogen verhindert ein Anliegen des Katheterendes an die Wand der Kammer oder die subkutanen Gewebsschichten und einen damit verbundenen Verschluss des Katheters.

PTFE wurde aufgrund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften gewählt. Zum einen ist es aufgrund der besonders starken Bindung zwischen dem Kohlenstoff und den Fluoratomen sehr reaktionsträge und beständig gegen Säuren und Basen, zum anderen besitzt es eine äußerst geringe Oberflächenspannung und einen sehr geringen Reibungskoeffizienten. Zusätzlich zu den abgeschrägten Enden der Kammer trug dies zu einer Verringerung der mechanischen Belastung und zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen bei.

2.2.1.5 Narkose

Domitor® (Medetomidin) ist ein prae- und postsynaptisch wirkender α -Adrenozeptor Agonist mit einer hohen α_2 -Selektivität und erzeugt eine dosisabhängige Sedation bis hin zur Analgesie. Medetomidin wurde den Tieren in einer Dosis von 0,25 mg/kg Körpergewicht intramuskulär in die Muskulatur des Oberschenkels injiziert.

Ketavet® (Ketaminhydrochlorid) wirkt beim Meerschweinchen analgetisch und hypnotisch. Ketaminhydrochlorid wurde den Tieren in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert, nachdem die durch Medetomedin bewirkte Sedation eingetreten war, um eine vollständige Aufhebung des Schmerzempfindens und Bewusstseins hervorzurufen.

Antisedan[®] (Atipamezolhydrochlorid) antagonisiert die Wirkung von Medetomidin und wurde den Tieren nach Beendigung der Operation in einer Dosierung von 1,25 mg/kg Körpergewicht zur Verkürzung der postoperativen Nachschlafphase intramuskulär in die Muskulatur des Oberschenkels injiziert.

Metacam[®] (Meloxicam) wurde den Tieren in einer Dosierung von 250 µg/kg Körpergewicht subkutan vor Beginn der Operation injiziert, um zu vermeiden, dass sensible Afferenzen durch Metaboliten der Arachidonsäure (insbesondere Prostaglandin E₂) in einen Zustand der Hyperalgesie versetzt wurden.

Narkoren[®] (Pentobarbital) wurde zur für die Perfusionen notwendigen Euthanasien der Tiere aufgrund seiner atem- und kreislaufdepressiven Eigenschaften eingesetzt. Den Tieren wurden 200 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

2.2.1.6 Operationen

2.2.1.6.1 Implantation des intraarteriellen Katheters

Für die Versuche wurden männliche Tiere mit einem Körpergewicht von 380 bis 500 Gramm verwendet. Die Tiere wurden mit Domitor[®] und Ketavet[®] narkotisiert, die Narkosetiefe durch Kontrolle der Sensibilität der Haut überprüft und die Augen durch Augensalbe vor Austrocknung geschützt.

Der zu implantierende Katheter wurde mit 70%iger Alkohollösung desinfiziert, heparinisiert und mit Kochsalzlösung gefüllt.

Zur Implantation des intraarteriellen Katheters wurde eine Sektion der *Arteria carotis* vorgenommen. Hierzu wurden zunächst das an der *ventralen* Seite des Halses gelegene Operationsfeld und die zwischen den Schulterblättern gelegene Austrittsstelle des Katheters geschoren und mit Enthaarungscreme enthaart. Nach Reinigung und Desinfektion mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel wurde das Tier in Rückenlage gelegt.

Die Haut des Halses wurde entlang der Medianen auf einer Länge von 2cm in der Mitte zwischen den Unterkieferwinkeln und dem *Sternum* inzisiert und von dem darunter gelegenen Hautmuskel stumpf abpräpariert. Dieser wurde ebenfalls entlang der Medianen durchtrennt. Nach Darstellung der *Arteria carotis* wurde diese mit der Spitze einer gebogenen Pinzette unterminiert und freigelegt. Durch Entspannen der Pinzettenwangen wurde die Durchblutung des Gefäßes unterbrochen und der zwischen den Wangen der Pinzette gelegene Abschnitt der Arterie aus der Tiefe an die Oberfläche des Operationsfeldes gehoben. Das Gefäß wurde nun mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial nach *cranial* ligiert. Die Arterie wurde transversal

eingeschnitten und die entstandene Öffnung mit einer Mikro-Präparierpinzette gespreizt, um die gebogene Spitze des Katheters in das Lumen der Ader einzuführen. Der Katheter wurde nun bis über die oben beschriebene Blase in die Arterie vorgeschoben. Nach Überprüfung der richtigen Lage des Katheters durch Aspiration wurde dieser durch Erhitzen verschlossen und *rostral* und *caudal* der Blase wurden Ligaturen um das Gefäß und den Katheter gesetzt um den Sitz des Katheters zu fixieren.

Die Hautmuskulatur wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial vernäht und der Katheter durch einen stumpf präparierten subkutanen Gang bis unter die Haut zwischen den Schulterblättern und durch einen Hautschnitt nach außen geführt. Mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial wurde der Hautschnitt vernäht und der Katheter an der Naht fixiert. Das freie Ende des Katheters (Spirale) wurde mit einem Pflaster umklebt und kompakt verpackt, um zu verhindern, dass das Tier es mit Krallen oder Zähnen erreichen und beeinflussen konnte.

Der Hautschnitt am Hals wurde ebenfalls mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial ligiert.

2.2.1.6.2 *Implantation der subkutanen Kammer*

Zur Implantation der subkutanen Kammer wurde das Tier auf der rechten Seite gelagert. Das im Bereich der *Scapula* gelegene Operationsfeld wurde geschoren und mit Enthaarungscreme enthaart. Nach Reinigung und Desinfektion wurde etwa 2 cm unterhalb der Wirbelsäule beginnend ein Hautschnitt gesetzt und 2 cm nach *distal* verlängert. Anschließend wurde mit einem konisch zulaufenden Plexiglasstab der Bereich für den späteren Sitz der Kammer präformiert. Die erzeugte Höhlung hatte denselben Durchmesser und die gleichen Ausmaße wie die subkutane Kammer, welche dort anschließend platziert wurde. Für den Katheter wurde linksseitig zur *Regio cervicalis dorsalis* ein subkutaner Gang stumpf präpariert und dieser anschließend über einen Hautschnitt nach außen geführt. Die Austrittsstelle des Katheters der subkutanen Kammer lag etwa 1 cm *caudal* der Austrittsstelle des arteiellen Verweilkatheters, wenn dieser gleichzeitig implantiert wurde. Der Hautschnitt für die Kammer wurde mit einem Haut-Klammergerät verschlossen, zusätzlich erfolgte eine Abdeckung des Operationsbereiches mit Sprühpflaster. Der Hautschnitt für die Austrittsstelle des Katheters wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial durch ein Einzelheft verschlossen und der Katheter mit demselben Faden an seiner Austrittsstelle fixiert.

Das freie Ende des Katheters (Spirale) wurde mit einem Pflaster umklebt und kompakt verpackt, um zu verhindern, dass das Tier es mit Krallen oder Zähnen erreichen und beeinflussen konnte. Die Klammern wurden nach 10 Tagen mit einem Klammerentferner entfernt.

2.2.1.6.3 Implantation des Senders

Zum Abschluss wurde den Tieren ein telemetrischer Sender (Transmitter, PDT-4000) zur Temperaturerfassung in die Bauchhöhle implantiert. Hierzu wurde die Bauchhaut von *caudal* des Nabels bis zum Rippenbogen geschoren und mit Enthaarungscreme enthaart. Nach Reinigung und Desinfektion des Operationsfeldes wurde die Bauchhaut *cranial* des Nabels auf einer Länge von ein bis zwei Zentimetern inzisiert und im Bereich des Hautschnittes von der Bauchmuskulatur stumpf freipräpariert. Durch einen ein Zentimeter langen Einschnitt entlang der *Linea alba* wurde der Sender in die Bauchhöhle eingebracht. Die Bauchmuskulatur wurde anschließend mit resorbierbarem Nahtmaterial mit sultanschen Diagonalheften verschlossen, der Hautschnitt wurde geklammert. Zusätzlich wurde die Wunde mit Sprühverband zum Schutz vor Verschmutzung abgedeckt. Die Entfernung der Klammern fand nach 7 Tagen statt.

2.2.1.7 Durchführung der *in vivo* Versuche

Es wurden subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale und intraarterielle Injektionen vorgenommen. Die subkutanen und intraarteriellen Injektionen wurden über den jeweiligen Katheter vorgenommen. Intraperitoneal wurde paramedian *cranial* des Nabels das jeweilige Volumen injiziert. Intramuskuläre Injektionen wurden in die *caudale* Oberschenkelmuskulatur gesetzt. Volumina die 0,5 ml überstiegen wurden auf beide Oberschenkel verteilt.

Die Injektionen in die subkutane Kammer und über den intraarteriellen Katheter fanden statt, während das Tier in einem nach oben offenen Glaszylinder mit einem Durchmesser von 25 cm und einer Höhe von 20 cm saß, um eine möglichst stressfreie Versuchsdurchführung durch Beschränkung des Handlings auf ein Mindestmaß zu gewährleisten. Das Tier konnte so ohne direkte Manipulation in seiner Bewegung eingeschränkt werden, während gleichzeitig der Zugang zum Katheter von oben möglich war.

Vor jeder Injektion wurde das aktuelle Körpergewicht mit einer Präzisionswaage bestimmt, um das zu injizierende Volumen dem Körpergewicht anzupassen.

Bei der subkutanen Kammer wurde nach Abschneiden des verschweißten Katheterendes eine Aspirationsspritze aufgesetzt, um gegebenenfalls vorhandene seröse Flüssigkeit aus der Kammer abzusaugen. Nach Injektion des jeweiligen Volumens wurde die im Katheter verbliebene Flüssigkeit mit 0,2 ml Luft in die Kammer gespült. Nach Verschweißen des Katheterendes war der Injektionsvorgang abgeschlossen. Das Tier wurde zur telemetrischen Erfassung des Temperaturverlaufs zurück in seinen Käfig gesetzt.

Für die intraarteriellen Injektionen bedurfte es neben dem zu injizierendem Volumen außerdem einer Spülspritze mit Kochsalzlösung und eine weitere Spritze mit 1:6 verdünnter Heparinlösung.

Die im Katheter stehende Flüssigkeitssäule wurde nach Eröffnung des Katheterendes durch den Blutdruck langsam verdrängt. Es folgte die eigentliche Injektion, bei der das im Katheter verbliebene Volumen der injizierten Flüssigkeit durch 0,3 ml NaCl mit in das Kreislaufsystem des Tieres gespült wurde.

Abschließend wurde der Katheter mit 0,2 ml der verdünnten Heparin Lösung gespült und verschweißt.

Insgesamt wurden folgende Injektionen durchgeführt:

- 1. Subkutane Injektionen:**
 - a. Hohe Dosis PIPC (1000µg/kg KG)
 - b. Niedrige Dosis PIPC (500µg/kg KG)
 - c. Kontrollen mit gleichen Volumina NaCl

- 2. Intramuskuläre Injektionen:**
 - a. Hohe Dosis PIPC (1000µg/kg KG)
 - b. Niedrige Dosis PIPC (500µg/kg KG)
 - c. Kontrollen mit gleichen Volumina NaCl

- 3. Intraperitoneale Injektionen:**
 - a. Hohe Dosis PIPC (1000µg/kg KG)
 - b. Niedrige Dosis PIPC (500µg/kg KG)
 - c. Kontrollen mit gleichen Volumina NaCl

- 4. Intraarterielle Injektionen:**
 - a. PIPC (500µg/kg KG)
 - b. Kontrolle mit gleichem Volumina NaCl
 - c. PIPC mit Diclofenac (5mg/kg KG)
 - d. PIPC mit Solvent (Diclofenac)
 - e. NaCl mit Diclofenac
 - f. NaCl mit Solvent (Diclofenac)
 - g. PIPC mit Nimesulide (5mg/kg KG)
 - h. PIPC mit Solvent (Nimesulide)
 - i. NaCl mit Nimesulide
 - j. NaCl mit Solvent (Nimesulide)
 - k. IFN-α (1200 I.U./Tier)

1. IFN- γ (10 μ g/Tier)
- m. PIPC Toleranz (5 Injektionen PIPC i.a. im Abstand von jeweils 3 Tagen)

Die Kontrollversuche wurden so angesetzt, dass der jeweilige Wirkstoff, dessen Wirkung kontrolliert wurde, herausgelassen wurde und nur sein Lösungsmittel in gleichem Volumen zum Einsatz kam.

Die Toleranzversuche fanden im Abstand von jeweils 3 Tagen an 5 aufeinander folgenden Terminen statt.

Bei allen intraarteriellen Injektionen wurde am Tag vor der eigentlichen Injektion der Katheter gespült. Dazu wurde analog zu den eigentlichen Injektionen zunächst die im Katheter verbliebene Heparinlösung abgelassen, mit NaCl gespült und der Katheter mit der 1:6 verdünnten Heparinlösung gegen Gerinnselbildung geschützt.

2.2.1.8 Blutproben

Blutproben für die Zytokinanalytik (Kap 2.2.2) wurden aus dem intraarteriellen Katheter entnommen. Dies geschah in ähnlicher Weise wie die Injektionen (Kap 2.2.1.7). Die Versuchstiere befanden sich hierzu in den Glaszylindern und es wurde Blut aus dem Katheter entnommen, nachdem es die im Katheter stehende Flüssigkeitssäule verdrängt hatte. Mit einer herkömmlichen 1 ml Spritze wurden 0,7 ml Blut abgesogen. Die Spritze wurde vor der Blutentnahme mit 0,01 ml Heparin gefüllt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Nach der Blutentnahme wurde der Katheter wie nach Injektionen versorgt und verschlossen.

Zur Gewinnung von Blutplasma folgte eine 5-minütige Zentrifugation in einem 1,5ml Reaktionsgefäß bei 5000 Umdrehungen pro Minute (Zentrifuge 5414S Eppendorf). Die Überstände wurden abpipettiert und wiederum in 1,5ml Reaktionsgefäßen bei -40°C bis zur weiteren Analytik gelagert.

Blutproben wurden je nach Stimulationsart zu verschiedenen Zeitpunkten genommen. Bei den intraarteriellen Injektionen kamen die Zeitpunkte -60min, +60min, +120min und +240min zum Einsatz. Zeitpunkt Null war immer der Zeitpunkt der Injektion. Bei den intramuskulären und intraperitonealen Injektionen war +120min der Zeitpunkt der Blutprobennahme.

Bei den Perfusionen und Präparationen wurde den Tieren direkt nach der Euthanasie aus dem Herz eine Blutprobe entnommen, um die Stimulation der Tiere über die Zytokinwerte abzusichern.

2.2.1.9 Perfusionen

Zur Euthanasie wurde Narkoren® (Pentobarbital) in einer Überdosis (1ml/kg KG) intraperitoneal injiziert. Bei Aussetzen der Atmung folgt die transkardiale Perfusion.

Hierzu wurden die Tiere in Rückenlage mit Klebeband an einem Gitterrost fixiert, der über einer Perfusionswanne lag. Nach Eröffnung der Bauchhöhle, des Thorax und des Perikards wurde physiologische Kochsalzlösung unter einem Druck von 120-140mm Hg (~16000-18600 Pa) in die linke Herzkammer geleitet, während gleichzeitig das rechte Herzohr aufgeschnitten wurde. Pro Meerschweinchen wurden etwa 400-500 ml NaCl benötigt, bis das Blut vollständig gegen Kochsalzlösung ausgetauscht war.

Wenn die Schnitte für Mehrfachmarkierungen (Kap. 2.2.3.4) benutzt werden sollten, wurden hiernach die Gehirne präpariert (Kap. 2.2.1.10). Zum Anfertigen von Präparaten, die immunenzymatisch gefärbt werden sollten (Kap.2.2.3.3), wurden die Tiere zusätzlich mit ebenfalls 400-500 ml 4% Paraformaldehyd Lösung (PFA) perfundiert, um das Gewebe zu fixieren.

2.2.1.10 Präparationen

Die Präparation der Gehirne für die beiden verschiedenen Immunhistochemieverfahren lief grundsätzlich gleich ab. Nach Dekapitation wurde die Haut in rostraler Richtung vom Schädel abpräpariert. Der Beginn des Rückenmarks wurde durch Präparation mit einer Luer-Zange freigelegt. Nach Aufbrechen des *Os occipitale* und der *Pars petrosa* der *Ossa temporale* konnten die *Ossa parietale* nach oben geklappt werden. Das Kleinhirn und caudale Anteile des Großhirns wurden auf diese Weise freigelegt. Nach Entfernung der Hirnhaut wurde der gesamte Schädel mit der Oberseite nach unten gehalten, um die caudalen Gehirnnerven und den Hypophysenstiel zu durchtrennen. Die Sehnerven wurden unter Schonung des optischen Chiasmas durchschnitten, der Bulbus olfaktorius wurde mit einem Spatel durchtrennt. Jetzt konnte das Gehirn entnommen und zwischen Großhirn und Kleinhirn durchtrennt werden.

Die perfusionsfixierten Gehirne für die „free-floating“ Methode wurden zur weiteren Fixation für 2 Stunden in 4% PFA gelegt, hiernach folgte eine Lagerung für mindestens 12 Stunden bei 4°C in 20% Saccharose.

Die Gehirne, die für *in situ* Hybridisierungen (Kap. 2.2.4) und immunhistochemische Mehrfach-markierungen verwendet werden sollten, wurden nach der Präparation in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren, in Parafilm und Aluminiumfolie verpackt und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Zytokinanalytik

2.2.2.1 Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)

Die TNF- α Spiegel im Plasma der Versuchstiere wurden mit einem Bioassay gemessen, der sich die zytotoxische Eigenschaft von TNF- α auf bestimmte Zelllinien zunutze macht. Hierbei werden die Zellen mit Verdünnungen der Plasmaproben inkubiert und die Überlebensrate der Zellen nach Ablauf einer bestimmten Zeit bestimmt. Im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe einer TNF- α Standardlösung kann dann der Gehalt an diesem Zytokin in der zu untersuchenden biologischen Probe (Plasma) errechnet werden. Das Überleben der Zellen wird anhand der Fähigkeit vitaler Zellen, einen Farbstoff enzymatisch umzusetzen, photometrisch bestimmt.

In dem hier verwendeten TNF- α Bioassay wurden Zellen der murinen Fibrosarkomzelllinie WEHI 164 (Walter and Elizabeth Hall Institute) Subklon 13 verwendet. Die Zelllinie WEHI 164 wurde aus einem Fibrosarkom gewonnen, das durch Injektionen des Karzinogens 3-Methylcholanthren in BALB/c Mäuse hervorgerufen wurde (Rollinghoff & Warner, 1973). Der Subklon 13 zeigt eine besonders hohe Sensitivität gegenüber TNF, die die der ursprünglichen Zelllinie um den Faktor 1000 übertrifft (Espevik & Nissen-Meyer, 1986).

Mit dieser Zelllinie erreicht dieser Bioassay eine Nachweisgrenze für TNF von 6pg/ml. Außerdem zeigt sich dieser Assay relativ tolerant gegenüber der Probenqualität. So konnte weder ein bis zu elfmaliges Auftauen und wieder Einfrieren noch in der Probe enthaltene weitere Zytokine (humanes oder murines rekombinantes IL-1 (α und β), hrIL-2 und hrIL-6 in Konzentrationen von 0,02pg/ml bis 1.0 μ g/ml oder murines IFN- γ in einer Konzentration von 100pg/ml bis 10ng/ml) einen Einfluss auf die gemessene TNF Aktivität ausüben (Eskandari *et al.*, 1990).

Aus diesen Gründen wird der TNF Bioassay mit der Zelllinie WEHI 164 Subklon 13 als ein Nachweisverfahren mit einem hohen Grad an Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität angesehen (Eskandari *et al.*, 1990). Jedoch muss angemerkt werden, dass die gemessene Aktivität nicht nur den TNF- α Gehalt widerspiegelt, sondern weitere Zytokine der TNF Superfamilie ähnliche Wirkungen auf die WEHI Zellen entfalten und daher deren Aktivität zusammen mit der Aktivität des TNF- α erfasst wird. Daher spricht man auch von einer „TNF-ähnlichen Aktivität“. Diese wird im Folgenden vereinfachend als TNF Aktivität bezeichnet.

Die Kultur der Fibroblasten wurde in Rothwell Park Memorial Institute Medium (RPMI-Medium) durchgeführt. Dieses war mit einem Zusatz von 10% fötalem hitzeinaktiviertem Kälberserum (FCS), 1% Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin [50000 I:E./ml] versetzt.

Das Wachstum fand in Kulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C, einem CO₂ Partialdruck von 5% und einer relativen Luftfeuchte von 95% statt.

Nach drei bis vier Tagen waren etwa 80% der Fibroblasten spindelförmig am Boden der Zellkulturflasche festgewachsen. Das Medium wurde durch Dekantieren entfernt und durch kalzium- und magnesiumfreie phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ersetzt. Diese diente dazu vorhandene Kalziumionen auszuwaschen, die das nachfolgende Ablösen der Fibroblasten vom Untergrund durch Trypsin verhindern würden. Hierzu wurde die Spüllösung wiederum durch Dekantieren entfernt und die Zellen mit 3ml Trypsinlösung versetzt. Nach einer drei- bis fünfminütigen Inkubation konnten die nun vom Untergrund abgelösten Fibroblasten mit 20 ml Kulturmedium ausgewaschen werden. Von dieser Lösung wurde ein Volumen von 1,5 ml mit 20 ml Kulturmedium in Kulturflaschen überführt und wiederum für drei bis vier Tage inkubiert.

Die bei diesem Passagierschritt übrige zellhaltige Suspension wurde für die eigentlichen Assays benutzt. Hierzu wurden die Zellen bei 2300 U/min 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit RPMI-Medium ohne Antibiotika resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach Abschluss dieses Waschschrittes wurde die Zelldichte der vitalen Zellen mit einer Zählkammer (Hämatozytometer nach Thoma) bestimmt und durch Verdünnung mit Assaymedium auf eine Zelldichte von 500 Zellen/µl verdünnt. Dieser Suspension wurde Actinomycin D hinzugefügt (4µg/ml Zellsuspension), um das weitere Zellwachstum zu stoppen.

Von den Plasmaproben, die zur Vermeidung des unspezifischen Plasmaeffektes 1:20 vorverdünnt wurden, wurden mit Assaymedium Verdünnungsreihen im Doppelansatz auf sterilen Mikrotiterplatten hergestellt. Hierzu wurden in die ersten beiden Vertiefungen einer Reihe der Mikrotiterplatten mit 200µl der jeweiligen vorverdünnten Plasmaprobe befüllt. Die restlichen Zellen der Mikrotiterplatte einer Reihe wurden mit 100 µl Assaymedium versehen. Von den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 100 µl entnommen und mit dem Assaymedium der übernächsten Vertiefung dieser Reihe vermischt und so eine Verdünnung von 1:40 hergestellt. Hiervon wurden wieder 100 µl mit dem Assaymedium der übernächsten Vertiefung gemischt. Am Ende einer Reihe wurden aus den letzten beiden Vertiefungen 100µl verworfen, so dass jeder Brunnen das gleiche Füllungsvolumen enthielt.

Da Mikrotiterplatten mit 8 Reihen mit 12 Vertiefungen benutzt wurden, konnten die Proben im Doppelansatz 5-mal verdünnt werden. Hieraus ergibt sich folgende Verdünnungsreihe: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640. Für Proben mit einem hohen TNF-Gehalt, bei denen diese Verdünnungen nicht ausreichten um in den messbaren Bereich zu gelangen, wurden die Proben vor Beginn der Wiederholung des Assays stärker vorverdünnt.

Die oberste Reihe jeder Mikrotiterplatte diente der Erstellung einer Eichkurve. Die erste Vertiefung wurde nicht beschickt, in die zweite wurden 200µl einer Lösung mit rekombinantem murinem TNF- α [1000pg/ml] pipettiert. Die folgenden Vertiefungen dieser Reihe waren mit 100 µl Assaymedium gefüllt. Analog zum oben beschriebenen Doppelansatz einer Verdünnungsreihe wurde zur Erstellung der Eichkurve ein Einfachansatz durchgeführt, d.h. die TNF- α Standardlösung wurde kontinuierlich in den nachfolgenden Vertiefungen verdünnt, wobei als Abschluss der Reihe reines Assaymedium diente. Die entstandene Verdünnungsreihe enthielt folgende TNF- α Konzentrationen: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90625; 1,953125 und 0 (jeweils in pg/ml). Zur Ermittlung von TNF Konzentrationen, die außerhalb des hiermit ermittelbaren Bereichs lagen, konnte die Anfangskonzentration der TNF-Standard-Lösung ebenso wie die Vorverdünnung variiert werden.

Die so mit den Proben bzw. TNF- α Standardlösung beschickten Mikrotiterplatten wurden anschließend mit jeweils 100µl der Zellsuspension (entsprechen 50000 Fibroblasten je Zelle der Mikrotiterplatte) versetzt.

Nach einer Inkubation von 24h wurden in jede Vertiefung 25µl des gelben Farbstoffs 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von vier Stunden.

In diesem Zeitraum wird das gelbe MTT in den Mitochondrien vitaler Zellen durch das Enzym Succinyl-Dehydrogenase zu blauen MTT-Formazankristallen reduziert.

Aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden 125µl des zellfreien Überstands abpipettiert und die Zellen mit einer Isopropanol/Salzsäure Lösung (2% 2N HCl in Isopropanol) versetzt, um die Membranen der Zellen und Organellen aufzulösen und die Formazankristalle in Lösung zu bringen. Dieser Vorgang war nach 12h abgeschlossen und sollte aufgrund der Lichtempfindlichkeit des MTT-Formazons lichtgeschützt stattfinden.

Bei einer Wellenlänge von 570nm wurde die optische Dichte jeder einzelnen Probe photometrisch mittels eines ELISA- Readers (Digiscan) bestimmt.

2.2.2.2 Interleukin-6

Das Prinzip des IL-6 Bioassays beruht auf dem IL-6 abhängigen Wachstum der Zelllinie B9, eines Subklons der murinen B-Zell Hybridoma Zelllinie B13.29. Diese entstand aus der Fusion von Milzzellen mit Plasmazytomzellen, die durch die Injektion von Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentacane) in die Bauchhöhle von Balb/c Mäusen hervorgerufen wurden (Lansdorp *et al.*, 1986).

Der Subklon B9 weist eine besonders hohe Sensitivität gegenüber IL-6 auf (Aarden *et al.* 1987). Der Nachweis der Proliferation der Hybridoma Zellen erfolgte ebenso wie bei dem TNF Bioassay (2.2.2.1) durch Analyse der enzymatischen Umsetzung des Farbstoffs MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) im Vergleich zu Zellen, die mit verschiedenen konzentrierten IL-6 Standardlösungen inkubiert wurden.

Die Kultur der Zellen fand in Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO₂ Gehalt von 5% in Rothwell Park Memorial Institute Medium (RPMI) mit einem Zusatz von 8 % fötalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum, 1% L-Glutaminsäure (Konzentration 1 mmol/ml), 0,13% Gentamycin sowie 0,25% Mercaptoethanol statt. Aufgrund der erwähnten IL-6-Abhängigkeit der Zelllinie wurde der Kultur zum Wachstum IL-6 in einer Konzentration von 5 IU/ml des fertigen Wachstumsmediums zugesetzt.

Nach 3 Tagen wurden die Zellen in neues Medium passagiert. Hierbei wurde 1 ml der vorangegangenen Kultur in 9 ml überführt.

Die für den Assay benötigten Zellen wurden der fortlaufenden Kultur entnommen und durch Zentrifugation bei 2300 U/min für 10 min vom Medium getrennt, welches durch Dekantieren entfernt wurde. Nach Resuspension der Zellen in 9 ml IL-6-freien Medium wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt.

Im Anschluss an die dritte Resuspension wurde mit einer Zählkammer (Hämatozytometer nach Thoma) die Zelldichte bestimmt und die Suspension auf einen Gehalt von 50000 Zellen/ml mit Assaymedium (Wachstumsmedium ohne Zusatz von IL-6) verdünnt.

Von den Plasmaproben wurden mit Assaymedium Verdünnungsreihen im Doppelansatz auf sterilen Mikrotiterplatten hergestellt. Die Proben mussten zur Vermeidung des unspezifischen Plasmaeffektes 1:20 vorverdünnt werden. Da die IL-6-Spiegel bei inflammatorisch stimulierten Tieren stark ansteigen, waren bei Proben von stimulierten Tieren stärkere Verdünnungen nötig (1:100 bzw. 1:1000).

In den Mikrotiterplatten wurden jeweils die ersten beiden Vertiefungen einer Reihe mit 200 µl der jeweiligen vorverdünnten Plasmaproben befüllt. Die restlichen Vertiefungen der Mikrotiterplatte einer Reihe wurden mit 100 µl Assaymedium versehen.

Von den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 100 µl entnommen und mit dem Assaymedium der jeweiligen übernächsten Vertiefung dieser Reihe vermischt. Hiervon wurden wieder 100µl mit dem Assaymedium der übernächsten Vertiefung gemischt. Am Ende einer Reihe wurden aus den letzten beiden Vertiefungen 100 µl verworfen, so dass jede Vertiefung das gleiche Füllungsvolumen enthielt.

Da Mikrotiterplatten mit 8 Reihen mit jeweils 12 Vertiefungen benutzt wurden, könnten die Proben im Doppelansatz 5-mal verdünnt werden. Abhängig von der Vorverdünnung wurden so in der letzten Vertiefung einer Reihe Verdünnungen von 1:640, 1:3200 und 1:32000 erreicht.

Die oberste Reihe jeder Mikrotiterplatte diente der Erstellung einer Eichkurve. Die erste Vertiefung wurde frei gelassen, in die zweite wurden 200 µl humanes rekombinantes IL-6 mit einer Konzentration von 50 IU/ml pipettiert. Die folgenden Vertiefungen dieser Reihe waren mit 100 µl Assaymedium gefüllt. Analog zum oben beschriebenen Doppelansatz einer Verdünnungsreihe wurde zur Erstellung der Eichkurve ein Einfachansatz durchgeführt, d.h. die IL-6 Standardlösung wurde kontinuierlich in den nachfolgenden Vertiefungen verdünnt, wobei als Abschluss der Reihe reines Assaymedium diente. Die entstandene Verdünnungsreihe enthielt folgende IL-6 Konzentrationen: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125; 0,390625; 0,1953125; 0,09765625 und 0 (jeweils in IU/ml).

Die so mit den Proben bzw. IL-6 Standardlösung beschickten Mikrotiterplatten wurden anschließen mit jeweils 100µl der Zellsuspension (entsprechen 5000 B9-Zellen) versetzt und 72 Stunden bei den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 25 µl MTT (5mg/ml) gefüllt und für weitere 4 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Das weitere Vorgehen entsprach der bereits im Rahmen des TNF- α Assays beschriebenen Vorgehensweise, mit dem Unterschied, dass eine hohe IL-6 Konzentration zu einem vermehrten Wachstum der Zellen führte und deshalb ein verstärkter Substratumsatz stattfand.

2.2.3 Immunhistochemie

Zur Detektion von Zielstrukturen wird bei der Immunhistochemie die spezifische Bindung von mono- oder polyklonalen Antikörpern mit antigenen Determinanten (Epitope) dieser

Zielstrukturen ausgenutzt. Um die Antigen-Antikörper Komplexe nachweisbar und damit für die Mikroskopie auswertbar zu machen, werden verschiedene Markersubstanzen verwendet, die mit der Koppelung von färbenden Substanzen an diese Antigen-Antikörper Komplexe einhergehen.

In dieser Arbeit kam zum einen ein Verfahren zum Einsatz, bei dem Meerrettichperoxidase, die an einen Avidin-Biotin Komplex gekoppelt ist, (Hsu *et al.*, 1981) zum enzymatischen Umsatz des Farbstoffes Diaminobenzidin und dessen Bindung an die Zielstruktur dient. Als zweites Verfahren wurde Immunfluoreszenz angewendet, bei der die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, die an Antikörper und damit an die Zielstruktur gebunden sind (Coons & Kaplan, 1950), zur Emission von Licht bestimmter Wellenlänge führt und damit die Antigen-Antikörper Komplexe sichtbar macht.

2.2.3.1 Antikörper

Zur Detektion von aktivierten Stat3 Molekülen wurden der aus dem Kaninchen stammende polyklonale Stat3 Antikörper sc-482 verwendet. Dieser erkennt und bindet die Aminosäuresequenz 750-769 am carboxyterminalen Ende des Stat3 Moleküls. Die Phosphorylierungsstelle von Stat3 liegt an Position TYR705 (Kaptein *et al.*, 1996), wobei dieser Antikörper sowohl phosphorylierte als auch unphosphorylierte Stat3 Moleküle erkennt und damit sowohl die Monomere als auch die dimerisierte Form markiert.

Die Spezifität des Stat3 Antikörpers in der Ratte wurde durch Bestimmung des Molekulargewichtes des detektierten Proteins, durch Verhinderung der Antikörperbindung mittels Präinkubation mit dem Peptid (sc-482 P), gegen das der Antikörper gerichtet ist und durch Vergleich mit einem anderen Stat3 Antikörper nachgewiesen (Stromberg *et al.*, 2000).

Im Meerschweinchen wurde die Spezifität des Antikörpers durch Unterdrückung der immunhistochemischen Stat3 Signale nach Vorinkubation des Antikörpers mit seinem Blockungspeptid sc-482 P Signale in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Bortz, 1989; Rummel *et al.*, 2004)

2.2.3.2 Amplifizierungen

Um die Signalstärke der Antigen-Antikörper Komplexe zu intensivieren und damit die Sensitivität zu erhöhen, wurden Amplifizierungsverfahren durchgeführt.

Bis auf die Kernfärbungen wurden ausschließlich sogenannte indirekte immunhistochemische Verfahren benutzt, bei denen nicht der primäre Antikörper mit der mikroskopisch

detektierbaren Substanz gekoppelt ist, sondern sich die Farbstoffe erst am sekundären gegen die Tierart des ersten Antikörpers gerichteten Antikörper oder an daran gebundenen weiteren Strukturen anlagern.

Die immunenzymatische Methode arbeitete des Weiteren mit einer Tyramin- Signal-Amplifizierung, bei der der zweite Antikörper Biotin-gekoppelt ist. An dieses Biotin wird Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase angelagert, welche wiederum dazu dient biotiniertes Tyramin zu aktivieren. Die entstehenden kurzlebigen Tyraminradikale dimerisieren mit Tyrosin Molekülen der Antikörper oder des umliegenden Gewebes und markieren so die unmittelbare Umgebung des gebundenen Antigens, die nun weitere Biotin Moleküle als Bindungsstellen aufweist.

Aufgrund der hohen Bindungsaffinität des Hühnereiweiß- Glycoproteins Avidin respektive Streptavidin zu Biotin und dem Vorliegen mehrerer Bindungsstellen für Biotin konnte durch Anlagerung von verzweigten Avidin-Biotin Komplexen eine weitere Verstärkung des immunhistochemischen Signals erreicht werden.

Bei der immunenzymatischen Methode wurde Biotin benutzt, welches mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war, um in einem letzten Schritt die Diaminobenzidinreaktion zu katalysieren, die die markierten Zielstrukturen braun anfärbte.

Bei der Immunfluoreszenz wurden ebenfalls biotinylierte Sekundärantikörper verwendet. An diese wurden Streptavidin gekoppelte Fluorochrome angelagert. Aufgrund der signalverstärkenden Wirkung der Fluoreszenzfarbstoffe konnte auf weitere Amplifizierungen verzichtet werden.

2.2.3.3 Immunenzymatische Methode

Die Schnitte für die Diaminobenzidinfärbung wurden am Gefriermikrotom angefertigt. Hierzu wurden die zwischen Groß- und Kleinhirn durchgetrennten Gehirnteile bis zum Absinken in der Lösung, mindestens jedoch 12 Stunden, in 20%iger Saccharose entwässert.

Die Proben wurden anschließend mit der Schnittfläche auf das Gefriermikrotom aufgeblickt und mittels eines Einbettmediums (Tissue Tek[®]) durch Kohlendioxidverdampfung festgefroren. Nach vollständigem Durchfrieren des Gewebes wurden 40 µm starke Schnitte angefertigt und mit einem Pinsel zur Rehydrierung in 0,1 molaren Phosphatpuffer (pH 7,2-7,4) überführt.

Die Rehydrierung und alle weiteren Schritte bis auf die Inkubationen fanden bei dieser Methode in sogenannten Karussellen statt. Bei diesen handelt es sich um 15 cm durchmessende Polykarbonatreifen eigener Herstellung mit einer Mantelhöhe von 5 cm, die

durch vier Querstreben in acht Sektoren unterteilt sind. Der Boden der Karusselle ist mit einem Polyethylenetz mit einer Maschenbreite von 0,5 mm bezogen. Die Karusselle standen in 16 cm durchmessenden Glasgefäßen mit einer runden Grundfläche. 200 ml Phosphatpuffer sind ausreichend, um die Gefäße ca. 10mm hoch zu befüllen und so eine ausreichende Flüssigkeitsmenge in jedem Sektor zu gewährleisten. Aufgrund des innerhalb der Sektoren frei schwimmenden Zustandes der Gewebeschnitte wird diese Methode auch als „free-floating Methode“ bezeichnet.

In jeden Sektor wurden 20-25 Schnitte überführt, so dass die für diese Arbeit relevanten Gehirnregionen eines Gehirns in einem Karussell prozessiert werden konnten.

Bei der auf das Schneiden folgenden Rehydrierung wurde der Puffer zweimal nach 5 Minuten ausgetauscht, so dass dieser wie alle folgenden Waschschrte 3mal 5 Minuten dauerte und unter kontinuierlichem Schwenken stattfand. Um den Phosphatpuffer zu erneuern, wurden die Karusselle mit den Gewebeschnitten aus dem Pufferbad entnommen und in Glasgefäße mit neuem Puffer gestellt. Die Schnitte wurden dabei von dem Bodennetz des Karussells zurückgehalten.

Für die Inkubationsschritte wurden die Schnitte mit einem Pinsel in 5 ml Reaktionsröhrchen, die mit 1 ml der zu inkubierenden Lösung befüllt waren, überführt.

Im Anschluss an die in Tabelle 3 dargestellte Prozessierung der Gehirnschnitte fand die DAB-Reaktion in den Karussellen statt. Die Schnitte wurden in 0,05%iger DAB-Lösung in 0,1M Phosphatpuffer für 15 Minuten lichtgeschützt unter Schwenken inkubiert. Die Zugabe von 10 µl 10% H₂O₂ startet die Umsetzung der löslichen, violetten Form des DAB in die feste bräunliche Form durch die Meerrettich Peroxidase im Bereich der detektierten Stat3 Moleküle. Diese Reaktion wurde nach ausreichender Färbung durch die Überführung der Schnitte in 0,1M Phosphatpuffer abgebrochen. Nach 3x5min Waschvorgang konnten die Schnitte auf mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen werden und für 12 Stunden staubfrei trocknen.

Zur Gegenfärbung mit Kresylviolett wurden die Objektträger mit den Gehirnschnitten für zwei Stunden in HistoClear™ gereinigt und entfettet. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (2x100%, 1x90%, 1x70%, 1x50% jeweils für 2 Minuten) gewässert mit Aqua dest. abgespült und für 10-20 Sekunden in der Kresylviolettlösung (0,1% Kresylviolett, 0,25% Eisessig in 0,1M Phosphatpuffer) gefärbt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (1x50% und 1x90% für jeweils 5-10 Sekunden, dann 1x95% und 1x100% für jeweils 2 Minuten).

Nach jeweils zwei Minuten in HistoClear™ und Xylol wurden die Objektträger mit Entellan mit Deckgläschen versehen und getrocknet.

Tabelle 3: Arbeitsprotokoll der Immunhistologie für die DAB-Färbung (ra=made in rabbit)

Vorgang	Substanz	Dauer	Temperatur
Rehydrierung	0,1M PB	3x5min	Raumtemperatur (Rt)
Blockung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen	NHS 10%, TritonX-100 0,3% in 0,1M PB	1h	Rt
Blockung der unspezifischen Tyramin Bindungsstellen	0,5% Blocking-powder NEL 700 in 0,1M PB	30min	Rt
Inkubation mit dem ersten Antikörper	Anti-Stat3 IgG (ra) 1:12000 in 0,1M PB mit 2%NHS und 0,1% TritonX-100	36-48h	4°C
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Inkubation mit dem zweiten Antikörper	Biotinyliertes anti-rabbit IgG 1:200 in 0,1M PB mit 2% NHS und 0,1% TritonX-100	1h	Rt
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Koppelung von Streptavidin Meerrettich-peroxidase	Streptavidin HRP 1:100 in 0,1M PB und 0,1% TritonX-100	30min	Rt (lichtgeschützt)
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Tyramin Amplifikation	Biotinyliertes Tyramin 1:100 in 0,1M PB mit 0,1% TritonX-100	10min	Rt (lichtgeschützt)
Vorinkubation des Avidin Biotin Komplex	Avidin 1:100 und biotinylierte Meerrettichperoxidase in 0,1M PB mit 0,1% TritonX-100	30min	Rt (lichtgeschützt)
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt (lichtgeschützt)
Inkubation mit Avidin Biotin Komplex	Avidin-Biotin Komplex 1:100 in 0,1M PB mit 0,1% TritonX-100	1h	Rt (lichtgeschützt)
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt (lichtgeschützt)

2.2.3.4 Mehrfachmarkierungen für Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der Zelltypen der Stat3 markierten Zellen wurden gemeinsam mit den Stat3 Markierungen zelltypspezifische Marker verwendet. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt.

In einer Schnittserie wurde jeweils die Stat3 Markierung mit einer zellspezifischen Markierung kombiniert.

Am Kryostaten wurden 20 µm Schnitte bei -18°C Umgebungstemperatur und -8°C Objekttemperatur angefertigt und auf Poly L-Lysin beschichtete gekühlte Objektträger aufgetragen. Durch langsames Erwärmen wurden die Schnitte aufgetaut und in Objektträgerhaltern auf Eis bis zur weiteren Prozessierung gelagert.

Für die Inkubationsschritte wurden die Objektträger aus den Racks entnommen und mit der schnittragenden Seite nach unten auf eine Plexiglasschiene gelegt, bei der die Ränder durch Klebestreifen erhöht waren. Zwischen den Objektträgern und den Plexiglasschienen ergab sich so ein kapillärer Spalt mit einem Volumen von 200 µl.

Zur Vermeidung des Austrocknens der Schnitte fanden die Inkubationen in verschließbaren Metallboxen mit den Maßen 30 x 20,5 x 5 [cm] (Länge x Breite x Höhe) statt, die mit angefeuchtetem Zellstoff ausgekleidet waren.

Um überschüssige Inkubationslösung am Ende der jeweiligen Inkubation zu entfernen, wurden die Objektträger von den Schienen vorsichtig abgehoben und in die Racks zurückgestellt. In diesen wurden die Gehirnschnitte in 200 ml fassenden Färbeküvetten für jeweils 3 mal 5 Minuten in 0,1 molarem Phosphatpuffer gewaschen. Die Färbeküvetten konnten ebenfalls lichtdicht verschlossen werden, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

Zur Mehrfachmarkierung wurden im Falle der GFAP- und der NeuN- Schnittserie die jeweiligen primären Antikörper (anti-GFAP bzw. anti-NeuN) zusammen mit dem gegen Stat3 gerichteten primär Antikörper gemeinsam zur Inkubation auf die Gewebsschnitte gegeben. Bei der vW-Schnittserie wurde der gegen den von Willebrand-Faktor gerichtete Antikörper erst mit dem sekundären Antikörper der Stat3 Detektion auf die Gehirnschnitte aufgetragen.

Bei allen Schnittserien fand im Anschluss an das immunhistochemische Protokoll (Tabelle 4) eine Färbung der Zellkerne mit DAPI (4,6 diamino-2-phenylindol-2HCl) statt. Der blau fluoreszierende Farbstoff DAPI bindet an der DNA besonders an A-T Basenpaaren im Bereich der kleinen Furche (Lin *et al.*, 1977) unabhängig vom Zelltyp.

Die Objektträger wurden mit Citifluor AF1 eingedeckelt und bis zur Auswertung bei 4°C liegend in geschlossenen Mappen aufbewahrt.

Tabelle 4: Arbeitsprotokoll der immunhistologischen Mehrfachmarkierungen

(ra=made in rabbit, mo=made in mouse, sh=sheep)

Vorgang	Substanz	Dauer	Temperatur
Fixierung	2% Paraformaldehyd in 0,1M PB	10min	Rt
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Blockung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen	NHS 10%, TritonX-100 0,3% in 0,1M PB	1h	Rt
Ko-Inkubation mit den beiden ersten Antikörpern	Anti-Stat3 IgG (ra) 1:4000 mit anti-NeuN IgG (mo) 1:200 oder anti-GFAP IgG (mo)1:2000, bzw. anti Stat3 exklusiv in 0,1M PB mit 2%NHS und 0,1% TritonX-100	36-48h	4°C
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Sättigung der endogenen Avidin Bindungsstellen	Avidin 5% in 0,1M PB	15min	Rt
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Sättigung der Biotin-Bindungsstellen des Avidins	Biotin 5% in 0,1M PB	15min	Rt
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Inkubation mit den zweiten Antikörpern bzw. Ko-Inkubation des sekundären Stat3 Antikörpers mit dem primären vWF Antikörper	Biotinyliertes anti-rabbit IgG mit Alexa 488 anti-mouse IgG, bzw. mit anti-vWF IgG (sh) 1:3000 in 0,1M PB mit 2%NHS und 0,1% TritonX-100	90min	Rt
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
Detektion von Stat3 bzw. Detektion von Stat3 und vWF-Faktor	Cy-3 gekoppeltes Streptavidin 1:800, bzw. Cy-3 gekoppeltes Streptavidin 1:800 mit Alexa488 anti sheep IgG 1:400 in 0,1M PB mit 2%NHS und 0,1% TritonX-100	90min	Rt
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt
DAPI Kernfärbung	DAPI 1:800 in 0,1M PB	10min	Rt
Waschen	0,1M PB	3x5min	Rt

2.2.4 In situ Hybridisierung

Mit Hilfe der in situ Hybridisierung kann die Expression verschiedener Nukleinsäuren am histologischen Schnitt (*in situ*) nachgewiesen werden. Es kommen einzelsträngige DNA oder RNA Moleküle zum Einsatz (Sonden), die eine zu der nachzuweisenden Nukleinsäure komplementäre Struktur besitzen und gleichzeitig eine Markierung aufweisen, die später detektiert wird.

In diesem Fall sollte die mRNA, die für die Cox-2 des Meerschweinchens kodiert, nachgewiesen werden.

15	atgctc gccgcgcgcgc tgctgctctg cgcagcgctg gctctcggcc	
61	aggcagccaa tccttgctgt tccaaccggt gtcaaaaccg aggggaatgt ctgagtgtag	
121	gatttgaccg gtacaagtgc gactgcaccc ggacaggcta ttacggtgaa aactgtacca	
181	cacctgaatt tctaacaaga ataaaattac tgctgaagcc caccaccaac acggtgact	
241	atatactgac ccactcaaa ggagtctgga acatcgtcaa taacattccc ttctcgcga	
301	atgcaatcat gatataatgt ttgacgtcca gatctcatct gatcgacagt ccaccaact	
361	acaatgcgca ttatggctac aaaagctggg aagccttctc taacctccc tactacacca	
421	gagcgctcc tcccgctggc gatgactgcc ccactccat ggggtgtaaa ggaagaagg	
481	agcttctga tcaaatgag gttctggaaa aagttctct aagaaggaag ttcatccctg	
541	atcccaagg cacaaatag atgttcgctt tcttgccca gcatttact catcagttt	
601	tcaagtcaaa tcaaaaacgg ggaccagctt tcaccacggg actggccat ggggtggacc	
661	taagtcatat ttatggtaa actctagata gacagcacia actgcgcctt tcaaggatg	
721	gaaaaatgaa ataccagata attgatggag agatgtacc tccactgtc aaagaaactc	
781	aagtagagat gatgtacca cctacatcc ccgagcatgc acgcttctg gtggccagg	
841	aggtctcgg tctgtgcca ggcctgatga tgtacgccac catctggtg ctg cgggagcata	Sonde A
901	acagagtgtg cgatgtgctt aaacaggagc at ccagagtg ggatgatgaa cgctgttcc	
961	agacaagccg gctaataatg ataggagaaa cgattaagat agt attgaa gactatgtac	Sonde B
1021	agcatttgag cgggtatcat tcaaaactg a agttgacct agagctgctt tcaaccagc	
1081	aattccagta ccagaaccgc attgctccg agtttaacac gctgtatcac tggcatcccc	
1141	ttctgcctga caccttcaa attgatgacc aagttataa cttcaacag tttcttaca	
1201	acaactctat attagtagaa catggactta cccagttgt tgaatcattc accaagcaaa	
1261	ttgccgagc ggtcgc tgcc ggtaggaatg ttccccttgc agtccaaagg gtggcaaagg	Sonde C
1321	cttcattga gcacagcaga aagatgaaat accaatctct gaatgaatac cgcaaacgct	
1381	tctgatgaa accgtatagc tcaattgaag aacttacagg tgagaaggaa atggctgacg	
1441	gattggaagc cctctacggt gacattgatg cgatggagct gatcccccc ctctcgtgg	
1501	aaaaacctcg gccagacgct atttcgggg agaccatggt ggagatggga gcaccattct	
1561	cctgaaagg acttatgggt aaccctatat gctcacctca ctactggaag ccgagtactt	
1621	ttggaggaga agtgggttt cagatcgtca acactgcctc catccagtct ctactctgca	
1681	ataacgtgaa gggctgtct gtcactgct ttaatctccc agatccgag ctgccaataa	
1741	cagtccat taacggaggt gctcccact ccagactgga agacctcagc cccactgtac	
1801	tgctaaaagg acgttcgacg gagctgtag	

Abbildung 1: Kodierende cDNA-Sequenz der Cyclooxygenase-2 (COX-2) des Meerschweinchens (*Cavia porcellus*); Zu den gelb hinterlegten Sequenzen wurden drei Oligonukleotide erstellt, die 3' P markiert als Sonden-Mix im Verhältnis 1:1:1 zum Nachweis der mRNA in der in situ Hybridisierung eingesetzt wurden.

Das Auftreten oder die signifikante Zunahme einer bestimmten mRNA kann als Nachweis für die stimulierte Transkription eines bestimmten Gens genutzt werden, wobei keinerlei Aussage über die Expression des kodierten Proteins oder dessen biologische Aktivität getroffen werden kann. Es gibt zwar bereits Studien in anderen Tierspezies, die das Enzym COX-2 auf Proteinebene nachweisen (Matsumura *et al.*, 1998; Konsman *et al.*, 2004), für die COX-2 des Meerschweinchens sind allerdings keine spezifischen Antikörper verfügbar, so dass auf die Methode der *in situ* Hybridisierung zurückgegriffen wurde. Um eine hohe Sensitivität zu erreichen und die exprimierte COX-2 möglichst auch in niedrigen Konzentrationen nachzuweisen, wurden Sonden verwendet, die mit radioaktiven Isotopen markiert waren. Deren Strahlung wiederum wurde durch den belichtenden Effekt radioaktiver Strahlung auf Röntgenfilm nachgewiesen. Am entwickelten und vergrößerten Film konnte so die Verteilung der Cyclooxygenase-2 Expression in verschiedenen Gehirnregionen dargestellt werden, ohne jedoch eine genaue morphologische Zuordnung zu erlauben. Zu Vergleichszwecken wurde in einigen Versuchen auch die Expression IL-1 β mittels *in situ* Hybridisierung untersucht (IL-1 β cDNAs nt181-nt225, nt431-nt475, nt641-nt685; GenBank accession no. AF119622; siehe: Voss *et al.* 2007).

Die Durchführung der *in situ* Hybridisierungen fand in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Barth (Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe) statt. Die Tiere wurden im Institut für Veterinärphysiologie der JLU Gießen stimuliert und präpariert. Die Gehirne wurden auf Trockeneis an Herrn Dr. Barth gesandt, in dessen Labor die eigentliche *in situ* Hybridisierung stattfand.

Tabelle 5: Arbeitsprotokoll der *In situ* Hybridisierung

Vorgang	Substanz	Dauer	Reaktionsbedingungen
Fixierung	4% Paraformaldehyd in 0,1M PB	10 min	Rt
Waschen	0,1M Phosphatpuffer	2x5min	Rt
Dehydrierung	Aufsteigende Äthanolreihe (60%, 80%, 100%)	jeweils 5min	Rt
Trocknung		5min	Rt, Vakuum
Hybridisierung	Hybridisierungspuffer 50µl/Schnitt, Sonden	16h	52°C, 100% relative Luftfeuchtigkeit
Waschen	SSC	3x5min	Rt
Waschen	SSC	3x5min	37°C
Trocknung		3h	Rt, Vakuum
Belichtung	Kodak BioMax	7d	4°C
Entwicklung	Ilford Phenisol		Rt (lichtgeschützt)
Fixierung	Ilford Hypam		Rt, (lichtgeschützt)

2.3 Auswertung und Statistik

2.3.1 Telemetrie

Aus den telemetrisch erfassten Verläufen der Körpertemperatur der Einzeltiere wurden die für die Versuchsauswertung relevanten Zeiträume herausgeschnitten und für die weitere Auswertung herangezogen. Für die einzelnen Injektionen waren dies folgende Zeiträume (jeweils mit $t=0$ als Injektionszeitpunkt): subkutane und intramuskuläre Injektionen $-2h$ bis $+6h$, intraperitoneale und intraarterielle Injektionen $-2h$ bis $+24h$. Von den 5-Minuten Werten wurde zur graphischen Auswertung jeder dritte Wert verwendet, so dass zur weiteren Auswertung Viertelstundenwerte benutzt wurden. Aus diesen Viertelstundenwerten der Einzeltiere wurde der arithmetische Mittelwert errechnet. Die jeweiligen Temperaturwerte wurden auf der Ordinate gegen die Zeit auf der Abszisse aufgetragen und dargestellt.

In den Temperaturdiagrammen ist zusätzlich zu dem Mittelwert der Körpertemperatur der Standardfehler SE ($SE = \text{Standardabweichung} / \sqrt{\text{Versuchstierzahl}}$) als nach oben gerichteter Fehlerbalken dargestellt. Ebenso sind die Temperaturwerte im Text mit der Angabe des Standardfehlers versehen. Die Temperaturverläufe der einzelnen Applikationsarten wurden gegen die Werte der jeweiligen Kontrollversuche mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Nach demselben Verfahren wurden die einzelnen Versuchstage der Toleranzversuche gegeneinander verglichen. Der Gruppenfaktor wurde hierbei durch die unterschiedlichen Stimulationen festgelegt. Als zweiter Faktor wurden die Zeitpunkte der Messungen verwendet. Als Maß zur Quantifizierung der Fieberreaktion wurde aus den im 5-minütigen Abstand gemessenen Werten der abdominalen Körpertemperatur der Fieberindex errechnet. Dieser stellt die Integration der Fläche unter der Temperaturkurve dar, bezogen auf die durchschnittliche Temperatur in den zwei Stunden vor der Stimulation als Basiswert. Aus den Fieberindices der Einzeltiere wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und samt Standardfehler zur graphischen Darstellung verwendet. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) wurden die Fieberindices miteinander verglichen. Im Anschluss an die Varianzanalysen wurde ein post-hoc-Test nach Scheffé durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ lagen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen vor (Bortz, 1989).

2.3.2 Zytokinanalytik

Zur Erstellung einer Eichgerade wurden die gemittelten Absorptionen der TNF- bzw. IL-6 Standardproben auf der Ordinate gegen die bekannten TNF- α bzw. IL-6 Konzentrationen auf der Abszisse aufgetragen (Abbildung 2).

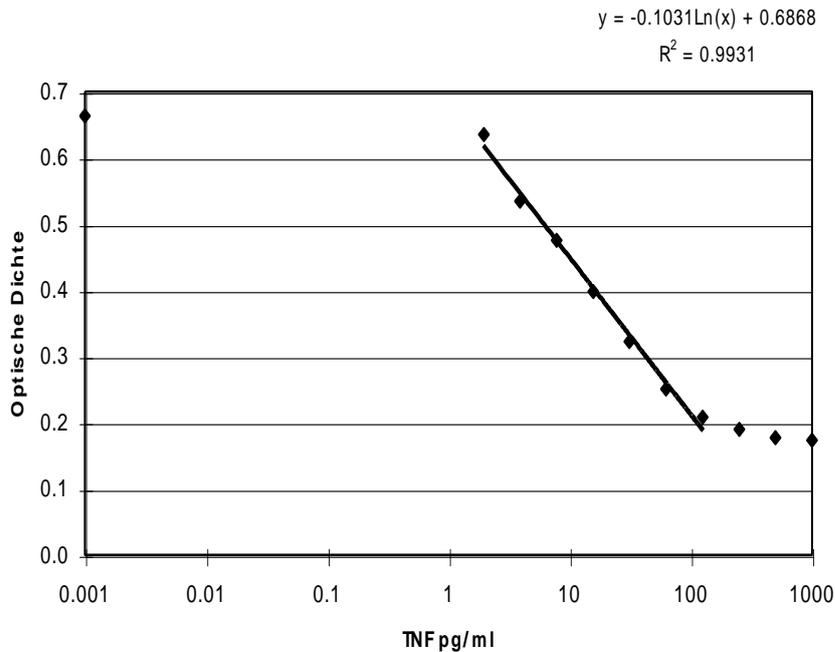


Abbildung 2: Beispiel einer Eichkurve zur Bestimmung der TNF Aktivität mit Regressionsformel und Korrelationskoeffizient R^2

Anstelle der hier gezeigten fallenden Kurve ergibt sich bei dem IL-6 Assay mit steigenden Interleukin-6 Konzentrationen eine steigende optische Dichte.

Von den Plasmaproben wurden die Verdünnungen ermittelt, deren Absorptionswerte in den linearen Teil der Eichkurve fielen und die Absorptionswerte der Verdünnungsstufe in die Regressionsformel als Unbekannte y eingesetzt, um die Zytokinkonzentration x unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe der Probe zu ermitteln.

Da Zytokinspiegel nicht normalverteilt sind, wurden die zu Stimulationsgruppen zusammengefassten Werte logarithmiert zur graphischen Darstellung und statistischen Analyse verwendet.

Analog zu den Fieberindices wurden die logarithmierten Zytokinwerte mittels einfaktorieller ANOVA und post-hoc-Test nach Scheffé analysiert, wobei wiederum eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $<5\%$ als signifikant angesehen wurde.

Die graphische Darstellung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 3.0 durchgeführt. Die logarithmierten Zytokinpiegel wurden gegen die Zeitpunkte der Probennahme aufgetragen und mit Fehlerbalken, die den Standardfehler anzeigen, dargestellt. Buchstaben über den Balken geben an, ob sich die Werte statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Gleiche Buchstaben zeigen an, dass kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Werten vorliegt, verschiedene Buchstaben bedeuten einen signifikanten Unterschied.

Die Daten der Zytokinwerte im Text sind ebenfalls mit Angabe des Standardfehlers versehen.

2.3.3 Immunhistochemie

2.3.3.1 Mikroskopie und Auswertung

Die Gehirnschnitte wurde mit dem Mikroskop Olympus BX 50 ausgewertet. Für die DAB gefärbten Schnitte wurde das Durchlichtverfahren verwendet. Die Dokumentation fand mit Hilfe einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera statt. Helligkeit und Kontrast wurden zu Verbesserung der Darstellbarkeit mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 modifiziert.

Zur Auswertung der Immunfluoreszenz wurden die Schnitte ebenfalls mit dem Mikroskop Olympus BX 50 betrachtet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte im Auflichtverfahren.

Als Lichtquelle diente eine Quecksilber Hochdrucklampe, deren Spektrum durch geeignete Filter auf die Wellenlängenbereiche beschränkt wurde, die erforderlich waren, um die einzelnen Fluorochrome distinkt in ihrem Absorptionsmaximum anzuregen und damit eine möglichst intensive Fluoreszenz zu erhalten. Durch geeignete Sperrfilter wurde das Erregerlicht aus dem weiteren Strahlengang herausgefiltert.

Die Dokumentation der Immunfluoreszenz erfolgte mit der digitalen Schwarz-Weiß Kamera Spot Insights/ Visitron. Jedes Fluorochrom wurde nacheinander angeregt und die 3 schwarz-weiß Bilder desselben Ausschnitts mit der Software Metamorph/ Visitron übereinandergelagert und in den jeweiligen Farben der Fluoreszenz eingefärbt.

Tabelle 6: Übersicht über die einzelnen Fluorochrome mit Erregungs- und Emissionsspektrum

Fluorochrom	Zur Detektion von	Erregungsspektrum	Emissionsspektrum
Cy-3	Stat3-Signalen	510-530nm	630-660nm (rot)
Alexa488	Astrozyten Endothelien Neurone	450-490nm	510-530nm(grün)
DAPI	Zellkernen	358nm	461nm (blau)

Die Auswertung der nukleären Translokationen von Stat3 Molekülen wurde semiquantitativ vorgenommen: +++ = starke Immunreaktivität, ++ moderate Immunreaktivität, + schwache Immunreaktivität, +/- vereinzelte Immunreaktivität, - keine Immunreaktivität.

Zur anatomischen Orientierung und Nomenklatur der Hirnregionen wurden die für die Ratte angegebenen Verhältnisse und Bezeichnungen herangezogen (Paxinos & Watson, 2005) und auf die Gegebenheiten des Meerschweinchenhirns und die deutsche Sprache angepasst.

3 Ergebnisse

3.1 Einfache Injektionen von PIPC

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Fieberreaktion auf Injektionen von PIPC von der Applikationsart untersucht. Hierzu wurden den Versuchstieren subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale und intraarterielle Injektionen gesetzt. Bei jeder Injektionsart lief eine Kontrollgruppe mit, der ein äquivalentes Volumen 0,9%iger pyrogenfreier Natrium-Chlorid-Lösung (Saline) injiziert wurde.

Bei der Injektion in die subkutane Kammer (Abbildung 3) ergab sich sowohl auf die Injektion von 500µg/kg als auch auf 1000µg/kg PIPC kein signifikanter Unterschied der Körperkerntemperatur, sowohl untereinander ($F=0,560$; $p=0,4957$; ANOVA) als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe (500µg/kg vs. Saline: $F=0,036$; $p=0,8581$; bzw. 1000µg/kg vs. Saline: $F=0,493$; $p=0,5215$; ANOVA). Jede Versuchsgruppe bestand aus drei Tieren ($n=3$).

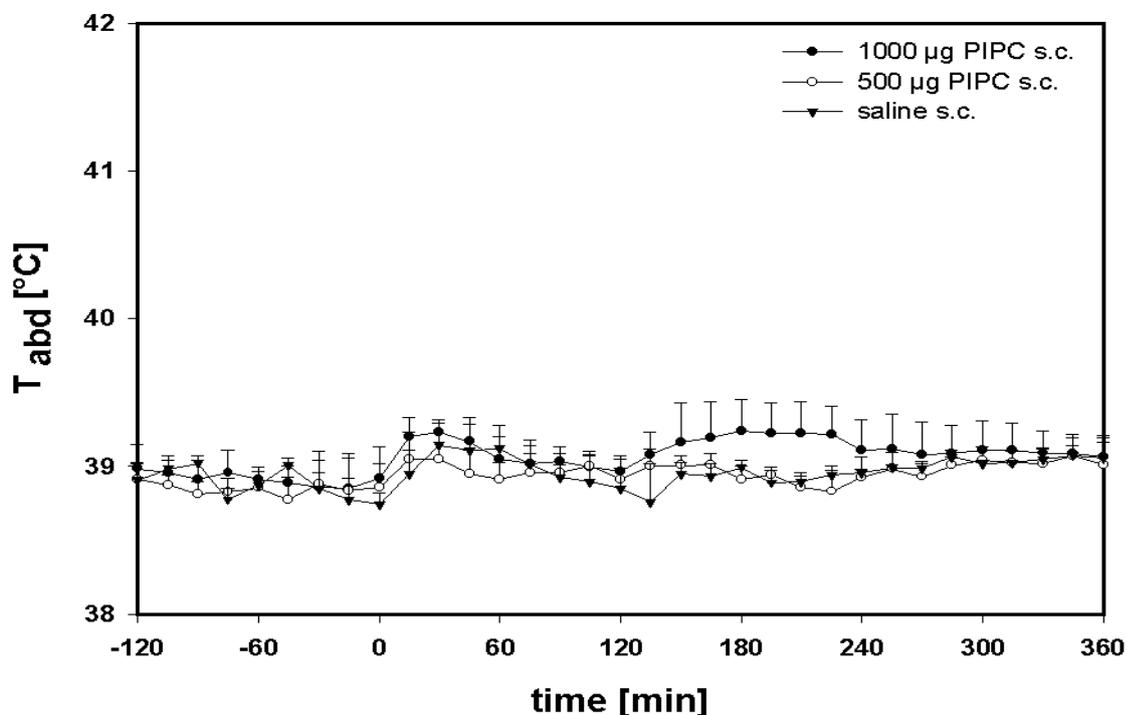


Abbildung 3: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von 500µg/kg PIPC, 1000µg/kg PIPC und Saline in die subkutane Kammer ($n=3$ für alle Versuchsgruppen, alle Injektionen erfolgten zum Zeitpunkt $t=0$)

Bei den intramuskulären Injektionen (Abbildung 4) wurden ebenfalls zwei verschiedene Dosierungen von 500 µg/kg (n=6) und 1000 µg/kg (n=3) verwendet. 120 Minuten nach der Injektion war ein Anstieg der Körperkerntemperatur der mit Pyrogen behandelten Meerschweinchen zu verzeichnen. Bei der hohen Dosierung wurde nach 300 Minuten ein Maximalwert von $40,12 \pm 0,16^\circ\text{C}$ erreicht, die niedrige Dosierung hatte ihren Maximalwert nach 270 Minuten mit $39,99 \pm 0,08^\circ\text{C}$. Im Vergleich dazu blieb die Temperatur der Kontrolltiere über den Beobachtungszeitraum stabil mit Werten zwischen $38,92^\circ\text{C}$ und $39,26^\circ\text{C}$.

Im Zeitraum von 0 bis 120 Minuten nach der Injektion ergab sich sowohl zwischen den stimulierten Tieren (500 µg/kg vs. 1000 µg/kg: $F= 0,137$; $p= 0,7208$; ANOVA) als auch im Vergleich zu den Kontrolltieren (500µg/kg vs. Saline: $F= 2,789$; $p= 0,1231$; bzw. 1000 µg/kg vs. Saline: $F= 1,506$; $p= 0,2594$; ANOVA) kein signifikanter Unterschied. Im Zeitraum von 150 bis 360 Minuten nach der Injektion wurden sowohl bei der Gabe der niedrigen ($F= 18,521$; $p= 0,0012$; ANOVA), als auch der hohen Dosis ($F= 25,274$; $p= 0,0015$; ANOVA) signifikante Anstiege der Körpertemperatur im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Zwischen den beiden Dosierungen bestand im Hinblick auf ihre pyrogene Wirkung kein signifikanter Unterschied ($F= 1,128$; $p= 0,3192$; ANOVA).

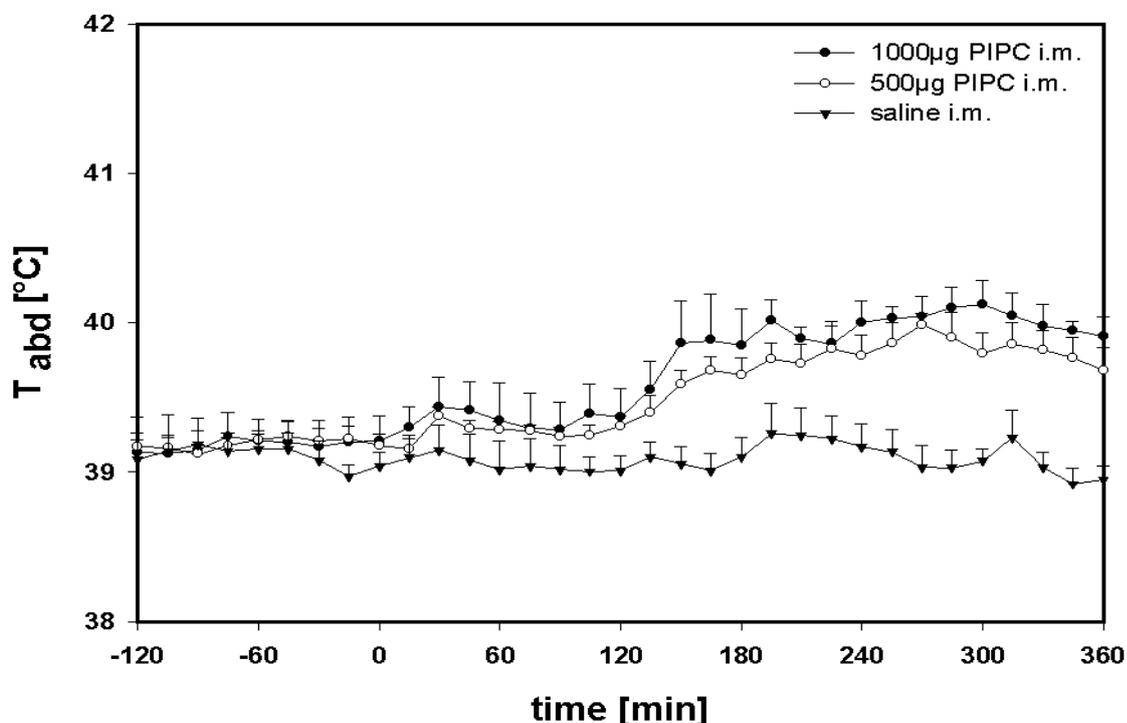


Abbildung 4: Verlauf der Körpertemperatur nach intramuskulärer Injektion von 500µg/kg PIPC, 1000µg/kg PIPC und Saline (n=6 für 500 µg/kg und Saline, n=3 für 1000 µg/kg). Alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Abbildung 5 zeigt die Temperaturverläufe von -2h bis +24h nach intraperitonealer Injektion von 500 µg/kg PIPC (n=4), 1000 µg/kg PIPC (n=6) und Saline (n=6). Im Anschluss an die Injektion der hohen Dosis stieg die Körpertemperatur über einen Zeitraum von 3,5h an und erreichte einen Maximalwert von $40,64 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$. Der Maximalwert der Körpertemperatur wurde bei Gabe der niedrigen Dosis nach 3h mit $40,35 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$ erreicht. Bei den Kontrollversuchen zeigte sich im Anschluss an die Injektion im Verlauf der ersten halben Stunde ebenfalls ein Temperaturanstieg von $0,4^{\circ}\text{C}$. Da dieser Anstieg moderat und transient war, muss dieses Phänomen im Zusammenhang mit dem Injektionsstress gesehen werden. Subjektiv erschien die intraperitoneale Injektion für die Tiere unangenehmer als die anderen Injektionsarten zu sein und war mit den stärksten Abwehrbewegungen verbunden.

Ein ebenfalls deutlicher Anstieg der Körperkerntemperatur der Kontrolltiere um $0,6^{\circ}\text{C}$ war im Zeitraum zwischen 7,5 und 20h nach der Injektion zu verzeichnen. Dieser dürfte in einer Aktivitätssteigerung aufgrund der zirkadianen Rhythmik begründet sein. Ebenso findet sich in allen Versuchstiergruppen ein mehrstündiges Absinken der Körpertemperatur 19-20 h nach der Injektion, welches mit dem Einsetzen der Ruhephase der Tiere verbunden ist.

Im Zeitraum +60min bis +480 min (Helligkeitsperiode) unterschieden sich die beiden Pyrogendosierungen nicht signifikant in ihrem Einfluss auf die Körperkerntemperatur ($F= 5,022 \times 10^{-3}$; $p= 0,9452$; ANOVA). Im weiteren Verlauf bis +1200 min ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($F= 0,544$; $p= 0,4817$; ANOVA). Die pyrogene Wirkung beider PIPC Dosierungen war dagegen in dem ersten Zeitraum hochsignifikant verschieden von der Kontrollgruppe (500 µg/kg: $F= 37,719$; $p= 0,0003$; 1000 µg/kg: $F= 28,374$; $p= 0,0003$; ANOVA). Im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt +1200min zeigte lediglich die Wirkung der niedrigeren PIPC Dosierung einen signifikanten Effekt auf den Temperaturverlauf der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (500 µg/kg: $F= 16,081$; $p= 0,0039$; 1000 µg/kg: $F= 4,647$; $p= 0,0565$; ANOVA).

In Abbildung 6 ist der mittlere Verlauf der Körpertemperatur von 9 Meerschweinchen über 24 Stunden nach der intraarteriellen Injektion von 500 µg/kg PIPC im Vergleich zum Temperaturverlauf nach Injektion einer äquivalenten Menge des Lösungsmittels (0,9% NaCl, n=8) dargestellt. Im direkten Anschluss an die Injektion des Pyrogens begann ein Temperaturanstieg, der nach drei Stunden mit einer Temperatur von $40,78 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$ sein Maximum erreichte und im weiteren Verlauf kontinuierlich abfiel, um nach 20,5h erstmalig wieder unter $39,5^{\circ}\text{C}$ zu sinken.

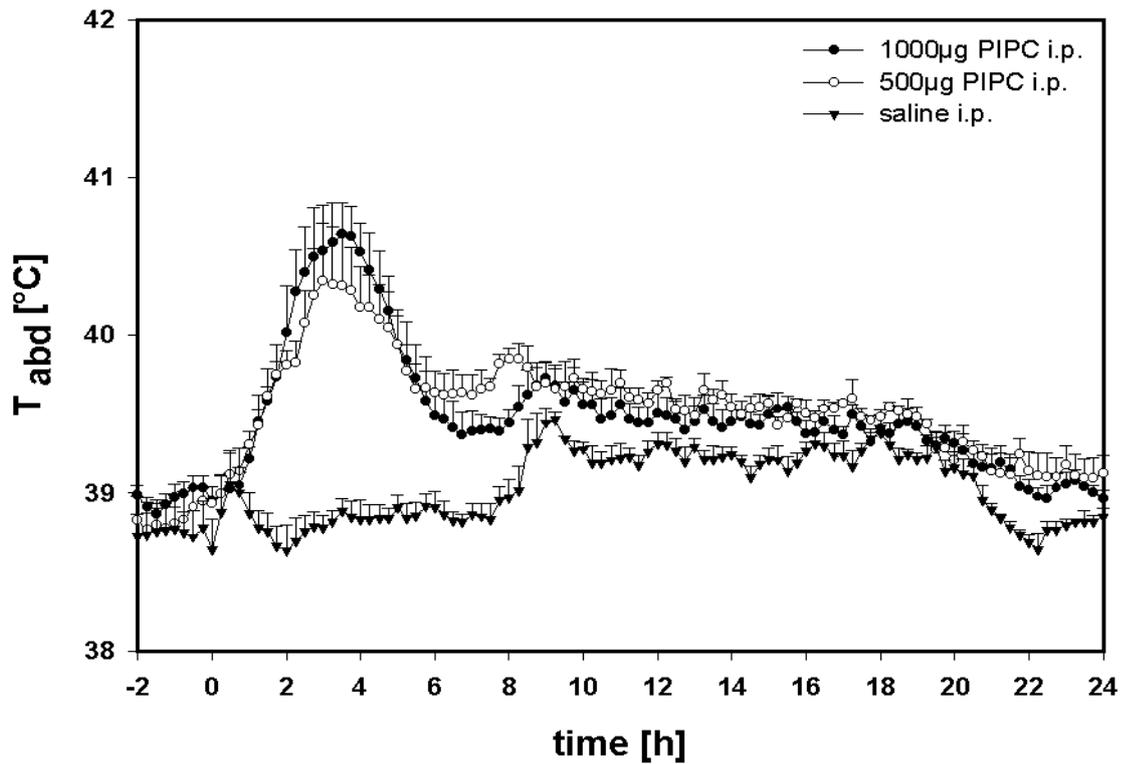


Abbildung 5: Verlauf der Körpertemperatur nach intraperitonealer Injektion von 500 µg/kg PIPC, 1000 µg/kg PIPC und Saline (n=6 für 1000 µg/kg und Saline, n=4 für 500µg/kg). Alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

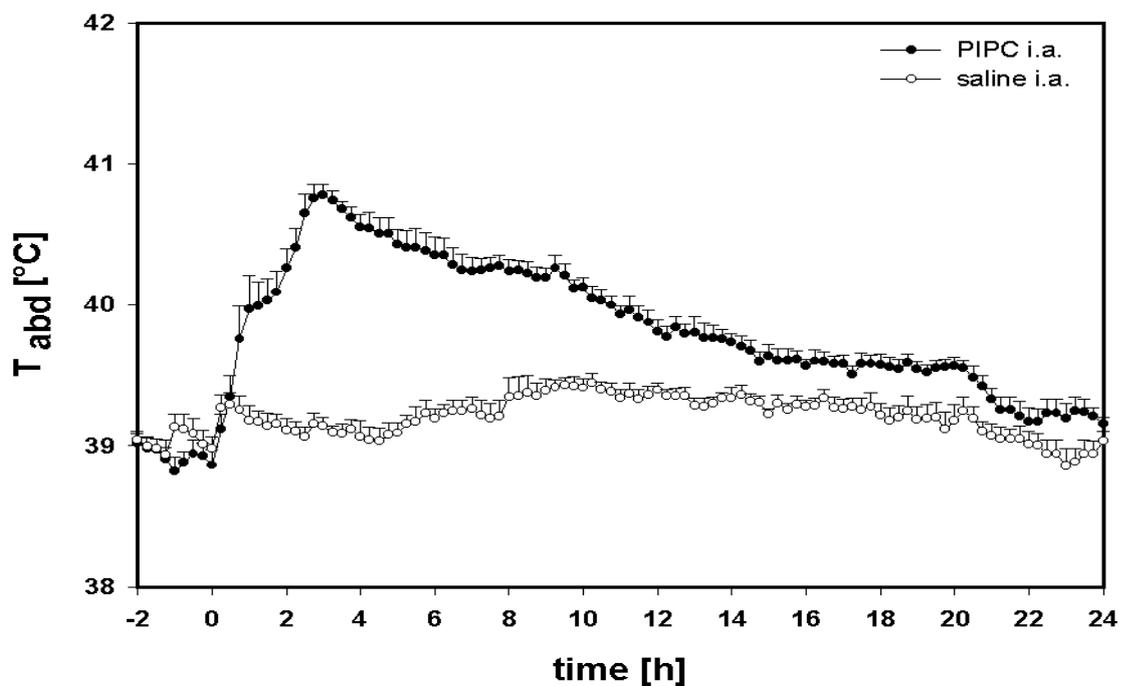


Abbildung 6: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von 500 µg/kg PIPC (n=9) bzw. Saline i.a. (n=8). Alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Sowohl die Fieberwerte in der Helligkeitsperiode am Versuchstag (+60 min bis +480 min) als auch in der folgenden Dunkelperiode (+510 min bis +1200 min) waren hochsignifikant verschieden von den Temperaturen, die bei den Kontrolltieren gemessen wurden ($F= 134,531$; $p= <0,0001$; bzw. $F= 32,632$; $p= <0,0001$; ANOVA).

Aufgrund der deutlichen und lange anhaltenden Wirkung dieser Dosierung an PIPC wurde darauf verzichtet, bei der intraarteriellen Injektion eine Dosis von 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ einzusetzen.

3.1.1 Induktion proinflammatorischer Zytokine durch PIPC

3.1.1.1 Tumor Nekrose Faktor α

In Abbildung 7 sind die Blutplasmaspiegel des Zytokins TNF- α nach intraarterieller Injektion von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PIPC im Vergleich zu den Spiegeln der mit Saline behandelten Tiere dargestellt. Bei beiden Versuchsgruppen ist 60min vor dem Versuch kein TNF nachweisbar. Bei den stimulierten Tieren betrug der TNF Gehalt des Plasmas 60 min nach Injektion 4592 ± 1401 pg/ml; $n=5$) und fiel nach weiteren 60min auf 324 ± 59 pg/ml; $n=6$). Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt bei weiteren sechs Tieren kein TNF mehr nachgewiesen werden. 240 min nach der Injektion wurde bei keinem Meerschweinchen mehr eine TNF Aktivität ($n=6$) im Blutplasma detektiert.

Im Anschluss an die Injektion des Lösungsmittels für PIPC konnte zu keinem der Zeitpunkte TNF nachgewiesen werden ($n=3$ für alle Zeitpunkte). Somit zeigt sich ein Gipfel der TNF Aktivität zum Beginn der Fieberreaktion, wohingegen während des Fiebermaximums kein TNF mehr im Blut zirkuliert.

Bei den intraperitonealen Injektionen konnte nach 60 min kein TNF nachgewiesen werden. Nach 120 min waren bei der niedrigen PIPC Dosis ($n=3$) 223 ± 64 pg/ml TNF im Plasma vorhanden, bei der hohen Dosis ($n=4$) stieg der Wert auf 1892 ± 915 pg/ml an. Einer statistischen Auswertung hält dieser Unterschied nicht stand ($F = 1,213$, $p = 0,3325$).

Weder durch intramuskuläre noch durch subkutane Injektionen von PIPC wurde eine nachweisbare TNF Aktivität im Blutplasma hervorgerufen.

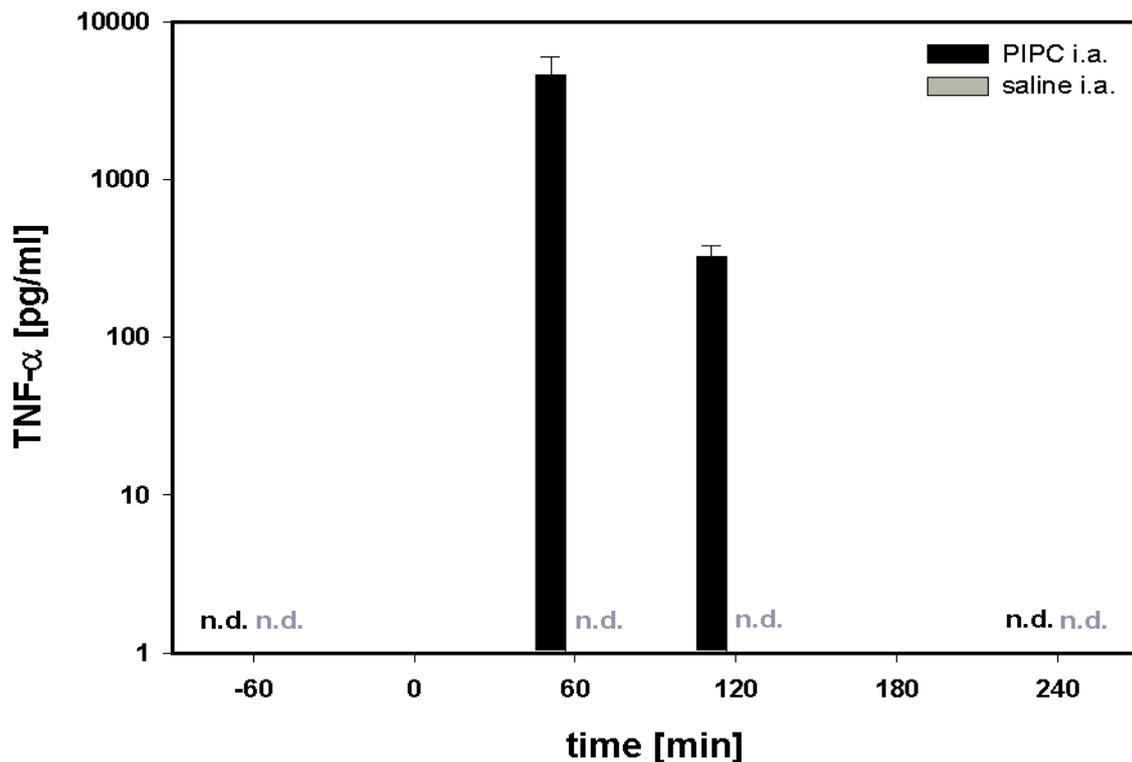


Abbildung 7: TNF- α Spiegel im Blutplasma nach i.a. Injektion von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PIPC bzw. Saline (Saline i.a. -60, +60, +120, +240 und PIPC i.a. -60: n=3, PIPC +60: n=5, PIPC +120, +240: jeweils n=6; bei weiteren 6 Tieren war zum Zeitpunkt +120 kein TNF nachweisbar) Alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

3.1.1.2 Interleukin-6

In Abbildung 8 sind die Blutplasmaspiegel des Zytokins IL-6 nach intraarterieller Injektion von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PIPC im Vergleich zu den Spiegeln der mit Saline behandelten Tiere dargestellt. Bei beiden Versuchsgruppen war 60 min vor dem Versuch ein basaler IL-6 Spiegel von 23 ± 1 I.U./ml (n=3) bei den mit PIPC zu stimulierenden Tieren beziehungsweise 31 ± 20 I.U./ml (n=3) bei den Kontrolltieren nachweisbar.

Bei den Kontrolltieren war nach der Injektion keine Veränderung festzustellen (+60min: 21 ± 3 I.U./ml; +120 min: 22 ± 2 I.U./ml; +240 min: 17 ± 3 I.U./ml; jeweils n=3)

Nach PIPC Stimulation stieg der IL-6 Spiegel an und erreicht nach 60min 661 ± 258 I.U./ml (n=5). 120min nach der Injektion lag der Mittelwert bei 6283 ± 2318 I.U./ml (n=10), fiel im Folgenden leicht ab und erreichte nach 240min einen Wert von 2959 ± 1321 I.U./ml (n=4). Dieser Anstieg des IL-6 Spiegels war zu allen drei Zeitpunkten signifikant verschieden von

den Werten der Kontrolltiere (60min: $F = 36,761$, $p = 0,0009$; 120 min: $F = 109,245$, $p < 0,0001$; 240 min: $F = 60,421$, $p = 0,0006$).

Im Gegensatz zu TNF zeigte sich eine Korrelation der Höhe der IL-6 Spiegel mit der Höhe der Fieberreaktion.

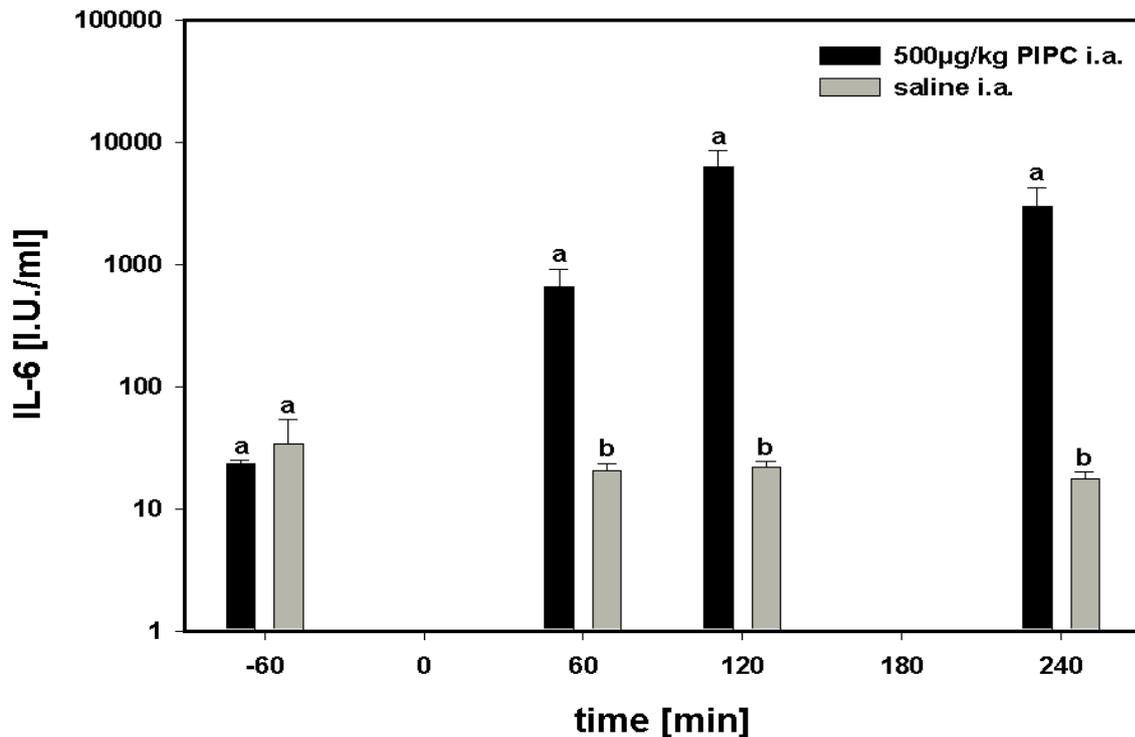


Abbildung 8: IL-6 Spiegel im Blutplasma nach i.a. Injektion von 500 µg/kg PIPC bzw. Saline (Saline i.a. -60, +60, +120, +240 und PIPC i.a. -60: n=3, PIPC +60: n=5, PIPC +120: n=10, +240: n=4) Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Werte eines Zeitpunktes an. Alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Zum Zeitpunkt +120 min war bei den Tieren, denen 500 µg/kg PIPC intraperitoneal injiziert worden war (n=4), ein IL-6 Spiegel von 1919 ± 524 I.U./ml feststellbar. Die hohe PIPC Dosis (n=3) induzierte zirkulierende IL-6 Konzentrationen von 3021 ± 1335 I.U./ml. Ähnlich wie bei den TNF-Werten stellte dies keinen signifikanten Unterschied zwischen der Wirkung der beiden PIPC Dosierungen dar ($F = 0,683$, $p = 0,4461$). Bei den intramuskulären Injektionen wurden zum gleichen Zeitpunkt IL-6 Werte von 127 ± 34 I.U./ml bei der niedrigen Dosis und 303 ± 62 I.U./ml bei der hohen Dosis gemessen. Die IL-6 Spiegel im Plasma der Tiere, die eine subkutane Stimulation erhalten hatten, lagen ausnahmslos im Bereich der Werte der Kontrolltiere (10-70 I.U./ml).

Da nach intraarteriellen Injektionen von PIPC sowohl die Fieberreaktionen als auch die Zytokininduktionen am stärksten ausgeprägt waren, und außerdem die Applikation des Pyrogens ohne Schmerzempfindungen und Abwehrbewegungen durchgeführt werden konnte, wurde diese Stimulationsart für alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuche angewendet.

PIPC wurde traditionell als Interferon-Stimulator verwendet. Daher wurden in einigen Versuchen auch i.a. Injektionen von IFN- α bzw. IFN- γ durchgeführt. Hierdurch konnte weder ein Anstieg der Körpertemperatur, noch eine vermehrte Bildung von TNF- α und IL-6 induziert werden. Weitere Untersuchungen mit Interferonen wurden daher nicht durchgeführt.

3.2 Effekt wiederholter PIPC Injektionen auf Fieberreaktion und Zytokinproduktion

3.2.1 Fieberreaktionen

Um zu überprüfen, ob sich Toleranzerscheinungen bei wiederholter Konfrontation mit PIPC manifestieren, wurde einer Gruppe von 8 Meerschweinchen PIPC in einer Dosis von 500 µg/kg fünfmal im Abstand von jeweils drei Tagen i.a. injiziert.

Die Fieberreaktionen, die sich auf wiederholte PIPC Injektionen einstellten, ähnelten in ihrer Form der Fieberreaktion, die bei erstmaliger Injektion hervorgerufen wurde (Abbildung 9, Abbildung 10). Die ersten 150 Minuten der fünf aufeinander folgenden Toleranzversuche unterschieden sich im Hinblick auf die Körpertemperatur nicht signifikant voneinander (Daten der statistischen Auswertung in Tabelle 7).

Im weiteren Verlauf der Helligkeitsperiode (180 min bis 480 min) zeigte sich bei der ersten Injektion im Vergleich zu allen weiteren Injektionen ein signifikant höheres Fieber (Tabelle 8). Das Temperaturmaximum war bei Injektion 1 nach 2,75 h mit $40,90 \pm 0,12^\circ\text{C}$ erreicht und blieb für eine Stunde auf diesem Niveau (Abbildung 9). Die folgenden Versuche zeigten ein Temperaturmaximum zu ähnlichen Zeitpunkten mit deutlich niedrigeren Werten (Inj. 2: $40,41 \pm 0,15^\circ\text{C}$ nach 3,5h; Inj. 3: $40,29 \pm 0,18^\circ\text{C}$ nach 3,25h; Inj. 4: $40,37 \pm 0,23^\circ\text{C}$ nach 3,25h und $40,29 \pm 0,23^\circ\text{C}$ nach 3,5h bei der fünften Injektion). Im Anschluss an diesen Fiebergipfel fiel die Körpertemperatur an allen Versuchstagen relativ kontinuierlich ab. Bei den Injektionen 2 bis 5 wurden im Zeitraum 14 bis 15 Stunden nach der Injektion erstmals wieder Körpertemperaturen unter $39,5^\circ\text{C}$ erreicht. Bei der ersten Injektion geschah dies nicht vor Beginn der nächsten Helligkeitsperiode.

Somit zeigte sich nach wiederholter Injektion von PIPC zunächst eine Reduktion der Stärke der Fieberreaktion, die über die gesamte Versuchsdauer erhalten blieb, bis zur dritten Injektion stärker wurde, dann sich jedoch sukzessive abschwächte. Diese Nuancen in der Stärke der Fieberreaktion halten einer statistischen Überprüfung allerdings nicht stand (Tabelle 7 bis Tabelle 9).

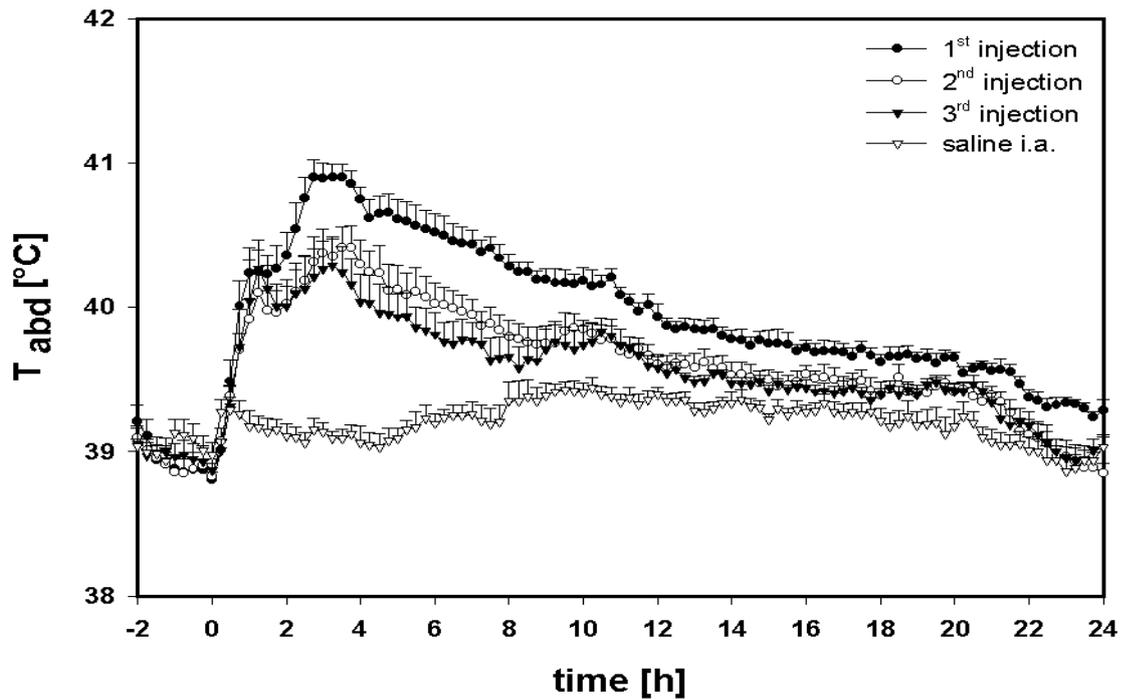


Abbildung 9: Verläufe der Körpertemperatur nach den ersten drei im Abstand von drei Tagen erfolgten Injektionen von PIPC im Vergleich zur Gruppe der mit Saline behandelten Tiere (jeweils n=8) - alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

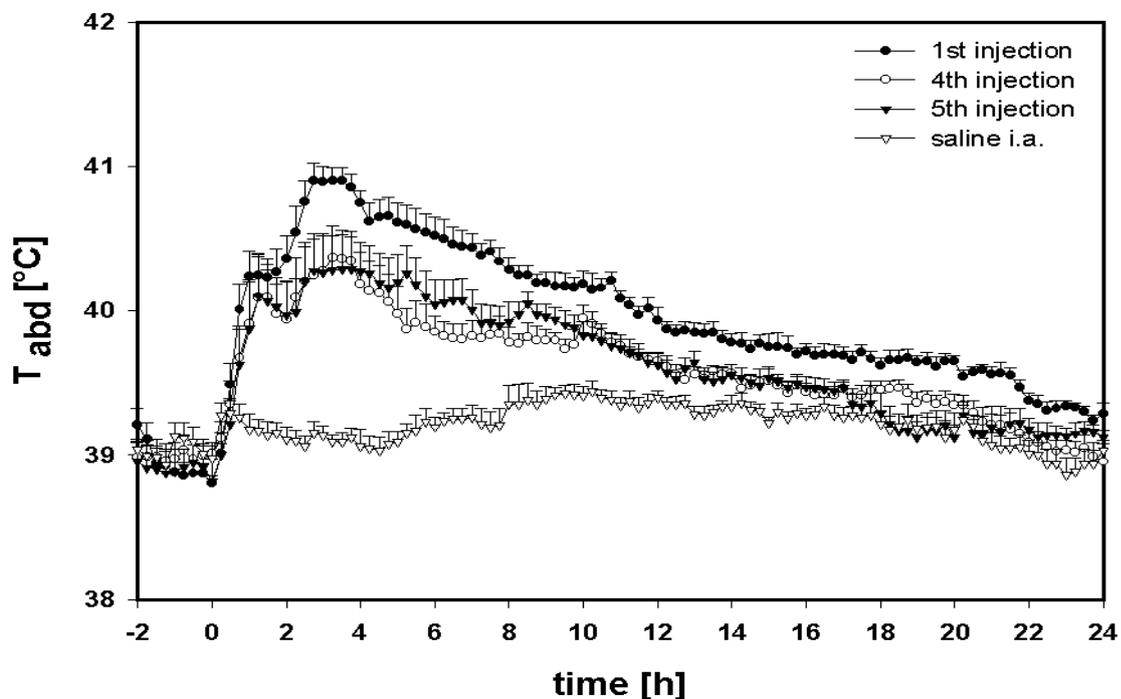


Abbildung 10: Verläufe der Körpertemperatur als Reaktion auf die vierte und fünfte wiederholte Injektion von PIPC im Vergleich zum ersten Fieber und den mit Saline behandelten Tieren (jeweils n=8) - alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Um die Dauer der Fieberreaktion zu bestimmen, wurden die Temperaturwerte der einzelnen Injektionstermine mit den Werten der Kontrollgruppe „Saline“ verglichen. Für die Zeiträume von 12 bis 20 Stunden bzw. 14 bis 20 Stunden ergab eine statistische Überprüfung für die fünfte Injektion keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe ($F = 3,883$; $p = 0,0689$; bzw. $F = 1,981$; $p = 0,1811$). Die vorherigen Injektionen zeigten in diesen Zeitspannen noch signifikant erhöhte Temperaturwerte.

Tabelle 7: Statistischer Vergleich der Fieberreaktionen nach wiederholten Injektionen im Zeitraum 0-150 min (ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test; n=8 bei allen Versuchsgruppen; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt)

	Injektion 1	Injektion 2	Injektion 3	Injektion 4	Injektion 5
Injektion 1	X	F = 2,547 p = 0,1347	F = 1,136 p = 0,3060	F = 0,921 p = 0,3536	F = 1,429 p = 0,2518
Injektion 2	-	X	F = 0,078 p = 0,7848	F = 0,021 p = 0,8882	F = 0,013 p = 0,9124
Injektion 3	-	-	X	F = 0,0056 p = 0,9417	F = 0,088 p = 0,7716
Injektion 4	-	-	-	X	F = 0,042 p = 0,8402

Tabelle 8: Statistischer Vergleich der Fieberreaktionen nach wiederholten Injektionen im Zeitraum 180-480 min (ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test; n=8 bei allen Versuchsgruppen; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt)

	Injektion 1	Injektion 2	Injektion 3	Injektion 4	Injektion 5
Injektion 1	X	F = 8,080 p = 0,0130	F = 15,303 p = 0,0016	F = 11,904 p = 0,0039	F = 5,807 p = 0,0303
Injektion 2	-	X	F = 1,102 p = 0,315	F = 0,359 p = 0,5588	F = 0,0048 p = 0,9456
Injektion 3	-	-	X	F = 0,203 p = 0,6594	F = 1,034 p = 0,3264
Injektion 4	-	-	-	X	F = 0,371 p = 0,5525

Tabelle 9: Statistischer Vergleich der Fieberreaktionen nach wiederholten Injektionen im Zeitraum 480-1200 min (ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test; n=8 bei allen Versuchsgruppen; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt)

	Injektion 1	Injektion 2	Injektion 3	Injektion 4	Injektion 5
Injektion 1	X	F =10,196 p = 0,0066	F = 20,048 p =0,0005	F = 18,657 p = 0,0007	F = 17,87 p = 0,0008
Injektion 2	-	X	F = 0,271 p = 0,6107	F = 0,018 p = 0,8964	F = 0,205 p = 0,6575
Injektion 3	-	-	X	F = 0,276 p = 0,6073	F = 0,0039 p = 0,9511
Injektion 4	-	-	-	X	F= 0,185 p = 0,6734

Im Zeitraum von 16 bis 20 h glich sich neben der fünften auch die vierte Fieberreaktion in ihrem Ausmaß den Werten der Kontrolltiere an (4.Inj.: F = 3,881, p = 0,0690; 5.Inj.: F = 0,279, p = 0,6058). Die erste bis dritte Injektion rief auch in dieser Zeitspanne signifikant erhöhte Körpertemperaturen hervor.

Die Fieberindices während der Helligkeitsperiode des Versuchstages sind in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigte sich ein Absinken der integrierten Fläche der Fieberreaktion im Zuge der ersten drei Injektionen. Die Fieberindices der vierten und fünften Injektion stiegen sukzessive wieder an ohne das Niveau der ersten Injektion zu erreichen. Eine statistische Auswertung ergab, dass lediglich der erste Fieberindex signifikant verschieden von den folgenden drei Fieberindices war. Der zweite bis vierte Index zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede. Der fünfte Index unterschied sich weder von dem ersten noch von den weiteren Fieberindices signifikant.

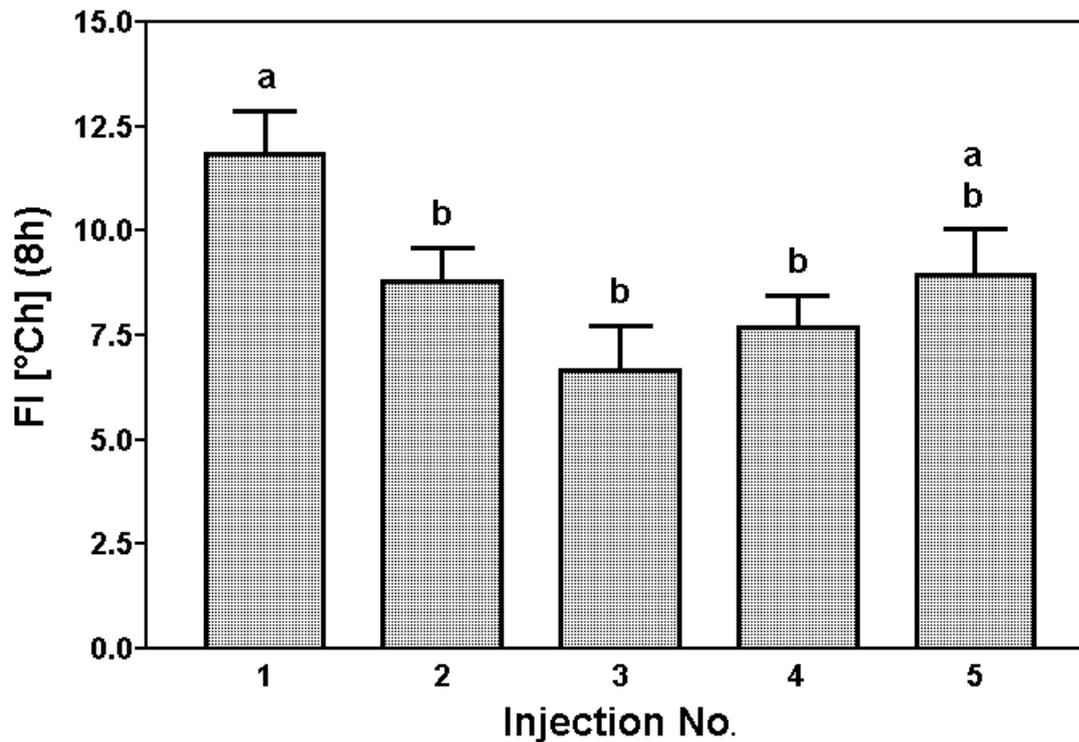


Abbildung 11: Fieberindices [°C·h](8h) nach wiederholter intraarterieller Injektion von 500 µg/kg PIPC (n=8) als Maß zur Quantifizierung der Stärke der Fieberreaktion, verschiedene Buchstaben über den Balken zeigen statistisch signifikante Unterschiede an, gleiche Buchstaben zeigen statistisch nicht signifikante Unterschiede an

Auch dieser Vergleich zeigte eine Abschwächung der Fieberreaktion in Folge der wiederholten Pyrogengaben, die jedoch nicht zur Unterdrückung der Fieberreaktion führte. Stattdessen deutete sich ab der vierten Injektion eine Verstärkung der Fieberreaktion an, die jedoch weder einer statistischen Überprüfung standhielt, noch den Wert der ersten Injektion erreichte.

Die Dauer des Fiebers wird hingegen im Laufe des Versuchsgeschehens signifikant verkürzt.

3.2.2 Zytokinspiegel nach wiederholter Injektion von PIPC

Zur Analyse der Zytokinfreisetzung als Reaktion auf die wiederholten Pyrogengaben standen für den Zeitpunkt +60 Minuten n=4 Plasmaproben zur Verfügung. Für den Zeitpunkt +120 Minuten konnten von den ersten vier Injektionsterminen jeweils 5 Plasmaproben gewonnen werden. Am letzten Versuchstag ließen sich nur noch von drei Tieren Blutproben gewinnen. Der Zeitpunkt +240 Minuten lieferte an den ersten drei Terminen jeweils 5 Proben, an den beiden folgenden Versuchstagen dagegen nur noch 4 Proben.

3.2.2.1 Tumor Nekrose Faktor α

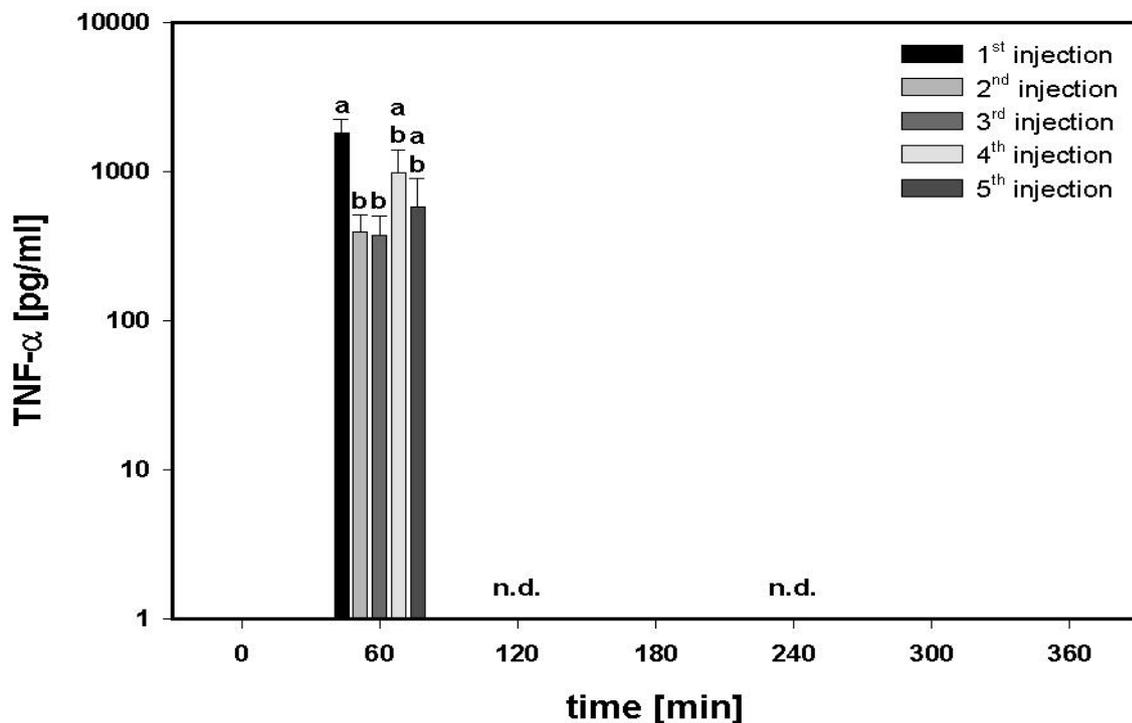


Abbildung 12: TNF- α Werte im Blutplasma nach wiederholten Pyrogengaben (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PIPC i.a.; n=4 zum Zeitpunkt +60 min). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den TNF Spiegeln, gleiche Buchstaben zeigen Mittelwerte ohne signifikante Unterschiede. Alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Abbildung 12 zeigt die TNF Spiegel im Blutplasma nach den wiederholten Injektionen von PIPC. TNF konnte ausschließlich zum Zeitpunkt 60 min nach der Injektion detektiert werden. Die Werte, die durch die zweite und dritte Pyrogengabe hervorgerufen wurden, sind signifikant niedriger als die zu Beginn des ersten Fiebers gemessenen Spiegel (F= 18,011; p= 0,0054; bzw. F= 17,025; p= 0,0062; ANOVA). Die TNF Freisetzung als Reaktion auf die vierte Injektion zeigte keinen signifikanten Unterschied zum ersten Versuch auf (F= 2,574; p= 0,1597; ANOVA). Ebenso verhielt es sich mit der Bildung von TNF auf die fünfte Gabe von PIPC (F= 5,682; p= 0,0545; ANOVA).

Die TNF Spiegel nach der zweiten bis fünften Injektion unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die p-Werte rangierten zwischen 0,2156 und 0,8210.

3.2.2.2 Interleukin-6

Abbildung 13 zeigt die Plasmaspiegel des Zytokins IL-6 zu den Zeitpunkten +60 min, +120 min und +240 min an den fünf Versuchstagen. Verglichen wurden jeweils die Werte zu einem bestimmten Zeitpunkt. Dabei zeigte sich, dass als Reaktion auf wiederholte Injektionen die Plasmaspiegel einer Reduktion unterworfen wurden. Der bei der einmaligen Injektion auftretende IL-6 Peak zum Zeitpunkt +120 min blieb jedoch nach allen Wiederholungsinjektionen erhalten.

Daten der statistischen Auswertung finden sich in Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12.

Im Gegensatz zu den TNF- Spiegeln blieb die Reduktion der IL-6 Spiegel im Vergleich zur ersten Injektion signifikant und relativiert sich nicht im Laufe des Versuchsgeschehens.

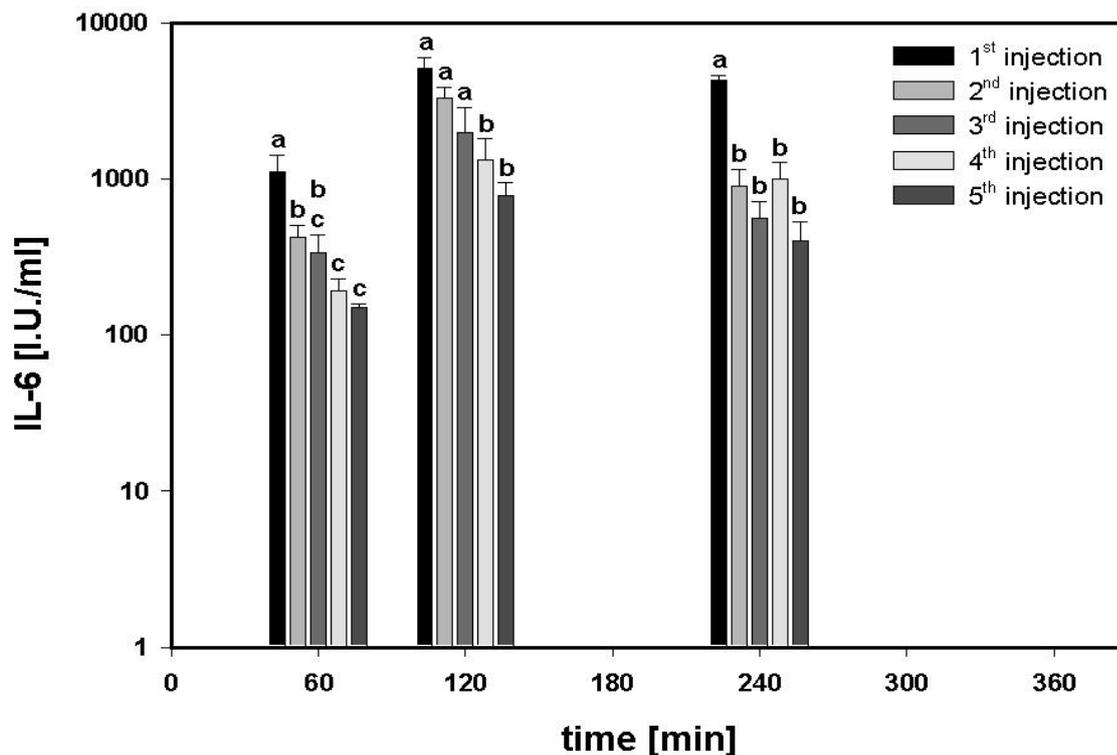


Abbildung 13: IL-6 Werte im Blutplasma nach wiederholten Pyrogengaben (500 µg/kg PIPC i.a.; +60 min: n=4; +120 min Injektion 1-4: n=5, Injektion 5: n=3; +240min Injektion 1-3: n=5, Injektion 4&5: n=4). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den IL-6 Spiegeln, gleiche Buchstaben zeigen Mittelwerte ohne signifikante Unterschiede. Alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Tabelle 10: Statistische Auswertung der IL-6 Werte 60 Minuten nach den wiederholten Injektionen von 500µg/kg PIPC (ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt)

	Injektion 1	Injektion 2	Injektion 3	Injektion 4	Injektion5
Injektion 1	X	F = 8,429 p = 0,0272	F = 9,526 p = 0,0215	F = 31,077 p = 0,0014	F = 60,002 p = 0,0002
Injektion 2	-	X	F = 0,544 p = 0,4885	F = 6,933 p = 0,0389	F = 18,259 p = 0,0052
Injektion 3	-	-	X	F = 1,464 p = 0,2717	F = 4,028 p = 0,0915
Injektion 4	-	-	-	X	F = 1,095 p = 0,3356

Tabelle 11: Statistische Auswertung der IL-6 Werte 120 Minuten nach den wiederholten Injektionen von 500µg/kg PIPC (ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt)

	Injektion 1	Injektion 2	Injektion 3	Injektion 4	Injektion5
Injektion 1	X	F = 1,347 p = 0,2793	F = 5,245 p = 0,0512	F = 22,700 p = 0,0014	F = 19,665 p = 0,0044
Injektion 2	-	X	F = 2,882 p = 0,1280	F = 6,761 p = 0,0316	F = 19,368 p = 0,0046
Injektion 3	-	-	X	F = 6,761 p = 0,0316	F = 19,368 p = 0,0046
Injektion 4	-	-	-	X	F = 0,368 p = 0,5665

Tabelle 12: Statistische Auswertung der IL-6 Werte 240 Minuten nach den wiederholten Injektionen von 500µg/kg PIPC (ANOVA mit anschließendem Scheffé-Test; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt)

	Injektion 1	Injektion 2	Injektion 3	Injektion 4	Injektion5
Injektion 1	X	F = 34,642 p = 0,0004	F = 60,074 p < 0,0001	F = 22,279 p = 0,0015	F = 36,532 p = 0,0005
Injektion 2	-	X	F = 1,456 p = 0,2621	F = 0,013 p = 0,9112	F = 3,044 p = 0,1246
Injektion 3	-	-	X	F = 1,423 p = 0,2671	F = 0,763 p = 0,4114
Injektion 4	-	-	-	X	F = 2,878 p = 0,1336

3.3 Einfluss von Cyclooxygenaseinhibitoren

Um die Abhängigkeit des PIPC- Fiebers von der Aktivität der Cyclooxygenasen zu überprüfen, wurden den Meerschweinchen zusammen mit dem Pyrogen Cyclooxygenaseinhibitoren verabreicht.

3.3.1 Diclofenac

Die gleichzeitige intraarterielle Injektion von 5 mg/kg Diclofenac zusammen mit 500 µg/kg PIPC bewirkte eine vollständige Unterdrückung der Fieberreaktion (Abbildung 14).

Aus Abbildung 15 wird deutlich, dass sich im Zuge der Fieberunterdrückung durch Diclofenac eine leichte Hypothermie zwischen der vierten und achten Stunde nach der Injektion manifestierte und einen Minimalwert von 38,57°C zum Zeitpunkt 390 min nach der Injektion erreichte. Mit Beginn der Dunkelheitsperiode glich sich die Temperaturkurve der mit Pyrogen und Antiphlogistikum behandelten Tieren den Werten der Tiere an, denen Diclofenac zusammen mit Saline injiziert wurde (Abbildung 15).

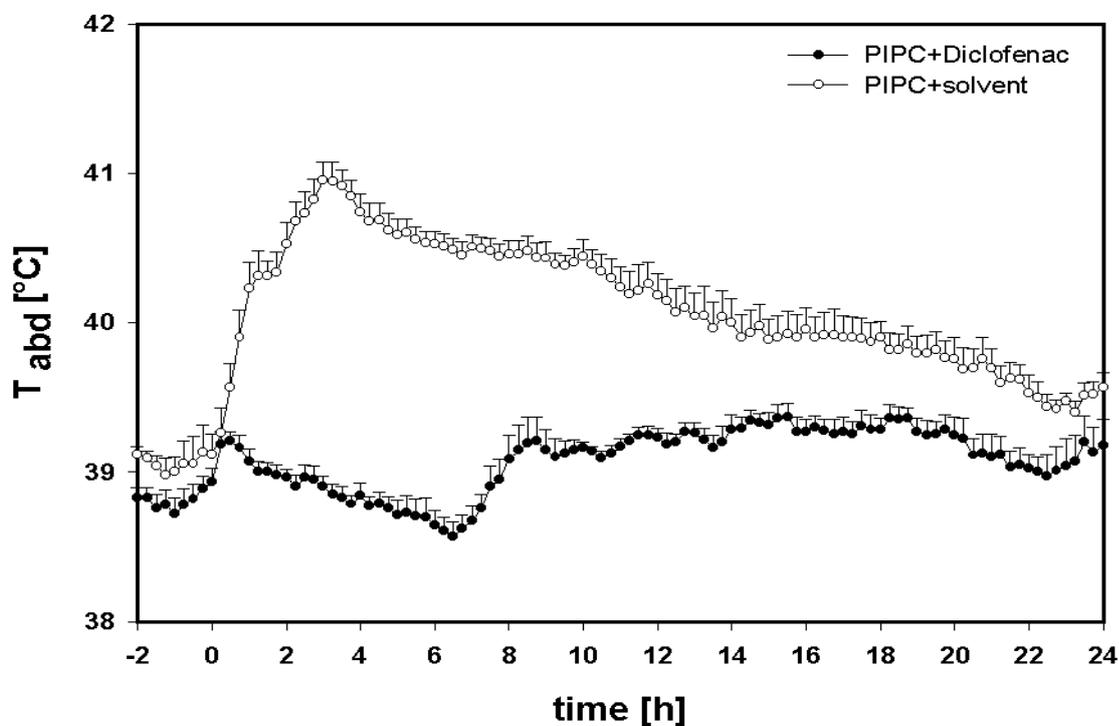


Abbildung 14: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von 500 µg/kg PIPC mit 5 mg/kg Diclofenac (n=8) bzw. PIPC mit dem Lösungsmittel für Diclofenac (n=7) - alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

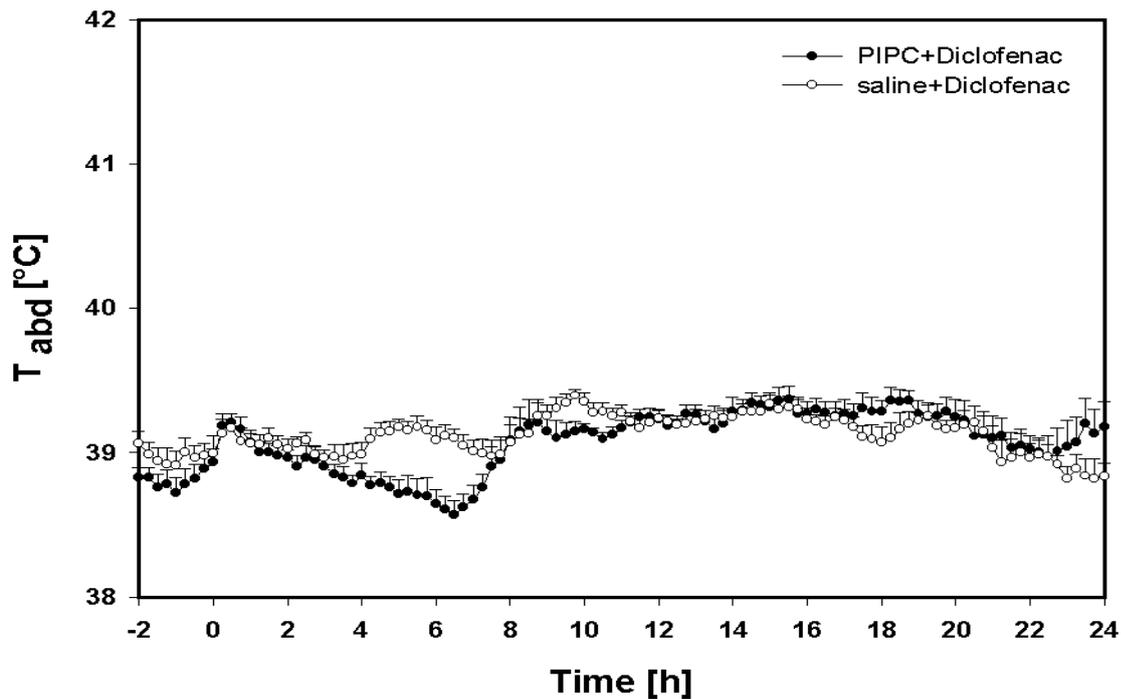


Abbildung 15: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von 500 µg/kg PIPC mit 5mg/kg Diclofenac (n=8) bzw. NaCl mit Diclofenac (n=8) - alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Die Unterdrückung der Fieberreaktion durch das Diclofenac war sowohl für die Helligkeitsperiode (+60 min bis +480 min) als auch für die anschließende Dunkelheitsperiode (+510min bis +1200min) hochsignifikant ($F = 266,561$, $p < 0,0001$; bzw. $F = 37,657$, $p < 0,0001$; ANOVA).

Vergleicht man den Zeitraum des Temperaturabfalls (+270 min bis +450 min) nach gleichzeitiger Injektion von Pyrogen und Antiphlogistikum mit den Temperaturen nach gemeinsamer Injektion von Lösungsmittel des Pyrogens und Diclofenac, so ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($F = 11,324$, $p = 0,046$).

Um einen Einfluss von Diclofenac in Abwesenheit von PIPC auf die Körpertemperatur auszuschließen, wurden jeweils 8 Tiere mit Saline und Diclofenac bzw. Saline und dem Lösungsmittel von Diclofenac behandelt. Aus Abbildung 16 wird ersichtlich, dass die Temperaturverläufe nahezu kongruent waren. Die Schwankungen bewegen sich im Rahmen der statistischen Streuung.

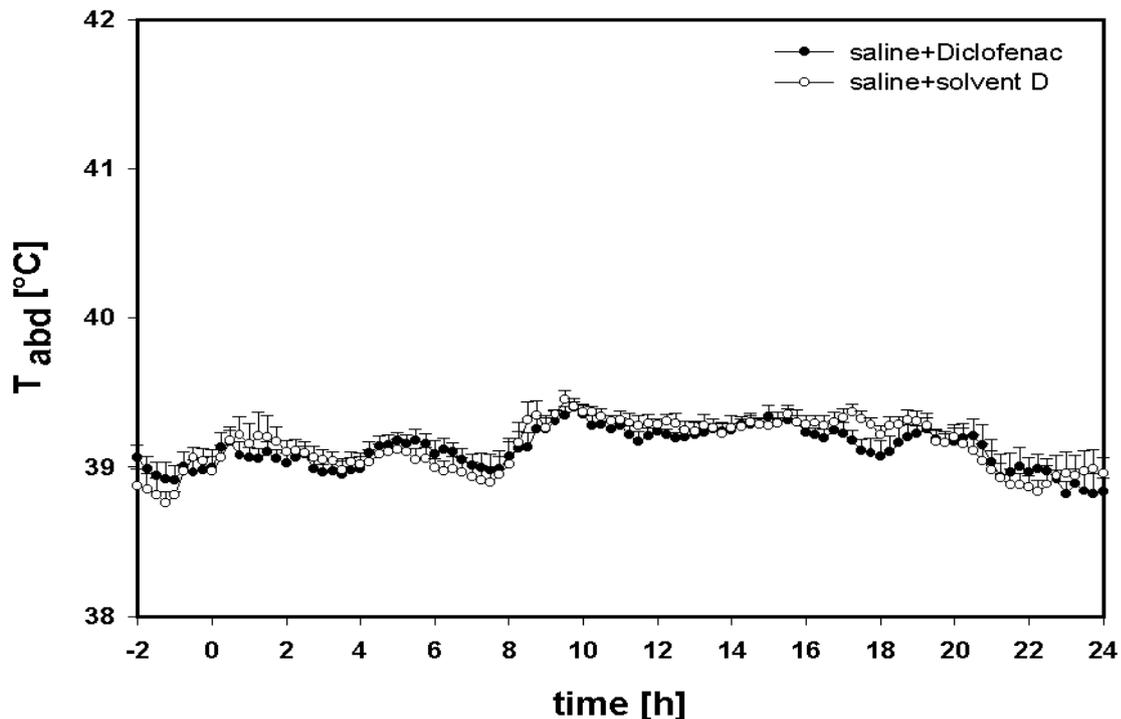


Abbildung 16: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von Saline und Diclofenac im Vergleich zu den Temperaturen nach Injektion von Saline und dem Lösungsmittel von Diclofenac (jeweils n=8) – alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Die TNF Plasmaspiegel (Abbildung 17) lagen 60 min nach Injektion von PIPC und Diclofenac bei 6926 ± 6469 pg/ml und sind damit nicht signifikant verschieden von den Werten der Tiere, denen anstelle des Diclofenac dessen Lösungsmittel verabreicht wurde (10616 ± 3029 pg/ml; $F = 1,859$, $p = 0,2445$; ANOVA; $n=3$ für alle Werte).

120 Minuten nach der Injektion war lediglich bei einem der Tiere mit unterdrückter Fieberreaktion ein TNF Gehalt des Plasmas von 329 pg/ml festzustellen. Die beiden anderen Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt keine nachweisbaren Plasmaspiegel dieses Zytokins. Die Daten dieses Zeitpunktes entzogen sich somit einer statistischen Auswertung.

Zu den Zeitpunkten -60 und +240 min lagen bei keinem Tier, welches mit PIPC und Diclofenac beziehungsweise dessen Lösungsmittel behandelt wurde, detektierbare Plasmaspiegel von TNF vor ($n=3$ für alle Gruppen).

In Abbildung 18 sind die IL-6 Spiegel der Tiere gezeigt, die mit Diclofenac, bzw. dessen Lösungsmittel, zusammen mit PIPC behandelt wurden. Hier zeigte sich ebenfalls keine signifikante Beeinflussung der Zytokinwerte durch den Cyclooxygenase Inhibitor (60 min: $F = 1,131$, $p = 0,3476$; 120 min: $F = 0,774$, $p = 0,4287$; 240 min: $F = 6,318 \times 10^{-4}$, $p = 0,9812$).

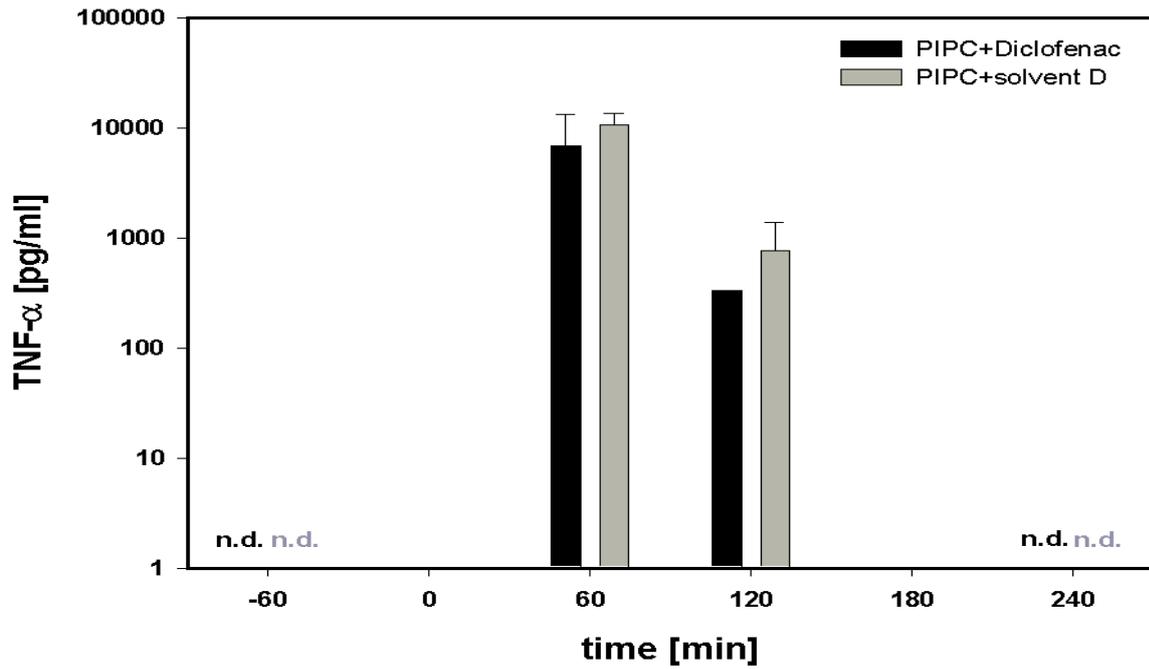


Abbildung 17: TNF Spiegel im Plasma der Versuchstiere nach Koinjektion von 500 µg/kg PIPC mit 5 mg/kg Diclofenac oder dessen Lösungsmittel (jeweils n=3 außer PIPC+ Diclofenac n=1) alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt

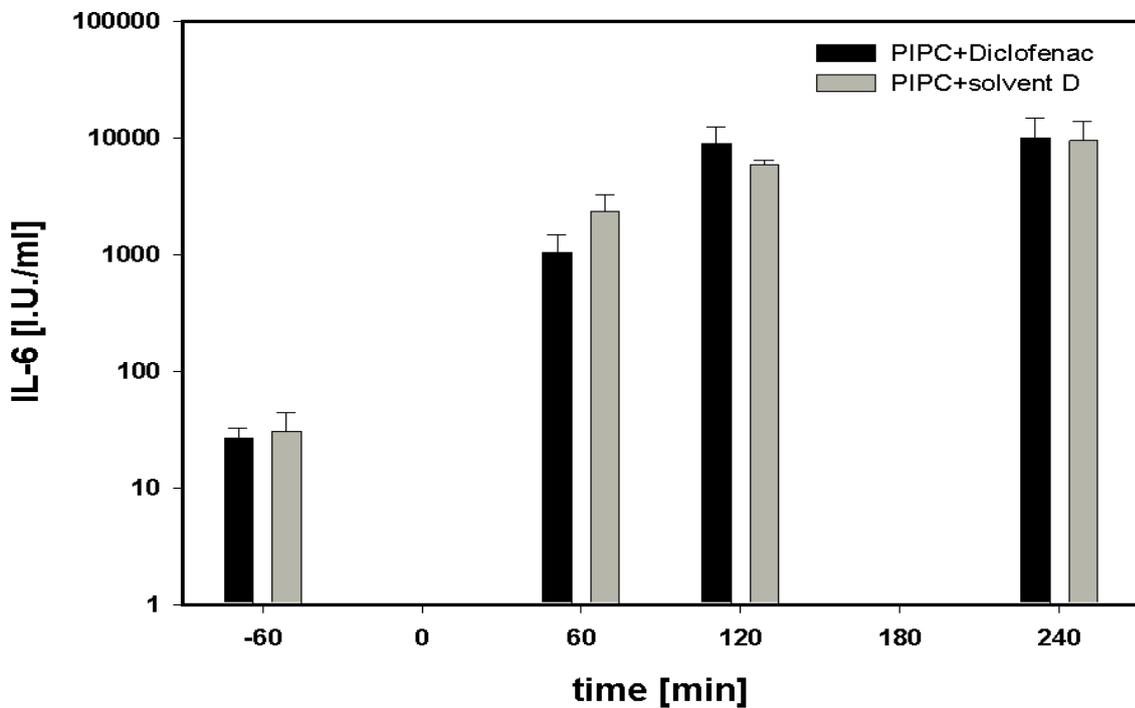


Abbildung 18: IL-6 Spiegel im Plasma der Versuchstiere nach Koinjektion von 500 µg/kg PIPC mit 5mg/kg Diclofenac oder dessen Lösungsmittel (jeweils n=3) alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Bei den Kontrollgruppen Saline + Diclofenac und Saline + Solvent D war bei keinem Tier zirkulierendes TNF zu detektieren (n=3 für beide Gruppen und die Zeitpunkte -60, +60, +120 und +240 min). Die IL-6 Werte der beiden Gruppen zu denselben Zeitpunkten lagen im Mittel allesamt zwischen 10 und 61 I.U./ml und zeigten ebenfalls keine Beeinflussung durch die Injektionen.

3.3.2 Nimesulide

Die gleichzeitige Gabe von 5 mg/kg Nimesulide und 500 µg/kg PIPC bewirkte eine signifikante Unterdrückung der frühen Fieberreaktion $F = 24,114$, $p = 0,0027$ für den Zeitraum +90 bis +240 Minuten; ANOVA; PIPC + Nimesulide: $n = 6$, PIPC + Solvent: $n = 4$). Die sich in Abbildung 19 abzeichnende Verlängerung der Fieberreaktion bei den mit PIPC und Nimesulide behandelten Tieren erwies sich für den Zeitraum von 660 Minuten bis 1080 Minuten nach der Injektion jedoch als nicht signifikant ($F = 3,337$, $p = 0,1175$).

Um einen Einfluss von Nimesulide in Abwesenheit von PIPC auf die Körpertemperatur auszuschließen, wurden jeweils 4 Tiere mit Saline und Nimesulide bzw. Saline und dem Lösungsmittel von Nimesulide behandelt. Aus Abbildung 20 wird ersichtlich, dass die Temperaturverläufe nahezu kongruent waren.

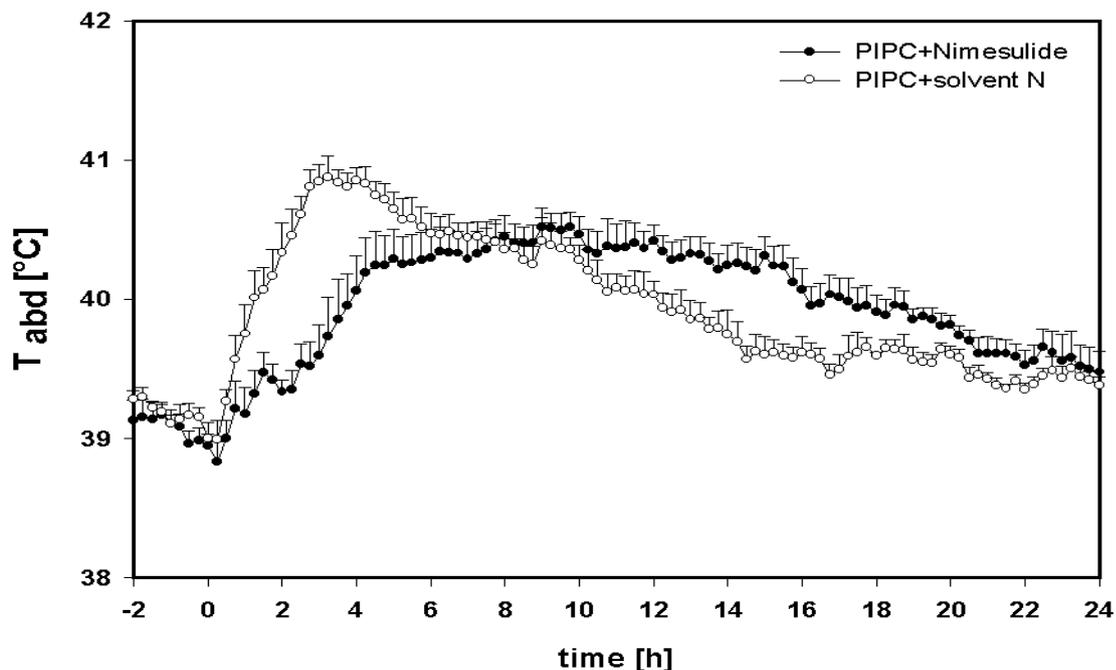


Abbildung 19: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von 500 µg/kg PIPC mit 5 mg/kg Nimesulide (n=6) bzw. PIPC mit dem Lösungsmittel von Nimesulide (n=4) - alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

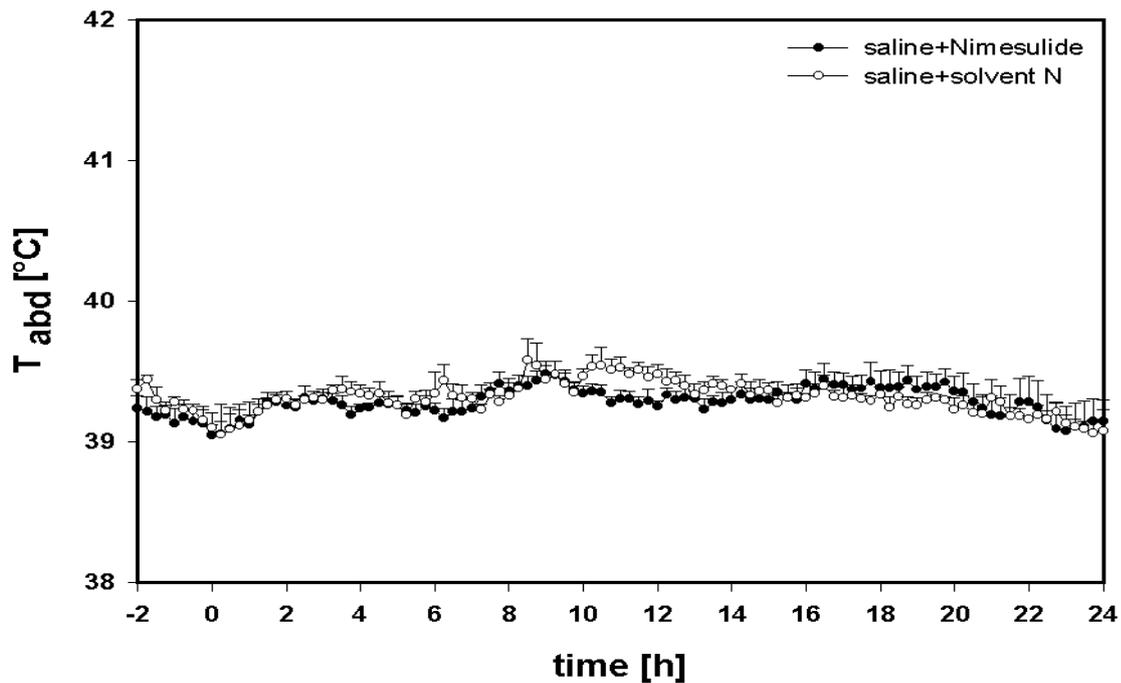


Abbildung 20: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von Saline und Nimesulide im Vergleich zu den Temperaturen nach Injektion von Saline und dem Lösungsmittel von Nimesulide (jeweils n=4) – alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Da von allen Tieren, die zur Untersuchung des selektiven Cox-2-Hemmers Nimesulide sowohl zum Zeitpunkt +60 min als auch 120 min nach der Injektion Blutproben gesammelt werden konnten, entsprechen die n-Zahlen der Zytokinanalytik denen der Verläufe der Körpertemperatur. Für den Tumor Nekrose Faktor (Abbildung 21) ergaben sich 60 Minuten nach der Injektion Werte von $3677 \pm 1045 \text{ pg/ml}$ (PIPC + Nimesulide) und $7528 \pm 4488 \text{ pg/ml}$ (PIPC + Solvent N). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($F = 9,713 \times 10^{-3}$, $p = 0,9239$; ANOVA). 120 Minuten nach der Injektion konnte bei 3 Tieren der Nimesulide/ PIPC Gruppe ein TNF Spiegel von durchschnittlich $88 \pm 10 \text{ pg/ml}$ im Plasma nachgewiesen werden. Die anderen drei stimulierten Tiere zeigten keine detektierbaren TNF Konzentrationen im Blut. Von den Kontrolltieren war bei einem Tier kein TNF nachzuweisen, bei den übrigen lagen durchschnittlich $130 \pm 32 \text{ pg/ml}$ TNF im Plasma vor. Hier zeigte sich ebenfalls keine signifikante Änderung ($F = 1,617$, $p = 0,2724$; ANOVA).

In Abbildung 22 sind die IL-6 Spiegel der Tier gezeigt, denen Nimesulide, bzw. dessen Lösungsmittel zusammen mit PIPC injiziert wurde. Hier zeigte sich ebenfalls keine signifikante Beeinflussung der Zytokinwerte durch den Cox-2-Inhibitor (60 min: $F = 0,917$, $p = 0,3664$; 120 min: $F = 0,323$, $p = 0,5855$).

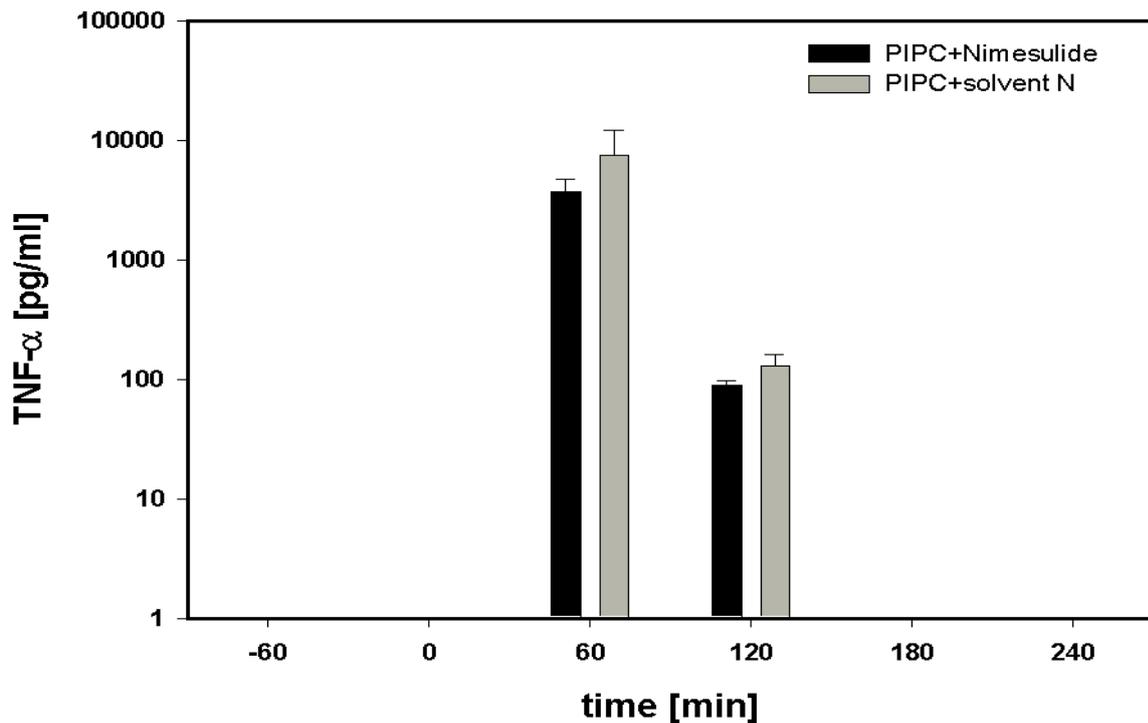


Abbildung 21: TNF Spiegel im Plasma der Versuchstiere nach Koinjektion von 500 µg/kg PIPC mit 5 mg/kg Nimesulide oder dessen Lösungsmittel (n=6 für PIPC+ Nimesulide +60min, n=4 für PIPC+ Solvent N +60 min, jeweils n=3 für +120 min) alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt

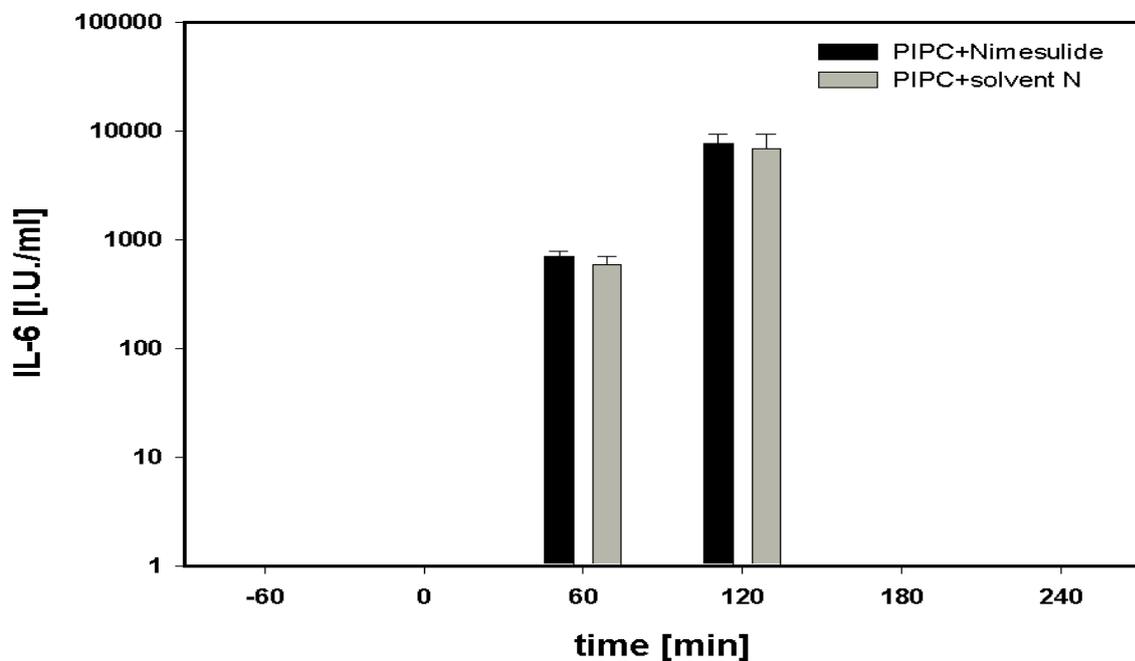


Abbildung 22: IL-6 Spiegel im Plasma der Versuchstiere nach Koinjektion von 500 µg/kg PIPC mit 5 mg/kg Nimesulide oder dessen Lösungsmittel (n=6 für beide Zeitpunkte von PIPC+ Nimesulide, n=4 für beide Zeitpunkte PIPC+ Solvent N) alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Bei den Kontrollgruppen Saline + Nimesulide und Saline + Solvent N konnte bei keinem Tier weder zum Zeitpunkt +60 noch +120 min zirkulierender TNF detektiert werden. Die IL-6 Werte der beiden Gruppen lagen im Mittel allesamt zwischen 37 und 49 I.U./ml und blieben durch die Injektion unbeeinflusst.

3.4 Nachweis der Cox-2 Induktion im Gehirn

Da die durch PIPC induzierte Fieberreaktion offensichtlich von Produkten der Cyclooxygenase abhängig war, sollte eine mögliche PIPC induzierte Expression der Cox-2 im Gehirn untersucht werden.

180 Minuten nach systemischer Stimulation mit PIPC wurden vier Tieren das Gehirn entnommen, um mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung die Expression von Cox-2 mRNA zu detektieren. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der pyrogenen Stimulation wurde die Fieberreaktion bis zur Euthanasie telemetrisch aufgezeichnet (Abbildung 23).

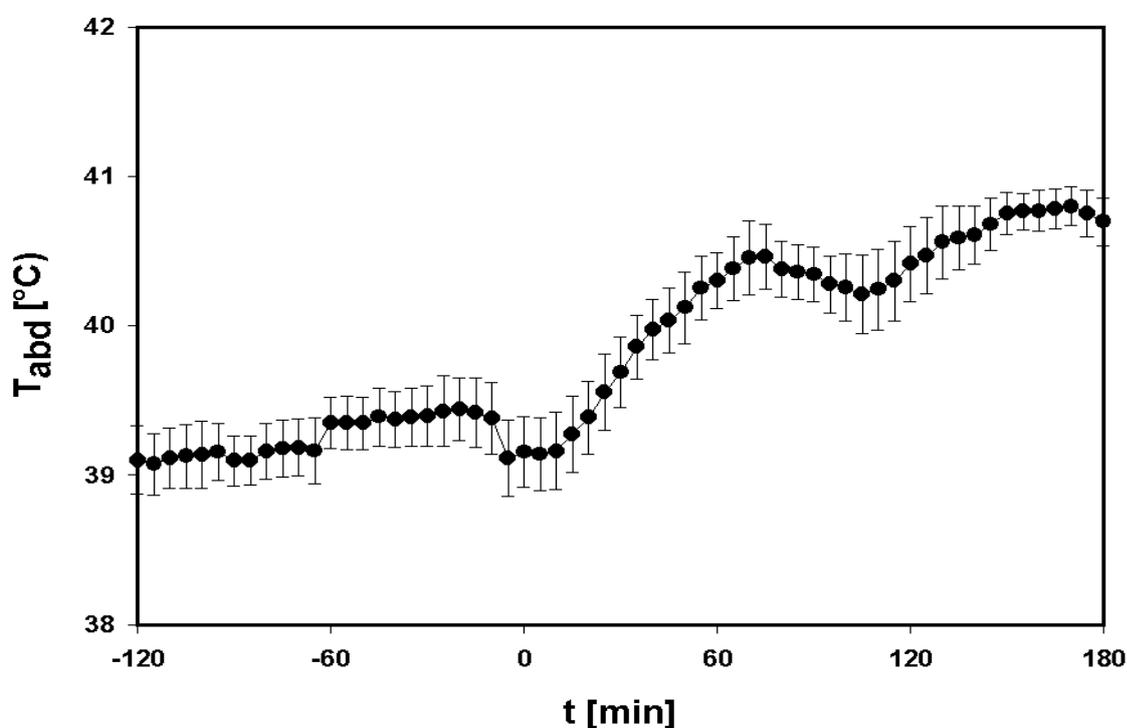


Abbildung 23: Körpertemperatur der für die *in situ* Hybridisierung mit PIPC stimulierten Tiere (n=4) - alle Injektionen fanden zum Zeitpunkt t=0 statt.

Drei Stunden nach Stimulation mit PIPC manifestierte sich die bereits in Kap. 3.1 beschriebene Fieberreaktion. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte aufgrund der Labilität der mRNA eine möglichst zügige Präparation der Gehirne. Daher wurde bei diesen Tieren auf die Entnahme einer Blutprobe verzichtet.

Im Vergleich zu unstimulierten Kontrolltieren, die gemeinsam mit den stimulierten Tieren prozessiert wurden, wurden im gesamten Gehirn einzelne Cox-2 Signale entlang von Blutgefäßen gefunden. Des Weiteren konnte eine Häufung der Cox-2 mRNA in den

sensorischen zirkumventrikulären Organen der *Lamina terminalis*, insbesondere im Subfornikalorgan (SFO) nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass in diesen Gebieten nach systemischer PIPC Stimulation eine verstärkte Prostaglandinsynthese stattfindet. Im Subfornikalorgan, aber auch im *Plexus choroideus* war neben den COX-2-Signalen auch IL-1b auf mRNA-Ebene nachweisbar.

Zusammen mit der Unterdrückung der Fieberreaktion durch Cyclooxygenase Inhibitoren (Kap. 3.3) zeigt dieser Befund eine Abhängigkeit der Fieberreaktion auf pyrogene Reize von der Bildung von Arachidonsäuremetaboliten in spezifischen Gehirnstrukturen.

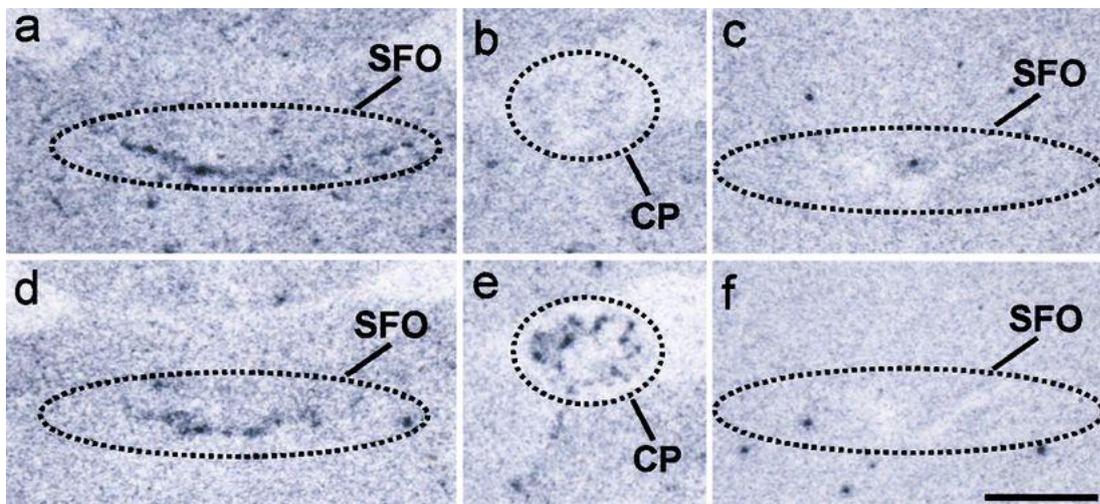


Abbildung 24: Nachweis der mRNA der induzierbaren Cyclooxygenase (COX-2, a-c) und Interleukin-1 β (d-f) im Subfornikalorgan (SFO) und im *Plexus choroideus* (CP) nach Stimulation durch 500 μ g/kg PIPC i.a. (a, b, d, e). Kontrolltiere (c, f) wurden steriler Kochsalzlösung behandelt. Schwärzungen auf den mit Röntgenfilm beschichteten Objektträgern zeigen radioaktive Signale der mRNA für COX-2 bzw. IL-1 β an. Diese Signale traten im SFO der mit PIPC behandelten Tiere auf (a, b) und waren in den Kontrollen kaum nachweisbar (c, f). Signale der IL-1 β -mRNA traten auch im *Plexus choroideus* (CP) der mit PIPC stimulierten Tiere auf (e), während COX-2 in dieser Hirnstruktur auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar war (b). Der schwarze Balken in f entspricht 1mm.

3.5 Immunhistochemischer Nachweis der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3

Um zu untersuchen, ob nach Stimulation mit PIPC eine direkte Aktivierung febriler Gehirnstrukturen dokumentierbar ist, wurden die Gehirne von 5 intraarteriell mit 500µg/kg PIPC stimulierten Meerschweinchen 120 Minuten nach der Injektion zum Nachweis nukleärer Translokationen des Transkriptionsfaktors STAT3 entnommen. Der Erfolg der pyrogenen Stimulation wurde wiederum mittels Telemetrie (Abbildung 25) und Zytokinanalytik sichergestellt. Die mittleren IL-6 Plasmaspiegel betragen zum Zeitpunkt der Perfusion 4684pg/ml ±1434pg/ml.

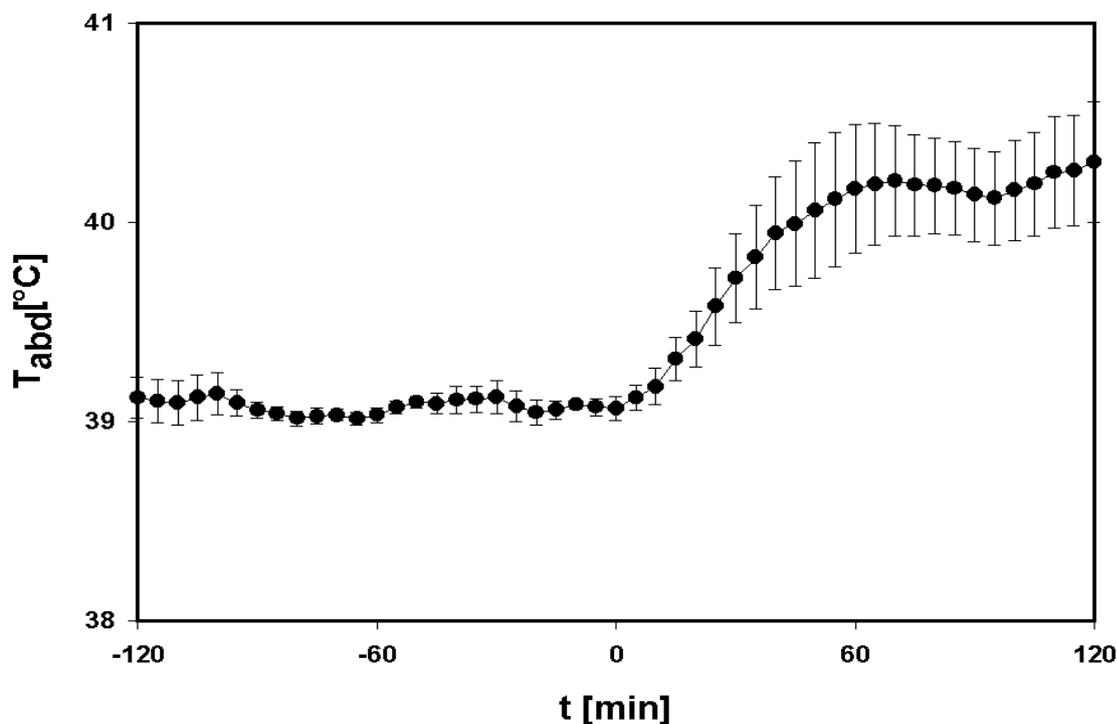


Abbildung 25: Körpertemperatur der für die DAB-Immunhistochemie mit PIPC stimulierten Tiere (n=5) die Injektion von PIPC erfolgte zu Zeitpunkt t=0

Die STAT3 spezifische Immunreaktivität stellte sich als braunes Präzipitat dar, das im Falle der nukleären Translokationen mit der Kresylviolett Kernfärbung kolokalisiert war beziehungsweise diese überdeckte.

In der *Lamina Terminalis* des dritten Ventrikels konnte in Zellen der sensorischen zikumventrikulären Organen, dem *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und dem *Organum subfornikale* (SFO), STAT3 spezifische Immunreaktivitäten nachgewiesen

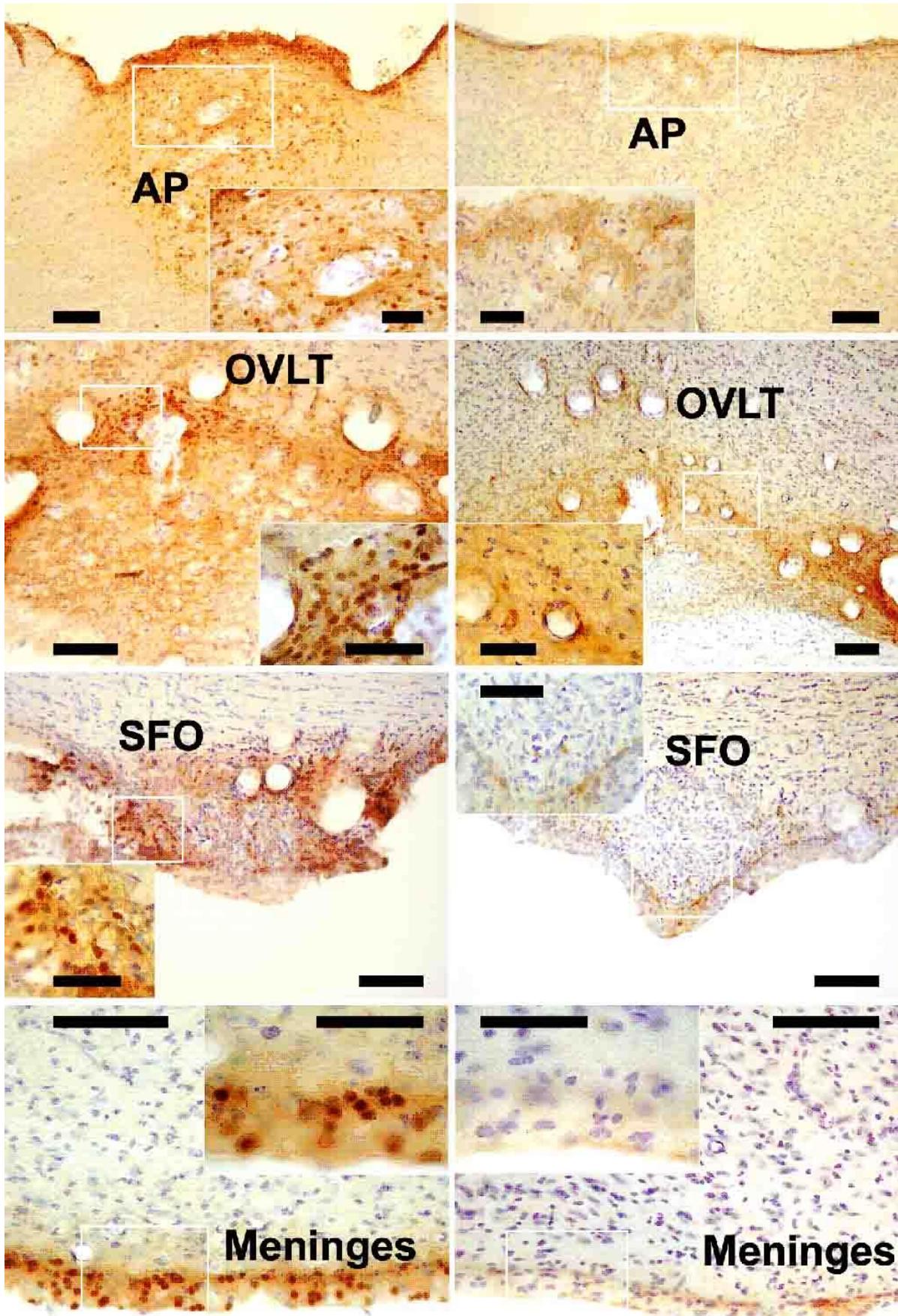
werden. Als weitere Region mit starker STAT3 Aktivierung stellte sich die *Area postrema* in der *Medulla oblongata* dar.

Des Weiteren fanden sich auch in den Meningen nukleäre STAT3 Signale. Da diese über die gesamte Hirnoberfläche verteilt anzutreffen waren, konnte für die Meningen keine spezifische Lokalisation ausgemacht werden.

In den CVOs fanden sich STAT3 Signale sowohl gefäßassoziiert als auch im Parenchym. Die abgeflachten Zellkerne an der Begrenzung des Gefäßlumens, die sich in allen drei CVOs zeigten (Abbildung 26), ließen sich aufgrund ihrer Morphologie und Lokalisation als *Nuklei* von Endothelzellen identifizieren. Bei den übrigen Zellkernen war eine weitere Differenzierung der Zelltypen mit dieser immunhistochemischen Methode nicht zweifelsfrei möglich.

Da die sensorische zirkumventrikulären Organe keine vollständige Bluthirnschranke aufweisen, lässt sich feststellen, dass sich die nukleären STAT3 Signale nicht innerhalb der von der Bluthirnschranke abgegrenzten Gebiete detektieren ließen.

Abbildung 26 (nächste Seite): Nukleäre Translokationen des Transkriptionsfaktor STAT3 in Zellen der zirkumventrikulären Organe (CVO), der Area postrema (AP), des Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), des Subfornikalorgans (SFO) und in den Meningen. Die spezifische STAT3 Immunreaktivität stellt sich als braunes Reaktionsprodukt der Diaminobenzidin Hydrochlorid Konversion dar. Kresylviolett wurde zur Kernfärbung und zur Darstellung der allgemeinen Neuroanatomie verwendet. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren (rechte Spalte) wurden in den Gehirnen der mit 500 µg/kg PIPC stimulierten Tiere 2 Stunden nach der Injektion in den CVO und den Meningen nukleäre STAT3 Signale nachgewiesen. (Die Balken in den Übersichten entsprechen 100 µm, die in den Vergrößerungen 50µm).



3.6 Charakterisierung der STAT3 aktivierten Zelltypen

Zur Differenzierung der Zelltypen, die eine nukleäre STAT3 Translokation erfahren, wurden immunhistochemische Mehrfachmarkierungen mit zellspezifischen Markern an den Gehirnen von vier Tieren durchgeführt.

Der Erfolg der pyrogenen Stimulation wurde bei dieser Versuchsserie ebenfalls mittels telemetrischer Erfassung der Körpertemperatur (Abbildung 27) und Zytokinanalytik überprüft. Die mittleren IL-6 Plasmaspiegel betragen zum Zeitpunkt der Perfusion 9255 ± 6257 I.U./ml

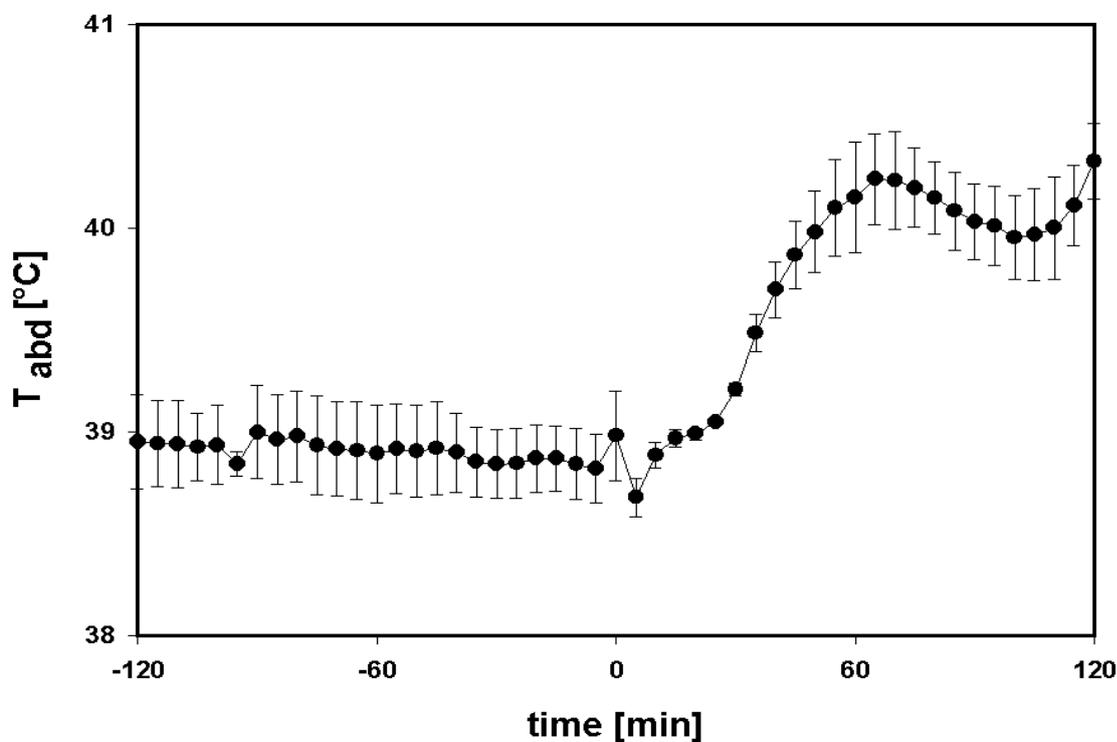


Abbildung 27: Körpertemperatur der für die immunhistochemischen Mehrfachmarkierungen mit PIPC stimulierten Tiere (n=4) die Injektion von PIPC erfolgte zu Zeitpunkt t=0

STAT3 Signale zeigten eine rote Fluoreszenz, die mit DAPI markierten Zellkerne eine blaue. Nukleäre STAT3 Translokationen stellten sich durch Überlagerung dieser Farben als rosa bis rote Signale dar.

Die jeweiligen zellspezifischen Marker vWF (Endothelzellen), GFAP (Astrozyten) und NeuN (Neurone) wurden mit grüner Farbe abgebildet (Abbildung 28).

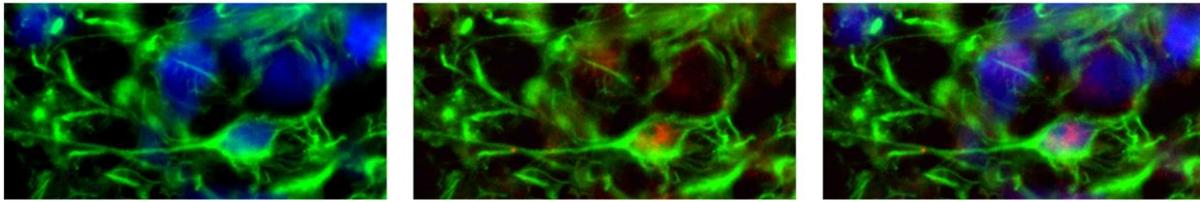


Abbildung 28: Beispiel für die Überlagerung der einzelnen Farbkomponenten: Links sieht man die DAPI markierten Zellkerne blau dargestellt. Gleichzeitig ist auf allen Bildern der Astrozytenmarker GFAP grün eingefärbt. Im mittleren Bild sieht man die STAT3 Immunreaktivität, die mit roter Fluoreszenz sichtbar gemacht wurde. Durch Übereinanderlagerung der einzelnen Farbkomponenten lässt sich dem rechten Bild entnehmen, dass die STAT3 Immunreaktivität mit DAPI kolokalisiert ist und damit im Nucleus zu finden ist. Zur zellulären Phänotypisierung, die der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 unterworfen war, konnte durch Markierung des sauren Gliafaserproteinrings um den Zellkern die Zelle als Astrozyt identifiziert werden. Analog hierzu wurden durch Antikörper gegen den von Willebrand Faktor bzw. das neuronenspezifische nukleäre Protein Endothelzellen und Neurone identifiziert.

Da für die Mehrfachmarkierungen eine modifizierte Perfusionstechnik verwendet wurde (Kap. 2.2.1.9), war mit dieser Methode ein stärkerer Nachweis der STAT3 Translokationen zu beobachten. Hierbei wurden die Gehirne nicht perfusionsfixiert, sondern erst im Anschluss an das Anfertigen der Schnitte eine Immersionsperfusion durchgeführt (Kap. 2.2.3.4, Tabelle 4). Zudem enthielt die Fixationslösung nur 2% Paraformaldehyd statt 4%. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere bei den Endothelien, die bei der immunenzymatischen Methode ausschließlich in den CVOs STAT3 Signale aufwiesen. Mit der schwächeren Fixationsmethode konnte in Endothelien im gesamten Gehirn eine nukleäre STAT3 Immunreaktivität nachgewiesen werden. Zellen außerhalb der CVOs, die STAT3 Signale aufwiesen, waren nahezu ausnahmslos mit Signalen des vW-Faktors kolokalisiert und konnten so als Endothelzellen identifiziert werden (Abbildung 33).

Die in Kapitel 3.5 getroffene Aussage, dass es sich bei einigen in den CVO vorhandenen STAT3 Signal tragenden Zellen aufgrund von Morphologie und Lokalisation um Endothelzellen handelt, konnte mit Hilfe der spezifischen Markierung des von Willebrand-Faktors bestätigt werden (Abbildung 29, Abbildung 30 und Abbildung 31, jeweils links oben). Es zeigte sich aber auch, dass die nukleären Translokationen der STAT3 Signale sich nicht auf Endothelien beschränkten.

In den Bildern jeweils rechts neben den Detektionen des vW-Faktors sind die sauren Gliafaserproteine (GFAP) wiederum mit grüner Fluoreszenz markiert. Man erkennt in Abbildung 29 einen breiten Wall von Astrozyten um das OVLT herum. Innerhalb dieses CVO konnte wiederum keine Immunreaktivität dieses Proteins nachgewiesen werden. Kolokalisationen von STAT3 Signalen mit Astrozyten ließen sich im Randbereich des OVLT

feststellen. Die im Zentrum dieser Hirnregion gelegenen Zellen zeigen zwar zu einem Großteil STAT3-, aber keinerlei GFAP- Immunreaktivität, und stellen somit einen anderen zellulären Phänotyp als Astrozyten dar.

Im *Organum subfornicale* (Abbildung 30) stellte sich ein etwas modifiziertes Bild dar. Wieder war eine große Anzahl der im SFO vorkommenden Zellkerne STAT3 positiv. Kolokalisationen dieser Zellen mit dem sauren Gliafaserprotein fanden sich vorwiegend im Randbereich dieser Struktur. Im Zentrum hingegen waren vereinzelte STAT3 positive Astrozyten zu erkennen, jedoch nicht ausreichend viele, um die einzige genomisch aktivierte Zellpopulation neben den Endothelzellen in dieser Hirnregion zu repräsentieren.

Die rostralen und caudalen Begrenzungen des SFO stellten ebenfalls ein Wall aus GFAP positiven Zellen dar, so dass das Subfornikalorgan als mehr oder weniger kugeliges Gebilde gesehen werden kann, das von einer Schicht aus Astrozyten umgeben ist und im Inneren ebenfalls einzelne Astrozyten besitzt.

Die stärksten Kolokalisationen des sauren Gliafaserproteins mit STAT3 Immunreaktivität fanden sich in der *Area postrema*. Hier zeigten die STAT3 Signale ein besonderes Verteilungsmuster. Sie waren in den mittleren Abschnitten besonders an der Grenze zu dem *Nucleus gracilis* und *Nucleus tractus solitarius* angeordnet. Caudale Schnitte der AP zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Signale über die gesamte Schnittfläche dieser Hirnregion, so dass sich in der räumlichen Projektion ein caudaler Abschluss der *Area postrema* mit Zellen mit nukleären STAT3 Signalen ergab. Cranial stellte die AP einen Gewebesteg dar, der sich im Bereich des Übergangs des vierten Ventrikels in den Zentralkanal über diesen spannt. Hier war die Signalverteilung vornehmlich auf die Grenzbereiche zu den umliegenden Strukturen beschränkt und glich damit den mittleren Abschnitten.

Das Zentrum der AP zeigte zwar ebenfalls STAT3 positive Zellkerne, jedoch waren diese sowohl in Intensität als auch Häufigkeit vermindert.

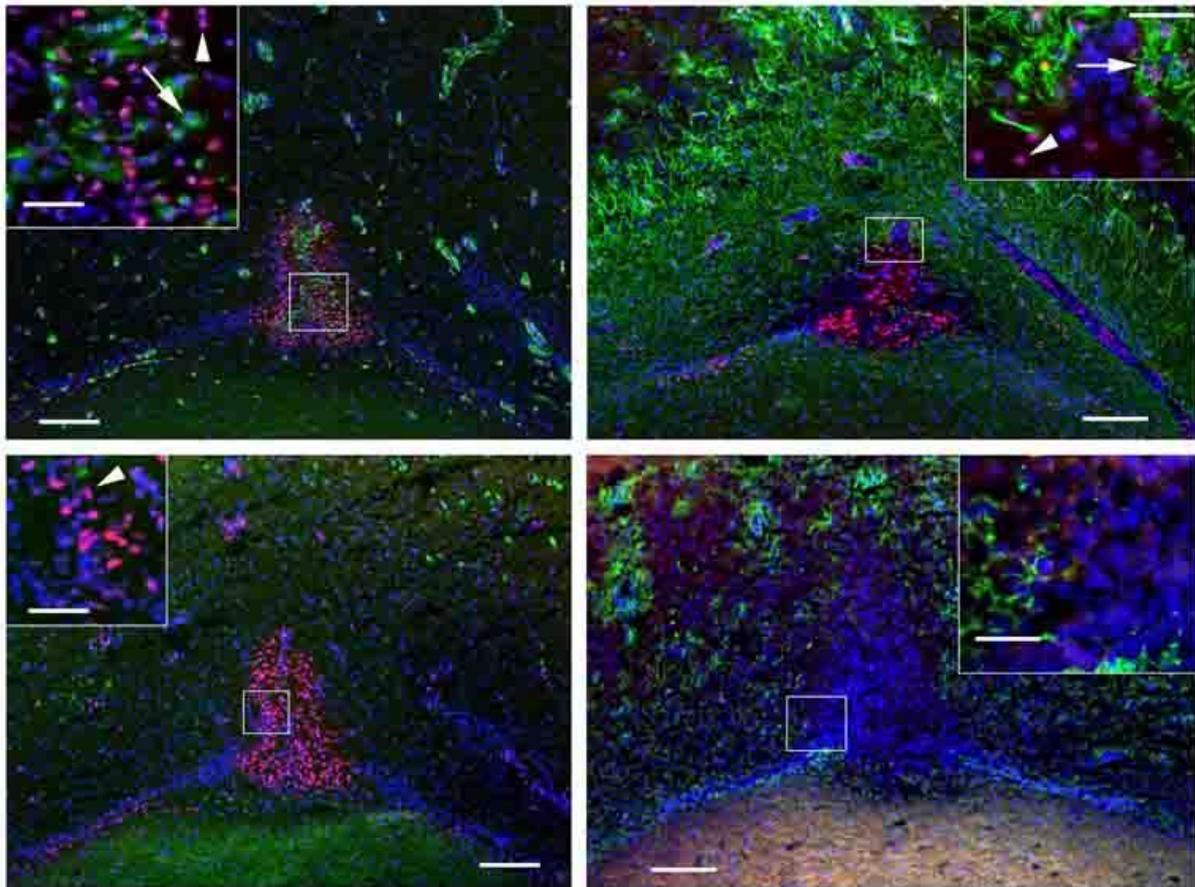


Abbildung 29: Endothelzellen und Astrozyten des OVLT reagieren zwei Stunden nach Stimulation mit 500 µg/kg PIPC i.a. mit nukleären Translokationen des Transkriptionsfaktors STAT3. Nukleäre STAT3 Immunreaktivität (rot) ist mit nukleärer DAPI Färbung kolokalisiert und resultiert in rosa Signalen. Der endotheliale von Willebrand Faktor (vW, links oben), das saure Gliafaserprotein (GFAP, rechts oben) und das neuronale nukleäre Protein (NeuN, links unten) wurden jeweils mit grüner Färbung zur Demonstration der Phänotypen der STAT3 aktivierten Zellen benutzt. Rechts unten ist ein OVLT Schnitt eines mit Saline behandelten Kontrolltieres abgebildet. Als zellspezifischer Marker wurde hier GFAP verwendet. Die Pfeile zeigen auf STAT3 positive Zellkerne, die zu Zellen des jeweiligen zu detektierenden Zelltyps gehören, die Pfeilspitzen zeigen auf Zellen eines anderen nicht markierten Zelltyps. Die weißen Balken in den Übersichtsaufnahmen entsprechen 100µm, die Balken in den Detailaufnahmen entsprechen 25 µm.

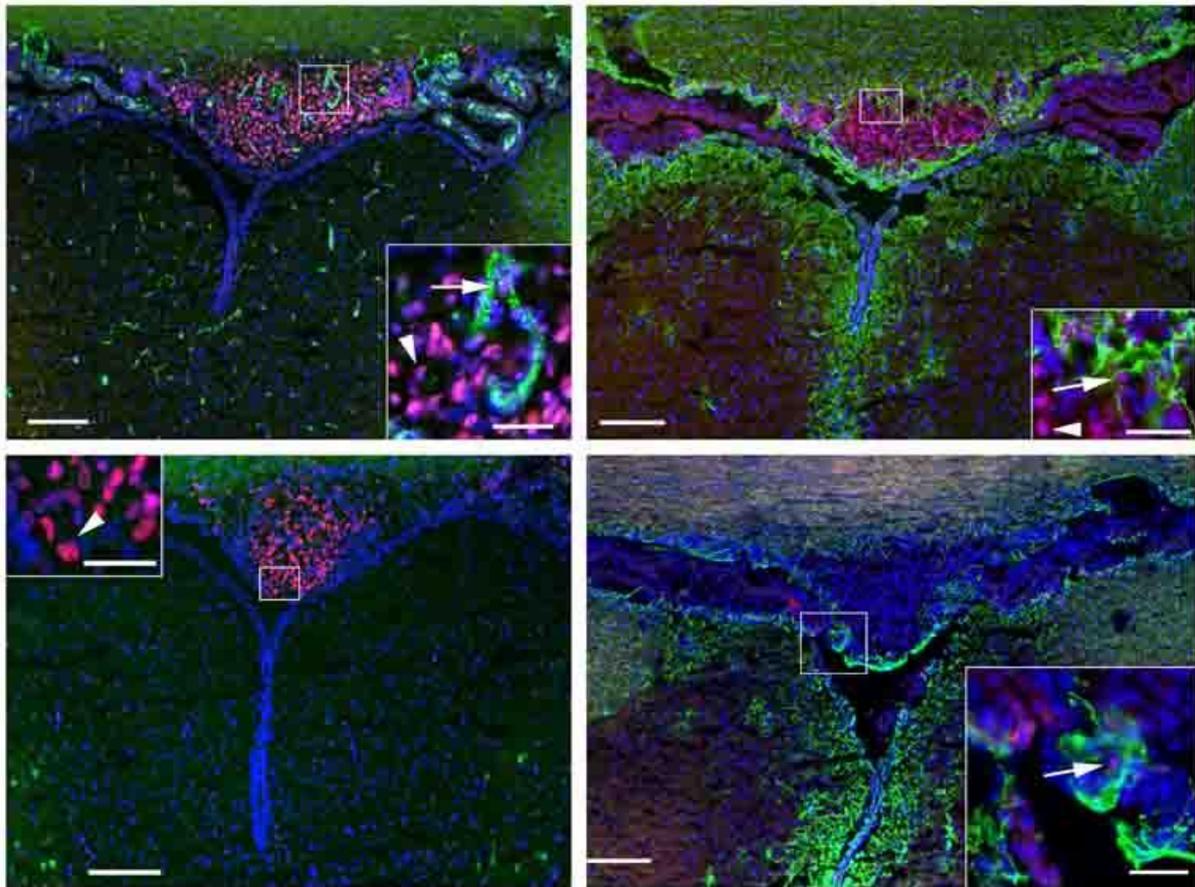


Abbildung 30: Kolokalisation von STAT3 Signalen mit nukleärer DAPI Färbung und zellspezifischen Markern in mittleren Bereichen des SFO. Links oben ist die Kolokalisation von STAT3 Signalen mit den Zellkernen von Endothelzellen gezeigt. Rechts oben ist die astrozytäre Begrenzung des SFO zu erkennen, die wiederum Kolokalisationen mit einigen der STAT3 Signalen aufweist. Im Inneren der mittleren Bereiche des SFO ist nur eine geringe Anzahl von Astrozyten zu erkennen, die aber ebenfalls STAT3 positiv sind. Dagegen finden sich im gesamten SFO keine NeuN positive Zellen (links unten). Als Vergleich ist rechts unten das SFO eines Kontrolltieres gezeigt, bei dem GFAP als zellspezifischer Marker verwendet wurde. Man erkennt zum einen zytoplasmatische STAT3 Immunreaktivität in Zellen des *Plexus choroideus* und außerdem ein einzelnes nukleäres STAT3 Signal an der Grenze zum dritten Ventrikel. Die Pfeile zeigen auf STAT3 positive Zellkerne, die zu Zellen des jeweiligen zu detektierenden Zelltyps gehören, die Pfeilspitzen zeigen auf Zellen eines anderen nicht gelabelten Zelltyps. Die weißen Balken entsprechen in den Übersichten 100 μm und in den Detailaufnahmen 25 μm .

Ein Großteil der genomisch aktivierten Zellen in der AP war mit dem sauren Gliafaserprotein kolokalisiert. Als Ausnahme stellten sich vor allem Endothelien dar, die auch in dieser Hirnregion deutliche STAT3 Signale zeigten.

Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung von Neuronen über die STAT3 Signalkaskade nach Injektion von PIPC erfolgte, wurde als neuronaler Marker das neuronenspezifische nukleäre Protein (NeuN) detektiert. Mit diesem Zellmarker ergaben sich weder Kolokalisationen mit STAT3 Signalen in den CVOs noch in anderen Hirnregionen.

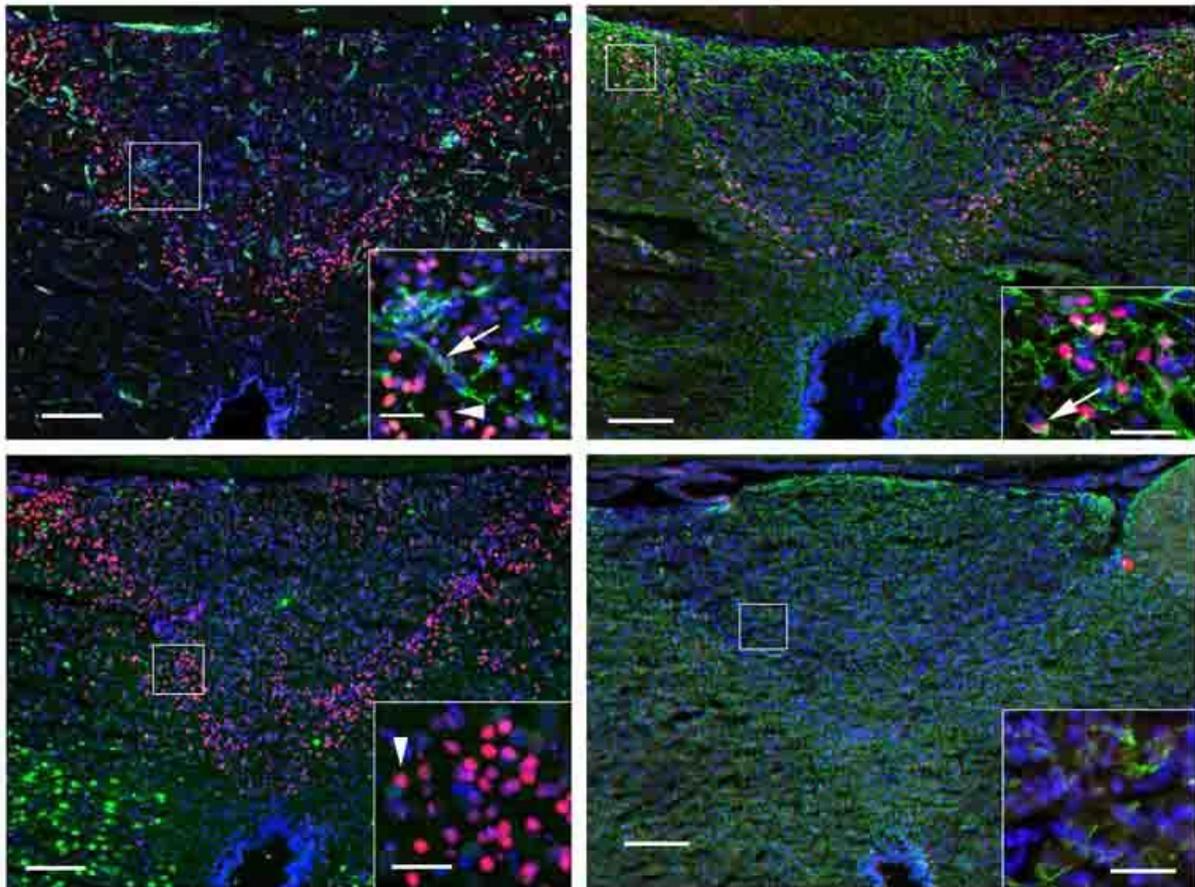


Abbildung 31: Kolokalisation von STAT3 Signalen mit nukleärer DAPI Färbung und zellspezifischen Markern in mittleren Bereichen der *Area postrema*. Links oben ist die Kolokalisation von STAT3 Signalen mit den Zellkernen von Endothelzellen gezeigt. Man erkennt eine Häufung von STAT3 Signalen im Randbereich der AP. Innerhalb der AP sind die Signale sowohl schwächer als auch weniger häufig. Unabhängig von der Lokalisation finden sich Endothelzellen mit STAT3 positiven Zellkernen. Rechts daneben sieht man STAT3 positive Astrozyten, ebenfalls in besonderem Maße in den Randbereichen der AP an der Grenze zum *Nucleus gracilis* und dem *Nucleus tractus solitarius*. Die Zellen stellen sich größtenteils als GFAP positiv dar. Dementsprechend ist hier ebenfalls der Anteil der Astrozyten an den genomisch aktivierten Zellen hoch. In dieser Hirnregion finden sich wiederum keine Zellen, die sowohl NeuN als auch STAT3 positiv sind. Rechts unten ist die *Area postrema* eines Kontrolltieres zu sehen. Sie zeigt keinerlei STAT3 Immunreaktivität. Als zellspezifischer Marker wurde wiederum GFAP verwendet. Die Pfeile zeigen auf STAT3 positive Zellkerne, die zu Zellen des jeweiligen zu detektierenden Zelltyps gehören, die Pfeilspitzen zeigen auf Zellen eines anderen nicht gelabelten Zelltyps. Die weißen Balken entsprechen in den Übersichten 100 μm und in den Detailaufnahmen 25 μm .

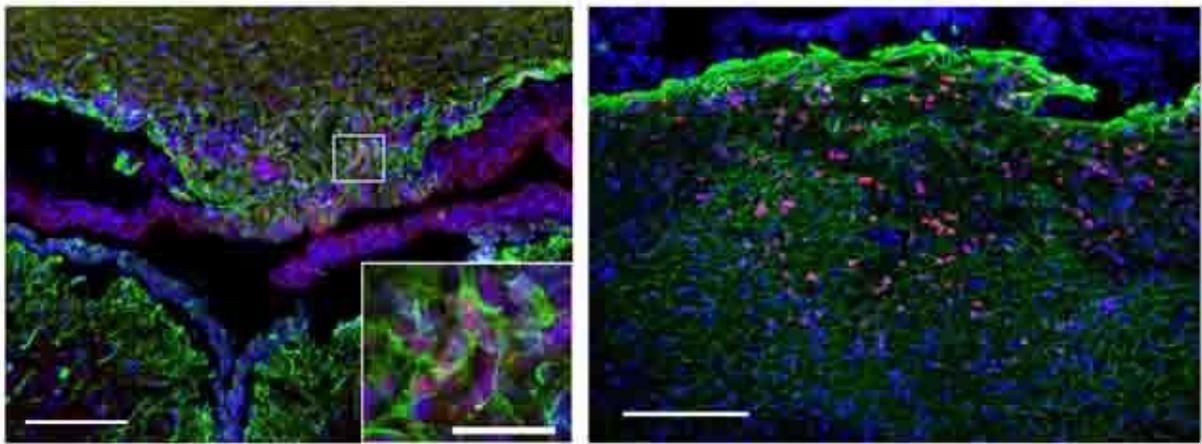


Abbildung 32 Caudale Abschnitte des SFO (links) und der AP (rechts). Im linken Bild erkennt man, dass das SFO in seinen Grenzbereichen eine hohe Astrozytdichte aufweist. Diese reagieren auf PIPC Stimulation ebenso wie die Zellen nicht astrozytären Ursprungs im Zentrum dieser Region mit nukleärer Translokation von STAT3 Molekülen. Die caudale AP hingegen weist weniger eine Veränderung des Phänotyps der Zellen auf, als vielmehr eine Veränderung der Signalverteilung. Die Signale sind nicht wie in den zentraleren Abschnitten V-förmig in den lateralen Rändern akkumuliert, sondern gleichmäßig über die gesamte Region verteilt. Die weißen Balken entsprechen in den Übersichten 100 µm und in der Detailaufnahme 25 µm.

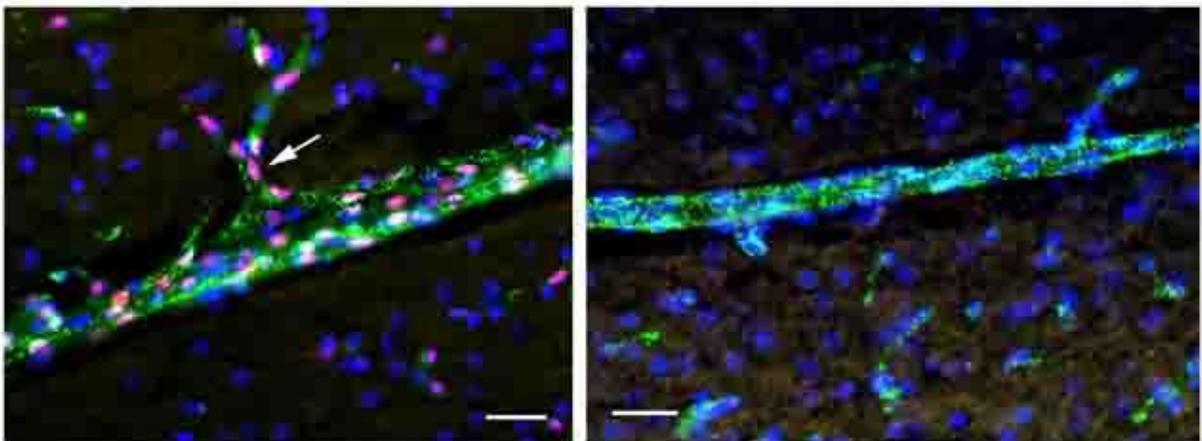


Abbildung 33: Endothelzellen im gesamten Gehirn reagieren auf intraarterielle Stimulation mit 500 µg/kg PIPC mit nukleärer Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 (linkes Bild). Der Pfeil zeigt exemplarisch eine Endothelzelle dieses corticalen Gefäßes mit Immunreaktivität für STAT3 im DAPI gelabelten Zellkern und vW-Faktor im Zytoplasma. Alle im Umfeld dieses Gefäßes vorkommenden STAT3 Signale sind ebenfalls mit dem vW-Faktor assoziiert. Im rechten Bild ist ein Gefäß aus dem Cortex eines Kontrolltieres abgebildet. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 25 µm.

Als weitere Hirnregion zeigte der *Nucleus supraopticus* (SON) eine Häufung von nukleären STAT3 Signalen, die sich nicht auf die Endothelien beschränkten, sondern auch in Astrozyten anzutreffen waren. Der SON stellte damit die einzige Hirnregion außer den sensorischen zirkumventrikulären Organen dar, in der genomisch aktivierte Astrozyten in nennenswertem Umfang nachgewiesen werden konnten.

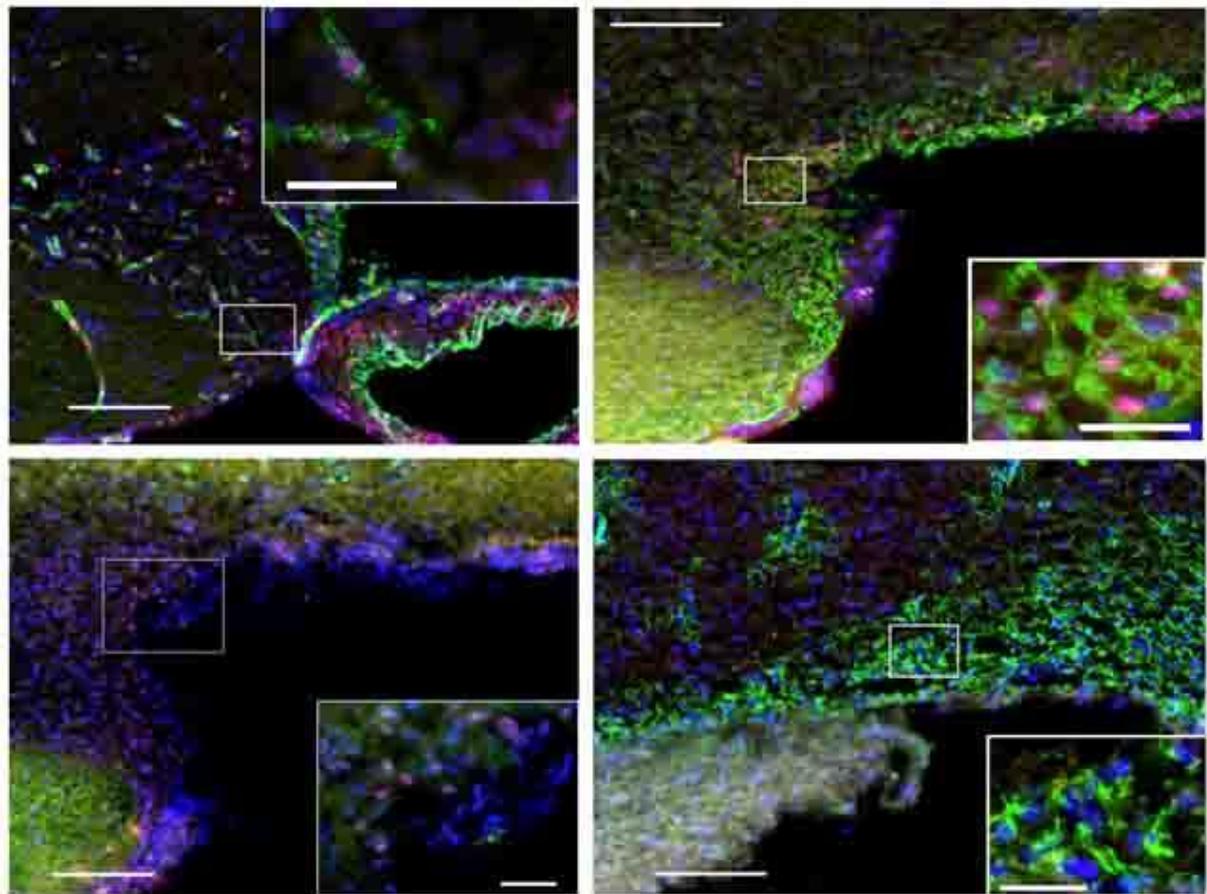


Abbildung 34: Außerhalb der Hirngebiete mit fenestrierter Blut- Hirn- Schranke fanden sich lediglich im *Nucleus supraopticus* nennenswerte Mengen an genomisch aktivierten Astrozyten (rechts oben). Neben Astrozyten konnten auch in dieser Region Endothelzellen als STAT3 positiv identifiziert werden (links oben). Mit dem Marker NeuN ergaben sich keine Kolokalisationen von STAT3 im SON (links unten). Das Bild unten rechts stammt von einem Kontrolltier. Als zellspezifischer Marker ist wieder das saure Gliafaserprotein (GFAP) grün dargestellt. Die weißen Balken in den Übersichtsaufnahmen repräsentieren jeweils 100 µm, in den Detailaufnahmen stellen die weißen Balken 25 µm dar.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die pyrogene Wirkung, die von PIPC beim Meerschweinchen hervorgerufen wird, ist abhängig von der Applikationsart und geht mit der Induktion von Zytokinen einher.

Subkutane Injektionen bewirkten weder einen Anstieg der Körpertemperatur noch von inflammatorischen Zytokinen im Blut. Intramuskulär verabreicht zeigte sich eine moderate Erhöhung der Körpertemperatur die von einem leichten Anstieg des zirkulierenden IL-6 Spiegels begleitet war.

Nach intraperitonealer oder intraarterieller Injektion wurde ein starkes Fieber ähnlicher Höhe ausgebildet. Die Dauer des Fiebers, das auf die i.p. Injektion folgte, war mit ca. 8 h deutlich kürzer als die Fieberreaktion auf intraarterielle Administration dieses Pyrogens (ca. 20h).

60 min nach i.a. Injektionen konnte im Plasma eine TNF Aktivität von ca. 4500 ± 1400 pg/ml detektiert werden. Nach weiteren 60 min zeigte nur noch die Hälfte der Versuchstiere eine TNF Aktivität, die, wenn vorhanden, um eine Zehnerpotenz verringert war. Die IL-6 Werte stiegen langsamer an und erreichten ihren Peak nach 120 min mit ca. 6300 ± 2300 I.U./ml, um sich nach weiteren 120 min zu halbieren. Intraperitoneal injiziert trat die Induktion von TNF erst nach 120 min auf und erreichte dosisabhängig Werte, die bei der niedrigen Dosis den i.a. Werten nach 120 min ähnelten. Bei der hohen Dosis zeigte sich eine Übereinstimmung mit den TNF Werten 60 min nach PIPC i.a.

Wiederholte intraarterielle Injektionen bewirkten Modifikationen sowohl im Bezug zur Fieberantwort, als auch zu den induzierten Zytokinspiegeln. Die Höhe des Fiebers war schon nach der zweiten Injektion im Vergleich zur ersten signifikant reduziert. Die Wirkung der dritten Injektion war tendenziell noch schwächer. Im Laufe der vierten und fünften Injektion zeigte sich ein moderater Wiederanstieg der Höhe der Fieberreaktion, die aber nicht die Ausgangsstärke erreichte. Die Dauer der Erhöhung der Körpertemperatur hingegen war nach der vierten Injektion von über 20 Stunden auf 16 Stunden abgesunken. Nach der fünften Stimulation sank die Temperatur bereits nach 12 Stunden auf normale Werte ab.

Die TNF Werte sanken bis zur dritten Injektion ab, um dann wieder tendenziell leicht zu steigen. Die IL-6 Werte hingegen zeigten eine recht einheitliche Abschwächung im Laufe des Versuchsgeschehens.

Das durch PIPC induzierte Fieber ist Cyclooxygenaseabhängig.

Das durch PIPC hervorgerufene Fieber ließ sich durch gleichzeitige Verabreichung des nicht selektiven Cyclooxygenasehemmers Diclofenac vollständig unterdrücken. Es fand 4-8 Stunden nach der Injektion sogar ein Absinken der Körpertemperatur unter die Werte der Kontrolltiere statt. Der selektive COX-2-Hemmer Nimesulide bewirkte eine Reduktion der frühen Fieberphase. Seine Wirkung endete nach etwa 6 Stunden.

Weder Diclofenac noch Nimesulide hatten einen Einfluss auf die zirkulierenden Zytokinspiegel.

3 Stunden nach der Injektion von PIPC konnte eine Induktion der Cox-2 mRNA im Gehirn entlang der Gefäße und in Gebieten mit fenestrierter Blut- Hirn- Schranke festgestellt werden.

PIPC bewirkt die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im Gehirn.

Gebiete mit fenestrierter Blut- Hirn- Schranke zeigten 2 Stunden nach PIPC Stimulation STAT3 Signale in Zellkernen von Astrozyten und Endothelzellen. Sowohl im Subfornikalorgan als auch im *Organum vasculosum laminae terminalis* kommt mindestens eine weitere Zellpopulation vor, deren Phänotyp nicht durch zellspezifische Marker erkannt wurde. Die *Area postrema* hingegen zeigte eine hohe Zahl an genomisch aktivierten Astrozyten.

Der *Nucleus supraopticus* stellt die einzige Hirnregion dar, die nicht zu den sensorischen circumventrikulären Organen gehört und nach Behandlung mit PIPC nukleäre STAT3 Signale aufwies.

Abhängig von dem immunhistochemischen Protokoll konnten in Endothelzellen bzw. den Meningen des gesamten Gehirns STAT3 Signale nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 PIPC als exogenes Pyrogen

Eine Behandlung von Versuchstieren mit PIPC wurde von einigen Autoren als ein *in vivo* Modell zur experimentellen Simulation der Akute-Phase Reaktion angesehen („viral mimetic“), die im Zusammenhang mit viralen Infektionen auftritt (Fortier et al. 2004; Traynor et al. 2004). Die Übertragbarkeit der hier erhobenen Daten auf tatsächliche virale Infektionen ist jedoch nur bedingt möglich. Bei einer natürlichen Infektion kommt es zu einer kontinuierlichen Produktion der Pyrogene, die nicht mit der hier verwendeten Bolusinjektion zu vergleichen ist. Die Bolusinjektion einer Reinsubstanz ermöglicht es jedoch, die pyrogenen Eigenschaften dieser Substanz zu charakterisieren, da sowohl Verunreinigungen, als auch der Einfluss anderer pygener Komponenten einer viralen Infektion ausgeschlossen werden können. In einer Studie an TLR3-defizienten Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Veränderungen der Körpertemperatur und das Krankheitsverhalten, die sich bei Wildtyp-Mäusen bei einer experimentell erzeugten Infektion mit Influenzaviren entwickeln, bei den TLR3-knockout Mäusen sehr stark abgeschwächt sind (Majde *et al.*, 2010). Dies zeigt, dass eine Behandlung von Versuchstieren mit dem TLR3-Agonisten PIPC wesentliche Komponenten einer Virusinfektion in der Tat experimentell simulieren kann.

In den meisten Studien zur Charakterisierung der Mechanismen, die zur Ausbildung einer Fieberreaktion führen, wurde und wird LPS gram-negativer Bakterien eingesetzt (Roth & Blatteis, 2014). Injektionen von LPS können bei Versuchstieren je nach eingesetzter Dosis nicht nur zur Ausbildung von Fieber führen. In hoher Dosierung verursacht LPS eher einen dem septischen Schock entsprechenden Zustand, der zumindest in der Anfangsphase nach der Injektion von einer regulierten Hypothermie begleitet wird (Töllner *et al.*, 2000; Romanovsky *et al.*, 2005; Garami *et al.* 2018). Derartige Effekte können durch PIPC nicht ausgelöst werden (Fortier et al. 2004; Abschnitt 3.1 der vorliegenden Arbeit). Somit entspricht die pyrogene Kapazität von PIPC der für andere Agonisten endosomaler TLR beschriebenen Wirkung. Auch durch Agonisten für TLR7 (Imiquimod; Damm *et al.*, 2012) bzw. TLR9 (ODN 1668; Damm *et al.*, 2014) lässt sich zwar Fieber, jedoch weder Hypothermie oder ein dem septischen Schock entsprechender Zustand induzieren. Dieser Unterschied lässt sich durch die Stärke und Zusammensetzung der so genannten „Zytokin-Kaskade“ erklären, die durch verschiedene exogene Pyrogene in unterschiedlicher Stärke induziert werden. Die

Ausbildung eines septischen Schocks wird in diesem Zusammenhang der exzessiven Bildung von TNF- α zugeschrieben, die beispielsweise nach Injektion von LPS zu beobachten ist (Beutler & Cerami, 1989; Töllner *et al.*, 2000). Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit reproduzierbar belegt werden, dass PIPC einen Anstieg an TNF- α im Blutplasma verursacht. Dieser fällt jedoch im Vergleich zu einer Stimulation mit LPS oder mycoplasmalen Lipopeptiden deutlich schwächer aus (Roth *et al.*, 1994; Hübschle *et al.*, 2006; Welsch *et al.*, 2012). Dies könnte an der endosomalen Lokalisation des TLR3 und des vergleichsweise hohen Molekulargewichts und der damit verbundenen Molekülgröße von PIPC liegen. Um eine TLR-vermittelte Signalkaskade zu induzieren, muss PIPC zunächst die Endosomen erreichen, in denen TLR3 nach seiner Faltung im endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat platziert wird (Blasius & Beutler, 2010). Dies erklärt die im Vergleich zu LPS, MALP-2 oder FSL-1 schwächere Kapazität von PIPC zur Induktion von TNF- α und die fehlende Kapazität des TLR3-Agonisten zur Verursachung eines septischen Schocks. Die TLRs für die genannten Moleküle (TLR4, TLR2 und TLR6) sind aufgrund ihrer Lokalisation in den Zellmembranen für ihre Agonisten wesentlich leichter zugänglich. Dennoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die klassische Vorstellung von PIPC als reinem Interferonstimulator (Absher & Stinernbring, 1969; Cooper *et al.*, 1988) revidiert werden sollten. PIPC sorgt, wenn auch im schwächeren Umfang, für eine zirkulierende Zytokin-Kaskade, die in Zusammensetzung und Kinetik den durch LPS induzierten Zytokinen entspricht (Jansky *et al.*, 1995). Dies bedeutet, dass besonders die Rolle von IL-6 als kritisches zirkulierendes endogenes Pyrogen (Chai *et al.*, 1996; Cartmell *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2004; Rummel *et al.*, 2006; Eskillson *et al.*, 2014) auch auf die durch PIPC-induzierbare Fieberreaktion übertragen werden kann. Der Zusammenhang zwischen dem durch PIPC induzierten Fieber und den das Fieber begleitenden zirkulierenden IL-6-Spiegeln wurde besonders in den Versuchen deutlich, in denen unterschiedliche Applikationswege (i.a., i.p., i.m., s.c.) für PIPC verglichen wurden (Abb. 35). Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 35 anhand der Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, zusammenfassend dargestellt. Injektionen von PIPC in eine subkutan implantierte Kammer mit Hautkontakt der in die Kammer injizierten Lösung (s.c.) führte bei Meerschweinchen zu keinem signifikanten Anstieg der Körperkerntemperatur (siehe Abb. 3). I.m. Injektionen von PIPC verursachten einen sehr moderaten Anstieg der Körpertemperatur. Korrelierend dazu war im Blut der s.c. mit PIPC behandelten Tiere kein signifikanter Anstieg an IL-6 messbar, i.m. Injektionen des TLR3 Agonisten verursachten nur einen geringen Anstieg von IL-6 im Plasma. Die starken Fieberreaktionen, die nach i.p. und besonders nach i.a. Injektionen bei Meerschweinchen

auftraten, waren dagegen mit dazu korrespondierenden, sehr hohen zirkulierenden IL-6-Spiegeln assoziiert. Entsprechende Befunde ließen sich auch für TNF- α erheben (Abb. 35).

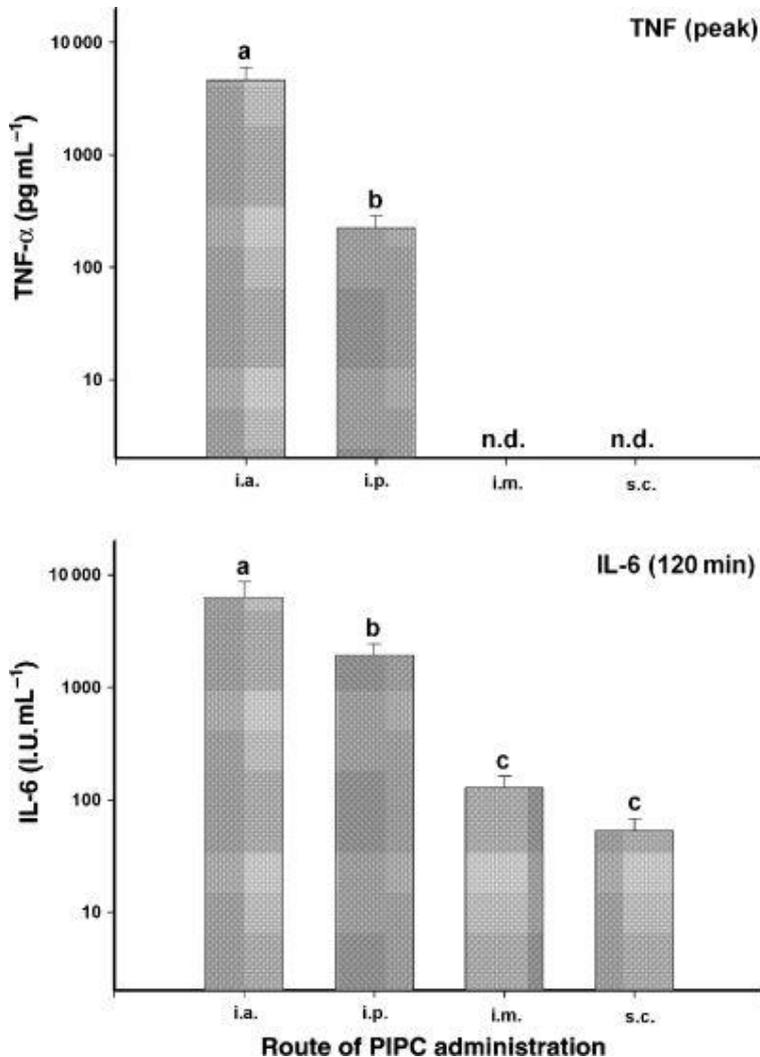


Abbildung 35: Vergleich der höchsten gemessenen TNF- α und IL-6-Konzentrationen im Blutplasma von Meerschweinchen, die i.a., i.p., i.m. oder s.c. mit PIPC behandelt wurden (Abbildung aus: Voss *et al.*, 2006). Korrespondierend zur Stärke der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Fieberreaktionen verhielten sich die zirkulierenden Spiegel der beiden untersuchten Zytokine. Säulen mit denselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, während unterschiedliche Buchstaben über den Säulen signifikante Unterschiede anzeigen. Nach s.c. und i.m. Injektionen von PIPC war TNF- α im Blut nicht nachweisbar (n.d.).

Auch für das in den meisten experimentellen Fieberstudien verwendete LPS wurde eine Abhängigkeit zwischen der Art der Applikation, den jeweils nachzuweisenden zirkulierenden

IL-6-Spiegeln und der Stärke der Fieberreaktion beschrieben (Rummel *et al.*, 2004). Der diesbezüglich deutlichste Unterschied zwischen LPS und PIPC manifestiert sich darin, dass die Injektionen von PIPC in eine subkutane Kammer nicht mit einer Fieberreaktion beantwortet werden (Abbildung 3), während LPS in diesem Experimentalmodell einer lokalen subkutanen Entzündungsreaktion von einer deutlichen Fieberantwort begleitet wird (Ross *et al.*, 2000; Rummel *et al.*, 2004). Mehrere Gründe könnten hierfür verantwortlich sein. Zum einen könnte in den subkutanen Gewebestrukturen TLR3 im Gegensatz zu TLR4 nicht in relevantem Ausmaß vorhanden sein. Dies erscheint jedoch deshalb unwahrscheinlich, da andere Agonisten endosomaler / intrazellulärer TLRs (TLR7 bzw. TLR9) nach subkutaner Injektion sehr wohl Fieber induzieren können (Damm *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu den synthetischen Agonisten von TLR7 und TLR9 handelt es sich bei PIPC jedoch um ein Molekül von vergleichsweise hohem Molekulargewicht (1000-6000 Nukleotide). Derart große Moleküle werden eventuell nicht so leicht zu dem intrazellulär gelegenen TLR3 gelangen können oder aber bei zu schwacher Expression von TLR3 im subkutanen Gewebe aus der Kammer in den Blutkreislauf übertreten. Die Überprüfung dieser Hypothese war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da eine Möglichkeit zur Messung von PIPC im Blut nach den unterschiedlichen Applikationen nicht verfügbar war. Die Problematik des Einflusses der Variabilität des Molekulargewichtes unterschiedlicher PIPC-Präparationen auf das Ausmaß der Aktivierung angeborener Immunität wurde erst kürzlich experimentell untersucht (Mueller *et al.*, 2019). Da die hier beschriebenen Versuche jedoch alle mit derselben PIPC Präparation durchgeführt wurden, sollte dies keinen Einfluss auf die erhobenen Befunde gehabt haben.

Es bleibt festzuhalten, dass die pyrogenen Eigenschaften des TLR3-Agonisten PIPC gut mit den zirkulierenden Konzentrationen von IL-6 korrelieren und somit der Mechanismen zur Fieberinduktion nach Stimulation mit PIPC denen entsprechen könnten, die besonders für LPS intensiv erforscht und beschrieben wurden (siehe auch: Abschnitt 4.3).

4.2 Toleranzerscheinungen gegenüber PIPC

Die beiden bislang publizierten Studien zur Untersuchung einer möglichen Toleranzentwicklung gegenüber wiederholten Stimulationen mit PIPC lieferten widersprüchliche Befunde. Die erzielten Befunde entsprachen etwa den Ergebnissen, die bei der Analyse von fünf wiederholten i.p. Injektionen von FSL-1 beschrieben wurden (Greis *et al.*, 2009). Das nach der zweiten und dritten Injektion von i.a. injiziertem PIPC registrierte

Fieber schwächte sich progressiv ab, um nach der vierten und fünften Injektion des Pyrogens wieder anzusteigen. Bemerkenswert hieran war, dass die frühe Fieberphase (0-120 min nach Injektion von PIPC) nach allen fünf Stimulationen identisch war. Passend dazu war der zirkulierende IL-6-Spiegel ab der dritten Injektion nach 240 min nicht, aber nach 120 min signifikant reduziert. Somit muss man postulieren, dass sich die frühe Phase des durch PIPC induzierten Fiebers unabhängig von zirkulierenden Zytokinen entwickelt, die Zytokine somit nur Aufrechterhaltung des Fiebers beitragen. Die Zytokin-unabhängige frühe Fieberphase könnte sich durch eine direkte Wirkung von PIPC auf das Gehirn manifestieren. Hierfür könnte eventuell die Existenz von TLR3 in Hirnstrukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sein (Ott *et al.*, 2012; siehe auch Abschnitt 3.4). Wie bereits in Abschnitt 1.4 ausgeführt, ist das Phänomen einer Toleranzentwicklung für LPS am stärksten ausgeprägt (Roth *et al.*, 1994; Zeisberger & Roth, 1998). Als wahrscheinlichster Mechanismus gilt eine Veränderung der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors NF κ B weg von dem Heterodimer p50/p65 hin zu dem Homodimer p50/p50 bei wiederholter Stimulation mit LPS in kurzen Abständen (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994). Die Hochregulation der p50 Untereinheit des Transkriptionsfaktors bei unveränderter Expression der p65 Untereinheit wird nach gängiger Vorstellung dafür verantwortlich gemacht, dass die Genexpression von TNF- α unterdrückt, die Induktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 dagegen verstärkt wird (Frankenberger *et al.*, 1995; Kastenbauer & Ziegler-Heitbrock, 1999). Da es sich bei IL-10 um ein Zytokin mit starken antipyretischen Eigenschaften handelt (Leon *et al.*, 1999; Harden *et al.*, 2014), lässt sich die progressiv abgeschwächte Fieberantwort gegenüber wiederholter Stimulation mit LPS gut erklären. Für das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte exogene Pyrogen PIPC sieht dieser Sachverhalt etwas komplizierter aus. Die Abschwächung des Fiebers und der Bildung von Zytokinen mit fiebererzeugenden Eigenschaften auf wiederholte Injektionen von PIPC ist vergleichsweise moderat und sogar nur transient. (siehe: Abschnitt 3.2). Durch die Interaktion von PIPC mit seinem Rezeptor TLR3 wird ebenso wie nach der Aktivierung von TLR4 durch LPS der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert (Alexopoulo *et al.*, 2001), wobei jedoch Unterschiede bei den jeweils induzierten Genexpressionsmustern gibt (Huang *et al.*, 2006). Ob es Veränderungen in der Zusammensetzung von NF κ B nach wiederholter Stimulation mit PIPC gibt, ist bislang nicht bekannt. Würde der Mechanismus der moderaten Toleranzentwicklung gegenüber PIPC der starken Toleranzentwicklung gegenüber LPS entsprechen, müsste man postulieren, dass die vermehrte Bildung von p50/p50 homodimeren NF κ B-Molekülen nach mehrfacher PIPC-Injektion wesentlich schwächer erfolgt als es für LPS beschrieben wurde. Außerdem müsste

sich die Veränderung der NFκB-Zusammensetzung nach mehr als drei PIPC-Injektionen wieder abschwächen. Da diesbezügliche Untersuchungen bislang nicht durchgeführt wurden, bleibt die genaue Erklärung, warum sich die Reaktionen von Versuchstieren gegenüber wiederholten Injektionen von PIPC und LPS doch recht deutlich unterscheiden, zunächst spekulativ. Zur Klärung dieser Frage sollten jedoch auch neuere Erkenntnisse zu potenziellen Mechanismen und Mediatoren der LPS-Toleranz herangezogen werden, die sich möglicherweise auf die durch wiederholte PIPC-Behandlung nachweisbaren, wenn auch schwächer ausfallenden, Toleranzeffekte übertragen lassen (Mages *et al.*, 2008; Lopez-Collazo & del Fresno, 2013; Seely & Gosh, 2017; Liu *et al.*, 2018; Lajqi *et al.*, 2019).

4.3 Rolle der Zyklooxygenasen

In den meisten Studien der experimentellen Fieberforschung wurde der TLR4 Agonist LPS als fiebererzeugendes Agens eingesetzt (Roth & Blatteis, 2014). Speziell für das Modell des LPS-induzierten Fiebers wurde eine zentrale Rolle für PGE₂ als letztendlich finaler Fiebermediator herausgearbeitet. Einige experimentelle Befunde sprechen dafür, dass in der Peripherie, vornehmlich in den in Makrophagen von Leber und Lunge, gebildetes PGE₂ an der Frühphase des einsetzenden Fiebers beteiligt ist, während das zentral in der POA gebildete PGE₂ für die Aufrechterhaltung der länger andauernden späteren Fieberphasen verantwortlich zeichnet (Li *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2006). Beide Arbeitsgruppen stellten fest, dass die Aktivierung peripherer Makrophagen durch LPS mit dem Einsetzen des Fiebers zeitlich korreliert. Der Mechanismus, wie peripher generiertes PGE₂ zur Fieberentstehung führt, wird von den jeweiligen Autoren jedoch unterschiedlich interpretiert. Li *et al.* (2006) postulierten eine Aktivierung von Afferenzen des N. vagus durch das in der Leber (eventuell auch in der Lunge) freigesetzte PGE₂. Steiner *et al.* (2006) stellten die Hypothese auf, dass PGE₂ durch spezifische Transporter über die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke in den Bereich der POA transportiert wird. Weniger umstritten ist der zweite Pool an PGE₂, der leicht verzögert direkt im Gehirn gebildet wird. Hierbei sind unumstritten hauptsächlich Endothelzellen der Blutgefäße im Bereich der POA und der CVOs an der Bildung dieses kritischen Fiebermediators beteiligt (Rummel *et al.*, 2006; Eskilsson *et al.*, 2017). Auf die zentrale Rolle der durch Pyrogene induzierten Expression von COX-2, besonders im Gehirn, wurde bereits verwiesen (siehe Abschnitt 1.3.3.2). Um die Bedeutung von PGE₂ und COX-2 auch für die durch PIPC induzierbaren Fieberreaktion nachzuweisen, wurden zum einen COX-Inhibitoren eingesetzt; zum anderen wurde mittels *in situ* Hybridisierung versucht, eine

PIPAC-induzierte Expression von COX-2 im Gehirn des Meerschweinchens nachzuweisen. Bis dato wurde lediglich in einer mit Kaninchen durchgeführten Studie die Rolle von PGE₂ beim Fieber nach intravenöser Injektion von PIPAC untersucht (Rotondo et al. 1987; Rotondo et al. 1988). In dieser Studie konnte durch Gabe von Ketoprofen, einem nicht-selektiven COX-Inhibitor, nicht nur das Fieber, sondern auch der mit dem Einsetzen der Fieberreaktion beobachtete Anstieg an PGE₂ im Blut vollständig unterdrückt werden. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurden mit Diclofenac und Nimesulide ein nicht-selektiver und ein selektiver COX-2 Hemmer bei der Spezies Meerschweinchen eingesetzt. Hierbei erwies sich Diclofenac als deutlich potenter, was die Unterdrückung der durch PIPAC hervorgerufenen Fieberreaktion betraf. So wirkte sich Nimesulide stärker auf die frühere Phase des Fiebers aus. Dies stand in gewissem Widerspruch zu einer anderen Studie, in der Nimesulide ebenfalls beim Meerschweinchen eher die späteren Phasen einer durch LPS induzierten Fieberreaktion abschwächte (Steiner et al., 2001). Es könnte sein, dass durch Nimesulide präferentiell die periphere COX-2-vermittelte Bildung von PGE₂ durch Makrophagen in Leber und Lunge gehemmt wurde, ein Mechanismus, wie er für LPS-Fieber beim Meerschweinchen beschrieben wurde (Blatteis, 2006). Ob ein solcher Mechanismus tatsächlich auch für das PIPAC-induzierte Fieber existiert, erfordert jedoch weiterführende Untersuchungen.

Zumindest für die größten Anteile des LPS-induzierten Fiebers, wird die gekoppelte Expression von COX-2 / mPGES-1 als entscheidend für die Aufrechterhaltung der Fieberreaktion angesehen (Roth & Blatteis, 2014; Blomqvist & Engblom, 2018). Dies konnte mit Hilfe von „knockout“ Mäusen, bei denen entweder das COX-2 oder das mPGES-1 Gen ausgeschaltet wurde, nachgewiesen werden (Li et al. 1999; Saha et al. 2005). Bei den Spezies Ratte und Maus wurde auf mRNA (PCR) und Proteinebene (Immuncytochemie, Western-Blot) in verschiedenen Fiebermodellen eine vermehrte Bildung dieser beiden Enzyme nachgewiesen (Cao et al., 1995; Matsumura et al., 1998; Yamagata et al., 2001; Konsman et al. 2004; Fortier et al., 2004; Rummel et al. 2005; Knorr et al., 2010; Damm et al., 2012; Damm et al., 2014). Für die Spezies Meerschweinchen besteht mangels spezifischer Antikörper keine Möglichkeit COX-2 oder mPGES-1 auf Proteinebene nachzuweisen. Mit Hilfe einer radioaktiv markierten Gensonde konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal eine vermehrte Expression von COX-2 im Gehirn des Meerschweinchens nach Stimulation mit PIPAC dokumentiert werden. Die stärksten Signale waren in den CVOs, Strukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke sichtbar. Man kann also festhalten, dass alles für zentrale Bedeutung von PGE₂ für die durch PIPAC induzierbare Fieberreaktion

spricht, ähnlich wie es in anderen Experimentalmodellen zur Fieberentstehung postuliert und nachgewiesen wurde.

4.4 Nukleäre STAT3 Aktivierung im Gehirn

Damit es nach Gabe eines Pyrogens zur Transkription und letztendlich zur Bildung von COX-2 und mPGES-1 im Gehirn kommt, ist zunächst eine Aktivierung inflammatorischer Transkriptionsfaktoren erforderlich. Wegen der guten Korrelation zwischen den zirkulierenden IL-6-Spiegeln und der Stärke der durch PIPC hervorgerufenen Fieberreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf den durch IL-6 induzierten Transkriptionsfaktor STAT3 gelegt. Im Modell des LPS-induzierten Fiebers war nämlich gezeigt worden, dass zirkulierendes IL-6 über eine STAT3 Aktivierung in CVOs und Endothelzellen des Gehirns zur Bildung von COX-2 und damit von PGE₂ führt (Rummel et al., 2006; Eskillson et al., 2014). Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass eine experimentelle Stimulation mit dem TLR3 Agonisten PIPC zu einer massiven Aktivierung von STAT3 im Gehirn führt. Dies wurde über die Translokation von STAT3 in die Zellkerne und den immunzytochemischen Nachweis derselben dokumentiert. Zwar ist IL-6 nicht das einzige Zytokin, das seine Wirkung über den Transkriptionsfaktor STAT3 entfaltet. Auch IL-11, Leukämia Inhibiting faktor, Oncostatin, Ciliärer Neurotropher faktor und Leptin wirken über eine STAT3-vermittelte Aktivierung von Zielzellen (Takeda & Akira, 2000). Jedoch wurde von diesen Zytokinen bislang nur für IL-6 ein massiver Anstieg im Blut beim Einsetzen eines Fiebers nachgewiesen. Man kann somit davon ausgehen, dass die massiven STAT3 Signale in den Gehirnen PIPC-behandelter Meerschweinchen mehr oder weniger ausschließlich durch IL-6 verursacht wurden. Vornehmlich waren die nukleären STAT3 Signale in so genannten sensorischen CVOs (AP, OVLT und SFO) zu beobachten. Wegen des Fehlens einer dichten Blut-Hirn-Schranke sind die in diesen Strukturen lokalisierten Zellen direkt zirkulierenden Botenstoffen ausgesetzt und werden im Rahmen systemischer Entzündungsreaktionen als Eintrittspforten für Zytokine in das Gehirn angesehen. Tatsächlich sind in diesen spezialisierten Gehirnstrukturen Rezeptoren für die wichtigsten fiebererzeugenden Zytokine (TNF- α , IL-1 β und IL-6) massiv exprimiert (Roth et al., 2004; Rummel, 2016). Sogar Rezeptoren für PAMPs (TLR4 und TLR2) wurden in den sensorischen CVOs nachgewiesen (Rivest, 2003; Roth et al., 2004; Wuchert et al. 2008; Ott et al. 2010). Es gibt sogar Hinweise dafür, dass zumindest einige Zellen im Bereich des OVLT direkt auf den TLR3 Agonisten PIPC reagieren können (Ott et al. 2012). Dies führt zur

lokalen Bildung von IL-6 im Bereich des OVLT, was die durch zirkulierendes IL-6 eingeleitete nukleäre STAT3 Aktivierung sogar noch verstärken könnte (Ott et al. 2012). Mittels Doppelmarkierungen durch Antikörper gegen STAT3 und Zelltyp-spezifische Markerproteine konnte festgestellt werden, dass die IL-6-vermittelte STAT3 Aktivierung vornehmlich in Astrozyten und Endothelzellen und einem dritten noch nicht identifizierten Zelltyp erfolgte. STAT3-aktivierte Endothelzellen wurden darüber hinaus auch im Hirnparenchym festgestellt, das nicht zu den CVOs gehört. Diese Beobachtung steht in Einklang mit publizierten Befunden, die zeigen, dass Rezeptoren für IL-6 und andere Zytokine in Endothelzellen des Gehirns verbreitet sind (Konsman et al. 2004; Eskilsson et al. 2014; Rummel, 2016). Endothelzellen in vielen Bereichen des Gehirns werden mittlerweile neben den CVOs als wichtigste „Relaisstation“ für den Übertritt systemischer Entzündungsprozesse von der Peripherie in das ZNS angesehen (Vasilache et al., 2015; Roth, 2015). STAT3 aktivierte Astrozyten waren dagegen ausschließlich in den untersuchten CVOs nachweisbar, was auch bei Ratten nach Stimulation mit LPS beschrieben wurde (Harré et al. 2003). Durch IL-6 aktivierte Astrozyten könnten in den CVO zur Produktion weiterer Entzündungsmediatoren beitragen oder aber zur Freisetzung von Gliotransmittern stimuliert werden (Ott et al. 2012). Die dritte, vom Phänotyp her noch nicht identifizierte Zellpopulation, in der nukleäre STAT3 Signale IL-6-vermittelt auftraten war hauptsächlich in den kernregionen von OVLT und SFO lokalisiert. Unsere Vermutung, dass es sich hierbei um Neurone handeln könnte, wurde insofern nicht bestätigt, als eine Kolo-kalisation von nukleärer STAT3-Immunoreaktivität mit dem neuronalen Marker NeuN nicht nachgewiesen werden konnte. Der Phänotyp dieser Zellen bleibt also noch zu identifizieren.

Es konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass eine systemische Stimulation mit dem TLR3 Agonisten PIPC ein ähnliches Aktivierungsmuster von Gehirnzellen verursacht, wie es auch nach peripherer Gabe von LPS zu beobachten ist. Dies bedeutet, dass die Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (TLRs) zu vergleichbaren zellulären Reaktionen im Gehirn führt. Dies könnte erklären, warum unterschiedliche PAMPs letztendlich zu vergleichbaren stereotypen, vom Gehirn kontrollierten Krankheitssymptomen führen, zu denen auch die Ausbildung einer Fieberreaktion gehört.

5 Zusammenfassung

Zentrales Ziel des ersten Teils der vorgelegten Dissertationsschrift war die Charakterisierung von Polyinosin : Polycytosin (PIPC) als exogenes Pyrogen beim Meerschweinchen. Bei PIPC handelt es sich um eine synthetischen doppelstängige RNA, die als Agonist des Toll-like Rezeptors-3 wirkt. Es wurde untersucht, wie sich die Art der Applikation von PIPC auf die Fieberentwicklung und die Bildung ausgewählter Zytokine bei der untersuchten Spezies auswirkt. Die Körperkerntemperatur wurde bei frei beweglichen Tieren mittels Radiotelemetrie erfasst, die Zytokine Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) wurden im Blutplasma mittels spezifischer Bioassays gemessen. Bei einer Dosis von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hing die fiebererzeugende Wirkung von PIPC sehr stark von der Art der Applikation des Pyrogens ab. Intra-arterielle (i.a.) oder intraperitoneale (i.p.) Injektionen von PIPC induzierten starke Fieberreaktionen und verursachten hohe zirkulierende Konzentrationen an TNF- α und IL-6. Intramuskuläre (i.m.) Injektionen des synthetischen Pyrogens induzierten nur mäßiges Fieber und geringfügige Anstiege an Zytokinen im Blut. Nach Injektionen von PIPC in sukutan (s.c.) implantierte Kammern aus Teflon traten weder Fieber noch Anstiege der untersuchten Zytokine im Blutplasma der Versuchstiere auf. Wurde PIPC in Abständen von 3 Tagen 5-mal wiederholt injiziert, entwickelten sich jeweils ähnliche Fieberverläufe und Zytokinmuster im Blut. Jedoch war die Stärke beider Antworten bei wiederholten Stimulationen mit PIPC, im Vergleich zu den Reaktionen auf die erste Injektion, signifikant abgeschwächt. Es scheint sich somit eine partielle Entwicklung einer Toleranz bei wiederholter Konfrontation der Versuchstiere mit PIPC gegenüber diesem Pyrogen zu manifestieren. Die Modulation der Stärke des PIPC-induzierten Fiebers durch die Art der Applikation und die partielle Toleranzentwicklung korreliert somit mit dem Ausmaß der PIPC-induzierten Bildung der beiden untersuchten Zytokine.

Im zweiten Teil dieses Dissertationsprojekts wurde die direkte Auswirkung von i.a. Injektionen des synthetischen Pyrogens PIPC (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) auf mögliche Mechanismen der Fieberentstehung im Gehirn des Meerschweinchens experimentell untersucht. Die bei dieser Dosierung und dieser Applikationsart auftretende starke Fieberreaktion wurde durch eine Behandlung mit dem nicht-selektiven Zykllooxygenase (COX)-Hemmer Diclofenac vollständig unterdrückt, durch den selektiven COX-2-Hemmer Nimesulide teilweise abgeschwächt (Dosierung jeweils 5 mg/kg). Es wurde weiterhin untersucht, ob eine direkte Aktivierung von Gehirnzellen / -strukturen während der durch PIPC induzierten Fieberreaktion nachweisbar war. Mittels radioaktiver *in situ* Hybridisierung wurde eine

erhöhte Expression von COX-2 und IL-1 β mRNA in spezifischen Regionen des Gehirns der mit PIPC behandelten Meerschweinchen dokumentiert. Die COX-2-Signale waren hierbei hauptsächlich mit Blutgefäßen assoziiert. Injektionen von PIPC (500 μ g/kg, i.a.) verursachten außerdem eine massive Translokation des inflammatorischen Transkriptionsfaktors STAT3 in die Kerne bestimmter Zellen in bestimmten Hirnstrukturen. Speziell waren STAT3-aktivierte Endothelzellen in zahlreichen Hirnarealen feststellbar. Zusätzlich wurden Populationen STAT3-aktivierter Astrozyten in Gehirnstrukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen. Hierbei handelte es sich vornehmlich um die sensorischen zirkumventrikulären Organe (*Area postrema*, *Organum vasculosum laminae terminalis* und *Organum Subformicale*). Für eine weitere kleine Population STAT3-aktivierter Gehirnzellen konnte der zelluläre Phänotyp noch nicht identifiziert werden. Der Toll-like Rezeptor-3 Agonist PIPC verursacht somit beim Meerschweinchen ein Aktivierungsmuster von Gehirnstrukturen, wie es auch in anderen Experimentalmodellen einer systemischen Entzündungsreaktion bei anderen Spezies beschrieben wurde.

6 Summary

The aim of the first part of this thesis was to characterize the properties of polyinosinic : polycytidylic acid (PIPC), a synthetic double stranded RNA and Toll-like receptor 3 agonist, to induce fever and circulating cytokines in guinea pigs. Special emphasis was directed to the route of PIPC administration and on a putative development of tolerance to this pyrogen. Changes in abdominal temperature were recorded in unrestrained animals by use of intra-abdominally implanted radiotransmitters. Circulating concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were measured by use of specific bioassays. The pyrogenic effect of PIPC at a dose of 500 μ g/kg depended on the route of its administration. Intra-arterial (i.a.) or intraperitoneal (i.p.) injections of PIPC induced pronounced fevers and strong elevations of circulating TNF- α and IL-6. Intramuscular (i.m.) injections of the synthetic pyrogen caused rather moderate febrile and cytokine responses. Administration of PIPC into artificial subcutaneously (s.c.) implanted Teflon chambers had no pyrogenic and cytokine-inducing effects. I.a. injections of PIPC, repeated five times at intervals of 3 days, resulted in fevers of similar shape and duration and similar cytokine response patterns. However, the strength of fever and cytokine formation was significantly reduced, although not abolished, in response to the repeated injections compared with the first injection,

indication a partial development of tolerance to repeated stimulations with PIPC. The modulation of the strength of PIPC-induced fever, dependent on the route of administration, or the state of partial tolerance to this pyrogen, may thus be related to the formation of pyrogenic cytokines.

In the second part of this thesis the effects of i.a. injections of 500 µg/kg PIPC on fever-inducing mechanisms in the brain were investigated. The pronounced fever, which was evoked by this dose of the pyrogen, was completely abolished by treatment with the non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor diclofenac and, in part, attenuated by the administration of the selective COX-2 inhibitor nimesulide (dose: 5 mg/kg for both COX-inhibitors). It was further investigated whether direct activation of brain cells during PIPC-induced fever could be demonstrated. Using radioactive in situ hybridization, it could be demonstrated that treatment with PIPC resulted in an upregulation of COX-2 and IL-1β mRNA in specific areas of the guinea pig brain. Thus, COX-2-specific hybridization signals seemed to be mainly associated with brain blood vessels. I.a. injections of PIPC further induced the pronounced nuclear translocation of the inflammatory transcription factor STAT3 in the endothelium of various fore- and hindbrain areas and in the meninges. In brain structures that lack a tight blood-brain barrier, i.e. the sensory circumventricular organs (area postrema, vascular organ of lamina terminalis, subfornical organ), the astrocytes and a population of still undetermined cellular phenotype also showed marked STAT3 activation in response to PIPC. The Toll-like receptor-3 agonist PIPC therefore caused a similar activation pattern of brain cells as that reported for other experimental models of systemic inflammation.

7 Abkürzungen

ANOVA	Varianzanalyse
AP	<i>Area postrema</i>
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APR	Akute Phase Reaktion
BAT	braunes Fettgewebe
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CARDIF	Card Adapter Inducing Interferon- β
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
COX	Zyklooxygenase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG-DNA	bakterielle Desoxyribonucleinsäure
CVO	zirkumventrikuläres Organ
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochloride
DAP	Diaminopimelic Acid
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylindol-Dilacetat
DC	dendritische Zellen
DMH	dorsomedialer Hypothalamus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonucleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	Prostaglandin E-Rezeptorsubtyp
FSL-1	Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid-1
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
H	Human
HCl	Salzsäure
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HRIL	Human recombinant Interleukin
HSP	Hitzeschockprotein

HZ	Frequenz in Hertz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.a.	intraarteriell
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IκB	inhibitorischer Faktor κB
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
IPS	Interferon-β Promotor Stimulator
IRF	Interferon Regulatory Factor
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
IUPS	Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences
kD	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LBP	LPS Bindungsprotein
LGP	Lysosomal Membrane Glycoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin Rich Repeats
MAL	Myelin and Lymphocyte Protein
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid-2
MAV	Mouse Adenovirus
MD	Myeloid Differentiation Protein
MDP	Muramyl-dipeptid
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNPO	<i>Nucleus praeopticus medianus</i>
mPGES	mikrosomale Prostaglandin-E-Synthase
MPO	<i>Mediale präoptische Region</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure

MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NAH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NA ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NEUN	Neuronen-spezifischer Nukleärer Faktor
NK	natürliche Killerzellen
NF-κB	Nuclear factor κB
NHS	Normal Horse Serum
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
OVLT	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
PAG	Polyalkylenglykolen
PAMP	Pathogen associated molecular Pattern
PB	Phosphate buffer
pDC	Pyridiniumdichromat
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin-E2
PI:PC	Polyinosinic : Polycytidylic Acid
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PLA ₂	Phospholipase A ₂
POA	<i>Area praeoptica hypothalami</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVN	<i>Nucleus paraventricularis hypothalami</i>
RGT	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel
RIG	Retinoic Acid-Inducible Gene
RNA	Ribonucleinsäure
RPa	<i>Nucleus raphe pallidus</i>
RPMI	Rothwell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SARM	Selektive Androgen Rezeptor Modulator
s.c.	subkutan

SE	Standardfehler
SFO	<i>Organum subfornicale</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SSC	Sequence Scan for CRISP (DNA sequence)
TACE	TNF- α converting Enzyme
TASK	Twik -related Acid Sensitive K ⁺ -Channel
TICAM-1/2	TIR Domain containing Adaptor Molecule
TIR	Toll/IL-1R Homologie Domäne
TIRP	TIR Domain Adapter Protein
TIRAP/MAL	TIR Domain containing adaptor Protein/ MyD88 adaptor-like
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF-Receptor
TRAAK	Twik Related Arachidonic Acid activated K ⁺ -Channel
TRAF	TNF-Receptor associated Factor
TRAM	TRIF-related adaptor Molecule
TREK	Twik Related K ⁺ -Channel
TRIF	TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing interferon- β
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Transient receptor potential/ ANKTM1-Unterfamilie
TRPM	Transient receptor potential/ Melastatin-Unterfamilie
TRPV	Transient receptor potential/ Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie
UCP	Uncoupling Protein
VISA	Virus-induced Signaling Adaptor
VMPO	<i>Nucleus ventromedialis praeopticus</i>
VR	Vanilloid receptor
vWF	von Willebrand Faktor
WEHI	Walter and Elizabeth Hall Institute
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

- AARDEN, L. A., DE GROOT, E. R., SCHAAP, O. L. & LANSDORP, P. M. (1987). Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* **17**, 1411-1416.
- ABSHER, M. & STINERNBRING, W.R. (1969). Endotoxin-like properties of Poly I : Poly C an interferon stimulator. *Cell. Nature* **223**, 715-717.
- AKIRA, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* **278**, 38105-38108.
- AKIRA, S., HIRANO, T., TETSUYA, T. & KISHIMOTO, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* **4**, 2860-2867.
- 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.
- ALEXOPOULOU, L., THOMAS, V., SCHNARE, M., LOBET, Y., ANGUIA, J., SCHOEN, R. T., MEDZHITOV, R., FIKRIG, E. & FLAVELL, R. A. (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* **8**, 878-884.
- ALIPRANTIS, A. O., YANG, R. B., MARK, M. R., SUGGETT, S., DEVAUX, B., RADOLF, J. D., KLIMPEL, G. R., GODOWSKI, P. & ZYCHLINSKY, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**, 736-739.
- APPLEQUIST, S. E., WALLIN, R. P. & LJUNGGREN, H. G. (2002). Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* **14**, 1065-1074.
- ARIF, A. A., GAO, L., DAVIS, C. D. & HELM, D. S. (1999). Antibody response to heat shock proteins and histopathology in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and maintained at elevated temperature. *J Parasitol* **85**, 1089-1099.
- ASAMI, A., ASAMI, T., HORI, T., KIYOHARA, T. & NAKASHIMA, T. (1988). Thermally-induced activities of the mesencephalic reticulospinal and rubrospinal neurons in the rat. *Brain Res Bull* **20**, 387-398.
- ASEA, A., REHLI, M., KABINGU, E., BOCH, J. A., BARE, O., AURON, P. E., STEVENSON, M. A. & CALDERWOOD, S. K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* **277**, 15028-15034.
- AZZIMONDI, G., BASSEIN, L., NONINO, F., FIORANI, L., VIGNATELLI, L., RE, G. & D'ALESSANDRO, R. (1995). Fever in acute stroke worsens prognosis. A prospective study. *Stroke* **26**, 2040-2043.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B. & DINESH-KUMAR, S. P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**, 726-733.

- BALTIMORE, D., BECKER, Y. & DARNELL, J. E. (1964). Virus-Specific Double-Stranded Rna in Poliovirus-Infected Cells. *Science* **143**, 1034-1036.
- BANDELL, M., STORY, G. M., HWANG, S. W., VISWANATH, V., EID, S. R., PETRUS, M. J., EARLEY, T. J. & PATAPOUTIAN, A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849-857.
- 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.
- BANKS, W. A., WUSTROW, D. J., CODY, W. L., DAVIS, M. D. & KASTIN, A. J. (1995). Permeability of the blood-brain barrier to the neurotensin8-13 analog NT1. *Brain Res* **695**, 59-63.
- BASU, S. & SRIVASTAVA, P. K. (2003). Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *Int Immunol* **15**, 1053-1061.
- BAUER, S., KIRSCHNING, C. J., HACKER, H., REDECKE, V., HAUSMANN, S., AKIRA, S., WAGNER, H. & LIPFORD, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237-9242.
- BAUSINGER, H., LIPSKER, D., ZIYLAN, U., MANIE, S., BRIAND, J. P., CAZENAVE, J. P., MULLER, S., HAEUW, J. F., RAVANAT, C., DE LA SALLE, H. & HANAU, D. (2002). Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol* **32**, 3708-3713.
- BEESON, P.B. (1947). Tolerance to bacterial pyrogens I. Factors influencing its development. *J Exp Med* **86**, 29-38.
- BEESON, P. B. (1948). Temperature-Elevating Effect of a Substance Obtained from Polymorphonuclear Leucocytes. *J Clin Invest* **27**, 524.
- BELL, J. F. & MOORE, G. J. (1974). Effects of high ambient temperature on various stages of rabies virus infection in mice. *Infect Immun* **10**, 510-515.
- BELL, J. K., ASKINS, J., HALL, P. R., DAVIES, D. R. & SEGAL, D. M. (2006). The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8792-8797.
- BELL, J. K., BOTOS, I., HALL, P. R., ASKINS, J., SHILOACH, J., SEGAL, D. M. & DAVIES, D. R. (2005). The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10976-10980.
- BELL, J. K., MULLEN, G. E., LEIFER, C. A., MAZZONI, A., DAVIES, D. R. & SEGAL, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**, 528-533.

- BERNHEIM, H. A. & KLUGER, M. J. (1976). Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival. *Science* **193**, 237-239.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. (1989). The biology of cachectin / TNF: a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* **7**, 625-655.
- BEUTLER, B., MILSARK, J.W. & CERAMI, A. (1985). Passive immunization against cachectin / tumor necrosis factor protects mice from lethal effects of endotoxin. *Science* **229**, 869-871.
- BISWAS, S.K. & LOPEZ-COLLAZO, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* **30**, 475-487.
- BJÖRNBERG, F., LANTZ, M., OLSSON, I. & GULLBERG, U. (1994). Mechanisms involved in the processing of the p55 and p75 tumor necrosis factor (TNF) receptors to soluble receptor forms. *Lymphokine Cytokine Res* **13**, 203-211.
- BLASIUS, A.L. & BEUTLER, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305-315.
- BLATTEIS, C.M. (2006). Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Therap* **111**, 194-223.
- 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., HUNTER, W. S., WRIGHT, J. M., AHOKAS, R. A., LLANOS, Q. J. & MASHBURN, T. A., JR. (1987). Thermoregulatory responses of guinea pigs with anteroventral third ventricle lesions. *Can J Physiol Pharmacol* **65**, 1261-1266.
- BLATTEIS, C.M., LI, S., LI, Z., PERLIK, V. & FELEDER, C. (2004). Signaling the brain in systemic inflammation: The role of complement. *Front Biosci* **9**, 915-931.
- BLATTEIS, C. M., MASHBURN, T. A., JR. & AHOKAS, R. A. (1981). Fever and trace metal changes in endotoxin-challenged neonates. *Pflugers Arch* **389**, 177-179.
- BLOMQVIST, A. & ENGBLOM, D. (2018). Neural mechanisms of inflammation-induced fever. *Neuroscientist* **24**, 381-399.
- BOONE, R. F., PARR, R. P. & MOSS, B. (1979). Intermolecular duplexes formed from polyadenylylated vaccinia virus RNA. *J Virol* **30**, 365-374.
- BORTZ, J. (1989). *Statistik*. Springer Verlag, Berlin.
- BOULANT, J. A. & DEAN, J. B. (1986). Temperature receptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **48**, 639-654.
- BOULANT, J. A. & HARDY, J. D. (1974). The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J Physiol* **240**, 639-660.

- BOWIE, A. & O'NEILL, L. A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**, 508-514.
- BOWMAN, C. C., RASLEY, A., TRANGUCH, S. L. & MARRIOTT, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* **43**, 281-291.
- BSIBSI, M., RAVID, R., GVERIC, D. & VAN NOORT, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 1013-1021.
- BULLEN, J. J., ROGERS, H. J., SPALDING, P. B. & WARD, C. G. (2005). Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**, 325-330.
- BYRD-LEIFER, C. A., BLOCK, E. F., TAKEDA, K., AKIRA, S. & DING, A. (2001). The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* **31**, 2448-2457.
- CANO, G., PASSERIN, A. M., SCHILTZ, J. C., CARD, J. P., MORRISON, S. F. & SVED, A. F. (2003). Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* **460**, 303-326.
- CAO, C. Y., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K. & WATANABE, Y. (1995). Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain Res* **697**, 187-196.
- CAO, W.-H., FAN, W. & MORRISON, S. F. (2004). Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* **126**, 229-240.
- CAO, Z., HENZEL, W. J. & GAO, X. (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* **271**, 1128-1131.
- CARPENTIER, P. A., BEGOLKA, W. S., OLSON, J. K., ELHOFY, A., KARPUS, W. J. & MILLER, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* **49**, 360-374.
- 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 USA* **72**, 3666-3670.
- CARTMELL, T., LUHESHI, G. N. & ROTHWELL, N. J. (1999). Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *J Physiol* **518 (Pt 2)**, 585-594.
- 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.

- CATERINA, M. J., ROSEN, T. A., TOMINAGA, M., BRAKE, A. J. & JULIUS, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436-441.
- CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D. & JULIUS, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824.
- CECHETTO, D. F., STANDAERT, D. G. & SAPER, C. B. (1985). Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **240**, 153-160.
- CHAI, C. Y. & LIN, M. T. (1973). Effects of thermal stimulation of medulla oblongata and spinal cord on decerebrate rabbits. *J Physiol* **234**, 409-419.
- 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-1b: A study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med* **183**, 311-316.
- CHAMAILLARD, M., HASHIMOTO, M., HORIE, Y., MASUMOTO, J., QIU, S., SAAB, L., OGURA, Y., KAWASAKI, A., FUKASE, K., KUSUMOTO, S., VALVANO, M. A., FOSTER, S. J., MAK, T. W., NUNEZ, G. & INOHARA, N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **4**, 702-707.
- CHAMPNEY, K. J., LEVINE, D. P., LEVY, H. B. & LERNER, A. M. (1979). Modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex: sustained interferonemia and its physiological associates in humans. *Infect Immun* **25**, 831-837.
- CHEN, X. M., HOSONO, T., YODA, T., FUKUDA, Y. & KANOSUE, K. (1998). Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol* **512** (Pt 3), 883-892.
- CHOE, J., KELKER, M. S. & WILSON, I. A. (2005). Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**, 581-585.
- CHUANG, J., LIN, M. T., CHAN, S. A. & WON, S. J. (1990). Febrile effects of polyriboinosinic acid: polyribocytidylic acid and interferon: relationship to somatostatin in rat hypothalamus. *Pflugers Arch* **415**, 606-610.
- COBAN, C., ISHII, K. J., KAWAI, T., HEMMI, H., SATO, S., UEMATSU, S., YAMAMOTO, M., TAKEUCHI, O., ITAGAKI, S., KUMAR, N., HORII, T. & AKIRA, S. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **201**, 19-25.
- COCEANI, F., BISHAI, I., DINARELLO, C. A. & FITZPATRICK, F. A. (1983). Prostaglandin E2 and thromboxane B2 in cerebrospinal fluid of afebrile and febrile cat. *Am J Physiol* **244**, R785-793.
- COLBY, C. & DUESBERG, P. H. (1969). Double-stranded RNA in vaccinia virus infected cells. *Nature* **222**, 940-944.

- CONTI, B., TABAREAN, I., ANDREI, C. & BARTFAI, T. (2004). Cytokines and fever. *Front Biosci* **9**, 1433-1449.
- COONS, A. H. & KAPLAN, M. H. (1950). Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* **91**, 1-13.
- COOPER, K. E., BLAHSER, S., MALKINSON, T. J., MERKER, G., ROTH, J. & ZEISBERGER, E. (1988). Changes in body temperature and vasopressin content of brain neurons, in pregnant and non-pregnant guinea pigs, during fevers produced by Poly I:Poly C. *Pflugers Arch* **412**, 292-296.
- COVERT, J. B. & REYNOLDS, W. W. (1977). Survival value of fever in fish. *Nature* **267**, 43-45.
- CRAIG, A. D., REIMAN, E. M., EVANS, A. & BUSHNELL, M. C. (1996). Functional imaging of an illusion of pain. *Nature* **384**, 258-260.
- CRISTINO, L., DE PETROCELLIS, L., PRYCE, G., BAKER, D., GUGLIEMOTTI, V. & DI MARZO, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* **139**, 1405-1415.
- CURRAS, M. C., KELSO, S. R. & BOULANT, J. A. (1991). Intracellular analysis of inherent and synaptic activity in hypothalamic thermosensitive neurones in the rat. *J Physiol* **440**, 257-271.
- DAMM, J., WIEGAND, F., HARDEN, L.M., GERSTBERGER, R., RUMMEL, C. & ROTH, J. (2012). Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod. *Neuroscience* **201**, 166-183.
- DAMM, J., WIEGAND, F., HARDEN, L.M., WENISCH, S., GERSTBERGER, R., RUMMEL, C. & ROTH, J. (2014). Intraperitoneal and subcutaneous injections of the TLR9 agonist ODN 1668 in rats: brain inflammatory responses are related to peripheral IL-6 rather than interferons. *J Neuroimmunol* **277**, 105-117.
- DANTZER, R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol* **500**, 399-411.
- DE BOUTEILLER, O., MERCK, E., HASAN, U. A., HUBAC, S., BENGUIGUI, B., TRINCHIERI, G., BATES, E. E. & CAUX, C. (2005). Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem* **280**, 38133-38145.
- DEITERS, U., GUMENSCHNEIDER, M., GALANOS, C. & MUHLRADT, P. F. (2003). Toll-like receptor 2- and 6-mediated stimulation by macrophage-activating lipopeptide 2 induces lipopolysaccharide (LPS) cross tolerance in mice, which results in protection from tumor necrosis factor alpha but in only partial protection from lethal LPS doses. *Infect Immun* **71**, 4456-4462.

- DESSON, S. E. & FERGUSON, A. V. (2003). Interleukin 1beta modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance. *J Physiol* **550**, 113-122.
- DOYLE, S., VAIDYA, S., O'CONNELL, R., DADGOSTAR, H., DEMPSEY, P., WU, T., RAO, G., SUN, R., HABERLAND, M., MODLIN, R. & CHENG, G. (2002). IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* **17**, 251-263.
- DOYLE, S. E., O'CONNELL, R., VAIDYA, S. A., CHOW, E. K., YEE, K. & CHENG, G. (2003). Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than Toll-like receptor 4. *J Immunol* **170**, 3565-3571.
- DUESBERG, P. H. & COLBY, C. (1969). On the biosynthesis and structure of double-stranded RNA in vaccinia virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**, 396-403.
- ELLIS, L. F. & KLEINSCHMIDT, W. J. (1967). Virus-like particles of a fraction of statolon, a mould product. *Nature* **215**, 649-650.
- ELLOUZ, F., ADAM, A., CIORBARU, R. & LEDERER, E. (1974). Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* **59**, 1317-1325.
- ELMQUIST, J. K., ACKERMANN, M. R., REGISTER, K. B., RIMLER, R. B., ROSS, L. R. & JACOBSON, C. D. (1993). Induction of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following *Pasteurella multocida* endotoxin administration. *Endocrinology* **133**, 3054-3057.
- ENGELHARDT, G., BOGEL, R., SCHNITZER, C. & UTZMANN, R. (1996). Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part 1. In vitro findings. *Biochem Pharmacol* **51**, 21-28.
- ENGLAND, S., BEVAN, S. & DOCHERTY, R. J. (1996). PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol* **495** (Pt 2), 429-440.
- ESEN, N., TANGA, F. Y., DELEO, J. A. & KIELIAN, T. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *J Neurochem* **88**, 746-758.
- ESKANDARI, M. K., NGUYEN, D. T., KUNKEL, S. L. & REMICK, D. G. (1990). WEHI 164 subclone 13 assay for TNF: sensitivity, specificity, and reliability. *Immunol Invest* **19**, 69-79.
- ESKILSSON, A., MATSUWAKI, T., SHINOYA, K., MIRRASEKHIAN, E., ZAJDEL, J., SCHWANINGER, M., ENGBLOM, D. & BLOMQVIST, A. (2017). Immune-induced fever is dependent on local but not generalized prostaglandin E2 synthesis in the brain. *J Neurosci* **37**, 5035-5044.
- ESKILSSON, A., MIRRASEKHIAN, E., DUFOUR, S., SCHWANINGER, M., ENGBLOM, D. & BLOMQVIST, A. (2014). Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on

- brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis. *J Neurosci* **34**, 11684-11690.
- 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.
- EVANS, T.J., MOYES, D., CARPENTER, A., MARTIN, R., LOETSCHER, H., LESSLAUER, W. & COHEN, J. (1994). Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor – immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of gram-negative sepsis. *J Exp Med* **180**, 2173-2179.
- FAMAHEY, J. P. (1997). In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: an overview. *Inflamm Res* **46**, 437-446.
- FARINA, C., KRUMBHOLZ, M., GIESE, T., HARTMANN, G., ALOISI, F. & MEINL, E. (2005). Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol* **159**, 12-19.
- FELDBERG, W. & SAXENA, P. N. (1971a). Fever produced by prostaglandin E1. *J Physiol* **217**, 547-556.
- FELDBERG, W. & SAXENA, P. N. (1971b). Further studies on prostaglandin E 1 fever in cats. *J Physiol* **219**, 739-745.
- FERREIRA, S. H., NAKAMURA, M. & DE ABREU CASTRO, M. S. (1978). The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins* **16**, 31-37.
- FIELD, A. K., LAMPSON, G. P., TYTELL, A. A., NEMES, M. M. & HILLEMANN, M. R. (1967a). Inducers of interferon and host resistance, IV. Double-stranded replicative form RNA (MS2-Ff-RNA) from E. coli infected with MS2 coliphage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 2102-2108.
- FIELD, A. K., TYTELL, A. A., LAMPSON, G. P. & HILLEMANN, M. R. (1967b). Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1004-1010.
- FIELD, A. K., YOUNG, C. W., KRAKOFF, I. H., TYTELL, A. A., LAMPSON, G. P., NEMES, M. M. & HILLEMANN, M. R. (1971). Induction of interferon in human subjects by poly I:C. *Proc Soc Exp Biol Med* **136**, 1180-1186.
- FITZGERALD, G. A., PEDERSEN, A. K. & PATRONO, C. (1983). Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* **67**, 1174-1177.
- FITZGERALD, K. A., ROWE, D. C., BARNES, B. J., CAFFREY, D. R., VISINTIN, A., LATZ, E., MONKS, B., PITHA, P. M. & GOLENBOCK, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**, 1043-1055.

- FORTIER, M. E., KENT, S., ASHDOWN, H., POOLE, S., BOKSA, P. & LUHESI, 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.
- FRANKENBERGER, M., PECHUMER, H. & ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. (1995). Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J Inflamm* **45**, 56-63.
- GALANOS, C., GUMENSCHMEIER, M., MUHLRADT, P., JIRILLO, E. & FREUDENBERG, M. (2000). MALP-2, a Mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? *J Endotoxin Res* **6**, 471-476.
- GAO, B. & TSAN, M. F. (2003a). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* **278**, 174-179.
- GAO, B. & TSAN, M. F. (2003b). Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem* **278**, 22523-22529.
- GARAMI, A., STEINER, A.A. & ROMANOVSKY, A.A. (2018). Fever and hypothermia in systemic inflammation. *Handb Clin Neurol* **157**, 565-597.
- GIRARDIN, S. E., BONECA, I. G., VIALA, J., CHAMAILLARD, M., LABIGNE, A., THOMAS, G., PHILPOTT, D. J. & SANSONETTI, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**, 8869-8872.
- 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 Regul Integr Comp Physiol* **272**, R675-681.
- GOEDDEL, D.V. (1999). Signal transduction by tumor necrosis factor: the Parker B. Francis Lectureship. *Chest* **116** (Suppl.), 695-735.
- GREEN, M. H. & VERMEULEN, C. W. (1994). Fever and the control of gram-negative bacteria. *Res Microbiol* **145**, 269-272.
- GREIS, A., MURGOTT, J., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. & ROTH, J. (2009). Effects of repeated injections of fibroblast-stimulating lipopeptide-1 on fever, formation of cytokines, and on the responsiveness to endotoxin in guinea pigs. *Acta Physiol* **197**, 35-45.
- GREIS, A., MURGOTT, J., RAFALZIK, S., GERSTBERGER, R., HUBSCHLE, T. & ROTH, J. (2007). Characterization of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R152-161.
- GRIEGER, T. A. & KLUGER, M. J. (1978). Fever and survival: the role of serum iron. *J Physiol* **279**, 187-196.
- GRIFFIN, J. D., KAPLE, M. L., CHOW, A. R. & BOULANT, J. A. (1996). Cellular mechanisms for neuronal thermosensitivity in the rat hypothalamus. *J Physiol* **492** (Pt 1), 231-242.

- GRIFFIN, J. D., SAPER, C. B. & BOULANT, J. A. (2001). Synaptic and morphological characteristics of temperature-sensitive and -insensitive rat hypothalamic neurones. *J Physiol* **537**, 521-535.
- GROSSMAN, C. J., WISEMAN, J., LUCAS, F. S., TREVETHICK, M. A. & BIRCH, P. J. (1995). Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelets and mononuclear cells by NSAIDs and Cox 2 inhibitors. *Inflamm Res* **44**, 253-257.
- GUILLOT, L., BALLOY, V., MCCORMACK, F. X., GOLENBOCK, D. T., CHIGNARD, M. & SI-TAHAR, M. (2002). Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* **168**, 5989-5992.
- GULER, A. D., LEE, H., IIDA, T., SHIMIZU, I., TOMINAGA, M. & CATERINA, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* **22**, 6408-6414.
- GUNTHORPE, M. J., BENHAM, C. D., RANDALL, A. & DAVIS, J. B. (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 183-191.
- 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.
- HACKER, H., REDECKE, V., BLAGOEV, B., KRATCHMAROVA, I., HSU, L. C., WANG, G. G., KAMPS, M. P., RAZ, E., WAGNER, H., HACKER, G., MANN, M. & KARIN, M. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204-207.
- HAMMEL, H. T. (1965). *Neurons and temperature regulation*. Saunders, Philadelphia.
- HAMMEL, H. T., HARDY, J. D. & FUSCO, M. M. (1960). Thermoregulatory responses to hypothalamic cooling in unanesthetized dogs. *Am J Physiol* **198**, 481-486.
- HAMMEL, H. T., JACKSON, D. C., STOLWIJK, J. A., HARDY, J. D. & STROMME, S. B. (1963). Temperature Regulation by Hypothalamic Proportional Control with an Adjustable Set Point. *J Appl Physiol* **18**, 1146-1154.
- HARDEN, L.M., DU PLESSIS, I, ROTH, J., LORAM, L.C., POOLE, S. & LABURN, H.P. (2011). Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 β and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Psychoneuroendocrinol* **36**, 608-622.
- HARDEN, L.M., RUMMEL, C., LABURN, H.P., DAMM, J., WIEGAND, F., POOLE, S., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2014). Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of febr and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **466**, 1451-1466.
- HARE, A. S., CLARKE, G. & TOLCHARD, S. (1995). Bacterial lipopolysaccharide-induced changes in FOS protein expression in the rat brain: correlation with thermoregulatory changes and plasma corticosterone. *J Neuroendocrinol* **7**, 791-799.

- HARRE, E. M., ROTH, J., GERSTBERGER, R. & HUBSCHLE, T. (2003). Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Research* **980**, 151-155.
- HARRE, E. M., ROTH, J., PEHL, U., KUETH, M., GERSTBERGER, R. & HUBSCHLE, T. (2002). Molecular biology of thermoregulation - Selected contribution: Role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *Journal of Applied Physiology* **92**, 2657-2666.
- HART, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* **12**, 123-137.
- HASHIMOTO, C., HUDSON, K. L. & ANDERSON, K. V. (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279.
- HAYASHI, F., SMITH, K. D., OZINSKY, A., HAWN, T. R., YI, E. C., GOODLETT, D. R., ENG, J. K., AKIRA, S., UNDERHILL, D. M. & ADEREM, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103.
- HAYNES, L. M., MOORE, D. D., KURT-JONES, E. A., FINBERG, R. W., ANDERSON, L. J. & TRIPP, R. A. (2001). Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* **75**, 10730-10737.
- HEIL, F., HEMMI, H., HOCHREIN, H., AMPENBERGER, F., KIRSCHNING, C., AKIRA, S., LIPFORD, G., WAGNER, H. & BAUER, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529.
- HEINRICH, P.C., BEHRMANN, I., MÜLLER-NEWEN, G., SCHAPER, F. & GRAEVE, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334**, 297-314.
- HEINZ, S., HAEHNEL, V., KARAGHIOSOFF, M., SCHWARZFISCHER, L., MULLER, M., KRAUSE, S. W. & REHLI, M. (2003). Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* **278**, 21502-21509.
- HEMMI, H., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., SATO, S., SANJO, H., HOSHINO, K., HORIUCHI, T., TOMIZAWA, H., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200.
- HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745.
- HIGGS, E. A., MONCADA, S. & VANE, J. R. (1978). Inflammatory effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-oxo-PGF₁alpha in the rat paw. *Prostaglandins* **16**, 153-162.

- HIGUCHI, M. & AGGARWAL, B.B. (1992). Modulation of two forms of tumor necrosis factor receptors and their cellular response to by soluble receptors and their monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **267**, 20892-20899.
- HIRANO, T., TAGA, T., YAMASAKI, K., MATSUDA, T., YASUKAWA, K., HIRATA, Y., YAWATA, H., TANABE, O., AKIRA, S. & KISHIMOTO, T. (1989). Molecular cloning of the cDNA for interleukin-6 / B-cell stimulating factor 2 and its receptor. *Ann NY Acad Sci* **557**, 167-178.
- HORI, A., MINATO, K. & KOBAYASHI, S. (1999). Warming-activated channels of warm-sensitive neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience Letters* **275**, 93-96.
- HORN, K. D. (1998). Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Qjm* **91**, 265-277.
- HORNG, T., BARTON, G. M., FLAVELL, R. A. & MEDZHITOV, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**, 329-333.
- HORNUNG, V., ROTHENFUSSER, S., BRITSCH, S., KRUG, A., JAHRSDORFER, B., GIESE, T., ENDRES, S. & HARTMANN, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-4537.
- 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.
- HUANG, C.C., DUFFY, K.E., SAN MATEO, L.R., AMEGADZIE, B.Y., SARISKY, R.T. & MBOW, M.L. (2006). A pathway analysis of poly (I:C)-induced gene expression change in human peripheral blood mononuclear cells. *Physiol Genom* **26**, 125-133.
- HÜBSCHLE, T., MÜTZE, J., MÜHLRADT, 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.
- HUFF, R., COLLINS, P., KRAMER, S., SEIBERT, K., KOBOLDT, C., GREGORY, S. & ISAKSON, P. (1995). A structural feature of N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methanesulfonamide (NS-398) that governs its selectivity and affinity for cyclooxygenase 2 (COX2). *Inflamm Res* **44 Suppl 2**, S145-146.
- HULTMARK, D. (1994). Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 144-146.
- INOHARA, N., OGURA, Y., CHEN, F. F., MUTO, A. & NUNEZ, G. (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **276**, 2551-2554.
- INOHARA, N., OGURA, Y., FONTALBA, A., GUTIERREZ, O., PONS, F., CRESPO, J., FUKASE, K., INAMURA, S., KUSUMOTO, S., HASHIMOTO, M., FOSTER, S. J., MORAN, A. P., FERNANDEZ-LUNA, J. L. & NUNEZ, G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl

- dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**, 5509-5512.
- ISAACS, A. & LINDENMANN, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-267.
- IUPS. (2001). Glossary of terms for thermal physiology. Third edition. Revised by The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission). *Jpn J Physiol* **51**, 245-280.
- IVANOV, K. P. (2006). The development of the concepts of homeothermy and thermoregulation. *J Therm. Biol* **31**, 24-29.
- JACK, C. S., ARBOUR, N., MANUSOW, J., MONTGRAIN, V., BLAIN, M., MCCREA, E., SHAPIRO, A. & ANTEL, J. P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* **175**, 4320-4330.
- JACK, D. B. (1997). One hundred years of aspirin. *Lancet* **350**, 437-439.
- JACOBS, B. L. & LANGLAND, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-349.
- 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. *Neuroendocrinol* **62**, 55-61.
- JARVIS, B. & FAULTS, D. (1999). Etanercept: a review of its use in rheumatoid arthritis. *Drugs* **57**, 945-966.
- JIANG, Q., DETOLLA, L., SINGH, I. S., GATDULA, L., FITZGERALD, B., VAN ROOIJEN, N., CROSS, A. S. & HASDAY, J. D. (1999). Exposure to febrile temperature upregulates expression of pyrogenic cytokines in endotoxin-challenged mice. *Am J Physiol* **276**, R1653-1660.
- JIANG, Z., ZAMANIAN-DARYOUSH, M., NIE, H., SILVA, A. M., WILLIAMS, B. R. & LI, X. (2003). Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem* **278**, 16713-16719.
- JOHNSON, G. B., BRUNN, G. J., KODAIRA, Y. & PLATT, J. L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* **168**, 5233-5239.
- JOHNSON, G. B., BRUNN, G. J., TANG, A. H. & PLATT, J. L. (2003). Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. *Trends Immunol* **24**, 19-24.
- JORDAN, T., SCHORNACK, S. & LAHAYE, T. (2002). Alternative splicing of transcripts encoding Toll-like plant resistance proteins - what's the functional relevance to innate immunity? *Trends Plant Sci* **7**, 392-398.

- JORDT, S. E., BAUTISTA, D. M., CHUANG, H. H., MCKEMY, D. D., ZYGMUNT, P. M., HOGESTATT, E. D., MENG, I. D. & JULIUS, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260-265.
- JUETTLER, E., TARABIN, V. & SCHWANINGER, M. (2002). Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist* **8**, 268-275.
- JURK, M., HEIL, F., VOLLMER, J., SCHETTER, C., KRIEG, A. M., WAGNER, H., LIPFORD, G. & BAUER, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**, 499.
- KADOWAKI, N., HO, S., ANTONENKO, S., MALEFYT, R. W., KASTELEIN, R. A., BAZAN, F. & LIU, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**, 863-869.
- KAISER, W. J. & OFFERMANN, M. K. (2005). Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* **174**, 4942-4952.
- KAISHO, T. & AKIRA, S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* **22**, 78-83.
- KANG, D. C., GOPALKRISHNAN, R. V., WU, Q., JANKOWSKY, E., PYLE, A. M. & FISHER, P. B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 637-642.
- KAPTEIN, A., PAILLARD, V. & SAUNDERS, M. (1996). Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J Biol Chem* **271**, 5961-5964.
- KARIKO, K., BHUYAN, P., CAPODICI, J. & WEISSMAN, D. (2004a). Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* **172**, 6545-6549.
- KARIKO, K., NI, H., CAPODICI, J., LAMPHIER, M. & WEISSMAN, D. (2004b). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **279**, 12542-12550.
- KARJALAINEN, J. & VIITASALO, M. (1986). Fever and cardiac rhythm. *Arch Intern Med* **146**, 1169-1171.
- KASTENBAUER, S. & ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. (1999). NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun* **67**, 1553-1559.
- KATAFUCHI, T., HORI, T. & TAKE, S. (1991). Central administration of interferon-alpha enhances rat sympathetic nerve activity to the spleen. *Neurosci Lett* **125**, 37-40.
- KAWAI, T., ADACHI, O., OGAWA, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115-122.

- KAWAI, T., TAKAHASHI, K., SATO, S., COBAN, C., KUMAR, H., KATO, H., ISHII, K. J., TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-988.
- KAWAI, T., TAKEUCHI, O., FUJITA, T., INOUE, J., MUHLRADT, P. F., SATO, S., HOSHINO, K. & AKIRA, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**, 5887-5894.
- KAWASAKI, K., AKASHI, S., SHIMAZU, R., YOSHIDA, T., MIYAKE, K. & NISHIJIMA, M. (2000). Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* **275**, 2251-2254.
- KEATING, G.M. & PERRY, C.M. (2002). Infliximab: an updated review on its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *BioDrugs* **16**, 111-148.
- KELSO, S. R. & BOULANT, J. A. (1982). Effect of synaptic blockade on thermosensitive neurons in hypothalamic tissue slices. *Am J Physiol* **243**, R480-490.
- KIMURA, M., TOTH, L. A., AGOSTINI, H., CADY, A. B., MAJDE, J. A. & KRUEGER, J. M. (1994). Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *Am J Physiol* **267**, R1596-1605.
- KIRSCHNING, C. J., WESCHE, H., MERRILL AYRES, T. & ROTHE, M. (1998). Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**, 2091-2097.
- KISHIMOTO, T., AKIRA, S., NARAZAKI, M. & TAGA, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**, 1243-1254.
- KLUGER, M.J. (1991). Fever: Role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* **71**, 93-127.
- KLUGER, M. J. & ROTHENBURG, B. A. (1979). Fever and reduced iron: their interaction as a host defense response to bacterial infection. *Science* **203**, 374-376.
- KLUGER, M. J. & VAUGHN, L. K. (1978). Fever and survival in rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *J Physiol* **282**, 243-251.
- KNOPF, H.P., OTTO, F., ENGELHARDT, R., FREUDENBERG, M.A., GALANOS, C., HERRMANN, F. & SCHUHMANN, R.R. (1994). Discordant adaptation of human peritoneal macrophages to stimulation by lipopolysaccharide and the synthetic lipid A analogue SDZ MRL 953. Down regulation of TNF- α and IL-6 is paralleled by an upregulation of IL-1 β and granulocyte colony-stimulating factor expression. *J Immunol* **153**, 287-299.
- KNORR, C., HÜBSCHLE, T., MURGOTT, J., MÜHLRADT, P.F., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2008). Macrophage activating lipopeptide-2 induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Res* **1205**, 36-46.

- KNORR, C., MARKS, D., GERSTBERGER, R., MÜHLRADT, P.F., ROTH, J. & RUMMEL, C. (2010). Peripheral and central cyclooxygenase products may contribute to the manifestation of brain-controlled sickness responses during localized inflammation induced by macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2). *Neurosci Lett* **479**, 107-111.
- KOBAYASHI, S., OKAZAWA, M., HORI, A., MATSUMURA, K. & HOSOKAWA, H. (2006). Paradigm shift in sensory system - Animals do not have sensors. *J Therm Biol* **31**, 19-23.
- KOLLISCH, G., KALALI, B. N., VOELCKER, V., WALLICH, R., BEHRENDT, H., RING, J., BAUER, S., JAKOB, T., MEMPEL, M. & OLLERT, M. (2005). Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* **114**, 531-541.
- KONSMAN, J. P., VIGUES, S., MACKERLOVA, L., BRISTOW, A. & BLOMQUIST, A. (2004). Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* **472**, 113-129.
- KOVACSOVICS, M., MARTINON, F., MICHEAU, O., BODMER, J. L., HOFMANN, K. & TSCHOPP, J. (2002). Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol* **12**, 838-843.
- KUMAR, M. V., NAGINENI, C. N., CHIN, M. S., HOOKS, J. J. & DETRICK, B. (2004). Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol* **153**, 7-15.
- KUNDT, H. W., BRUCK, K. & HENSEL, H. (1957). Hypothalamustemperatur und Hautdurchblutung der nichtnarkotisierten Katze. *Pflugers Arch* **264**, 97-106.
- KURT-JONES, E. A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L. M., JONES, L. P., TRIPP, R. A., WALSH, E. E., FREEMAN, M. W., GOLENBOCK, D. T., ANDERSON, L. J. & FINBERG, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**, 398-401.
- LAJQI, T., LANG, G.P., HAAS, F., WILLIAMS, D.L., HUDALLA, H., BAUER, M. GROTH, M., WETZKER, R., BAUER, R. (2019). Memory-like inflammatory responses of microglia to rising doses of LPS: key role of PI3Ky. *Front Immunol* **10**, 2492.
- LAMPSON, G. P., TYTELL, A. A., FIELD, A. K., NEMES, M. M. & HILLEMAN, M. R. (1967). Inducers of interferon and host resistance. I. Double-stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 782-789.
- LANSDORP, P. M., AARDEN, L. A., CALAFAT, J. & ZEILJEMAKER, W. P. (1986). A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol* **132**, 105-113.
- LARUE, K.E.A. & MCCALL, C.E. (1994). A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. *J Exp Med* **180**, 2269-2275.

- 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. *Nature Neurosci* **10**, 1131-1133.
- LEADBETTER, E. A., RIFKIN, I. R., HOHLBAUM, A. M., BEAUDETTE, B. C., SHLOMCHIK, M. J. & MARSHAK-ROTHSTEIN, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-607.
- LEE, H. Y., WHITESIDE, M. B. & HERKENHAM, M. (1998). Area postrema removal abolishes stimulatory effects of intravenous interleukin-1beta on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and c-fos mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* **46**, 495-503.
- LEE, J. Y., MARSHALL, J. A. & BOWDEN, D. S. (1994). Characterization of rubella virus replication complexes using antibodies to double-stranded RNA. *Virology* **200**, 307-312.
- LEISENGANG, S., OTT, D., GERSTBERGER, R., RUMMEL, C. & ROTH, J. (2018). Effects of thermal stimulation on neurons and astrocytes cultured from the rat median preoptic nucleus. *Neuroreport* **29**, 1469-1472.
- 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.
- LEMAY, L.G., VANDER, A.J. & KLUGER, M.J. (1990). Role of interleukin-6 in fever in rats. *Am J Physiol* **258**, R798-R803.
- LEMKE, P. A. & NASH, C. H. (1974). Fungal viruses. *Bacteriol Rev* **38**, 29-56.
- LENCZOWSKI, M.J., BLUTHE, R.M., ROTH, J., REES, G.S., RUSHFORTH, D.A., VAN DAM, A.M., TILDERS, F.J., DANTZER, R., ROTHWELL, N.J. & LUHESHI, G.N. (1999). Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behaviour in rats. *Am J Physiol* **276**, R652-R658.
- LEON, L.R. (2002). Cytokine regulation of fever: Studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol* **92**, 2648-2655.
- LEON, L.R., KOZAK, W., RUDOLPH, K. & KLUGER, M.J. (1999). An antipyretic role for interleukin-10 in LPS-fever in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **276**, R81-R89.
- LEWIS, U. J., RICKES, E. L., MCCLELLAND, L. & BRINK, N. G. (1959). Purification and characterization of the antiviral agent, helenin. *J Am Chem Soc* **81**, 4115.
- 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 cyclooxygenase-1^{-/-} mice. *Brain Res* **825**, 86-94.
- LI, Z., PERLIK, V., FELEDER, C., TANG, Y. & BLATTEIS, C.M. (2006). Kupffer cell-generated PGE₂ triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1262-R1270.

- LIEDTKE, W., CHOE, Y., MARTI-RENOM, M. A., BELL, A. M., DENIS, C. S., SALI, A., HUDSPETH, A. J., FRIEDMAN, J. M. & HELLER, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525-535.
- LIEN, E., SELLATI, T. J., YOSHIMURA, A., FLO, T. H., RAWADI, G., FINBERG, R. W., CARROLL, J. D., ESPEVIK, T., INGALLS, R. R., RADOLF, J. D. & GOLENBOCK, D. T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* **274**, 33419-33425.
- LIN, M. S., COMINGS, D. E. & ALFI, O. S. (1977). Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma* **60**, 15-25.
- LIU, D., CAO, S., ZHOU, Y. & XIONG, Y. (2018). Recent advances in endotoxin tolerance. *J Cell Biochem* **2018**, 1-15.
- LONG, N.J., KUNKEL, S.L., VANDER, A.J. & KLUGER, M.J. (1990). Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **258**, R332-R337.
- LOPEZ-COLLAZO, E. & DEL FRESNO, C. (2013). Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care* **17**, 242.
- LOTZE, M.T. & TRACEY, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB 1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* **5**, 331-342.
- LUND, J., SATO, A., AKIRA, S., MEDZHITOV, R. & IWASAKI, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 513-520.
- MACKOWIAK, P. A. (2000). Physiological rationale for suppression of fever. *Clin Infect Dis* **31 Suppl 5**, S185-189.
- MAGES, J., DIETRICH, H. & LANG, R (2008). A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology* **212**, 723-737.
- MAGOUN, H. W., HARRISON, F., BROBECK, J. R. & RANSON, S. W. (1938). Activation of heat loss mechanisms by local heating of the brain. *J Neurophysiol* **1**, 101-114.
- MAJDE, J.A., KAPÁS, L., BOHNET, S.G., DE, A. & KRUEGER, J.M. (2010). Attenuation of the influenza virus sickness behavior in mice deficient in Toll-like receptor 3. *Brain Behav Immun* **24**, 306-315.
- MALVIN, G. M. & WOOD, S. C. (1992). Behavioral hypothermia and survival of hypoxic protozoans *Paramecium caudatum*. *Science* **255**, 1423-1425.

- MARK, K.S., TRICKLER, W.J. & MILLER, D.W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 1051-1058.
- MATSUDA, T., HORI, T. & NAKASHIMA, T. (1992). Thermal and PGE₂ sensitivity of the organum vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices. *J Physiol* **454**, 197-212.
- MATSUMOTO, M., FUNAMI, K., TANABE, M., OSHIUMI, H., SHINGAI, M., SETO, Y., YAMAMOTO, A. & SEYA, T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**, 3154-3162.
- MATSUMOTO, M., KIKKAWA, S., KOHASE, M., MIYAKE, K. & SEYA, T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1364-1369.
- MATSUMURA, K., CAO, C., OZAKI, M., MORII, H., NAKADATE, K. & WATANABE, Y. (1998). Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neurosci* **18**, 6279-6289.
- MATZINGER, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305.
- MCKEMY, D. D., NEUHAUSSER, W. M. & JULIUS, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-58.
- MEANS, T. K., HAYASHI, F., SMITH, K. D., ADEREM, A. & LUSTER, A. D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* **170**, 5165-5175.
- 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.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., KOPP, E., STADLEN, A., CHEN, C., GHOSH, S. & JANEWAY, C. A., JR. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-258.
- MEYLAN, E., CURRAN, J., HOFMANN, K., MORADPOUR, D., BINDER, M., BARTENSCHLAGER, R. & TSCHOPP, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172.
- MICHEAU, O. & TSCHOPP, J. (2003). Induction of TNF-receptor I-mediated apoptosis via two sequential signalling complexes. *Cell* **114**, 181-190.
- MILLER, A. J., HOPKINS, S. J. & LUHESHI, G. N. (1997a). Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* **120**, 1274-1279.

- MILLER, A. J., LUHESHI, G. N., ROTHWELL, N. J. & HOPKINS, S. J. (1997b). Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am J Physiol* **272**, R857-861.
- MILTON, A. S. & WENDLANDT, S. (1970). A possible role for prostaglandin E1 as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *J Physiol* **207**, 76P-77P.
- 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.
- MITCHELL, J. A., AKARASEREENONT, P., THIEMERMANN, C., FLOWER, R. J. & VANE, J. R. (1993). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11693-11697.
- MNICH, S. J., VEENHUIZEN, A. W., MONAHAN, J. B., SHEEHAN, K. C., LYNCH, K. R., ISAKSON, P. C. & PORTANOVA, J. P. (1995). Characterization of a monoclonal antibody that neutralizes the activity of prostaglandin E2. *J Immunol* **155**, 4437-4444.
- MONTAGNIER, L. & SANDERS, F. K. (1963). Replicative Form of Encephalomyocarditis Virus Ribonucleic Acid. *Nature* **199**, 664-667.
- MONTELL, C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2001**, RE1.
- MORRISON, S.F. & NAKAMURA, K. (2019). Central mechanisms for thermoregulation. *Ann Rev Physiol* **81**, 285-308.
- MÜHLRADT, P. F. & FRISCH, M. (1994). Purification and partial biochemical characterization of a Mycoplasma fermentans-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infect Immun* **62**, 3801-3807.
- MÜHLRADT, 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.
- MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GUNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P.C. & ROSE-JOHN, S. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* **23**, 473-480.
- MUELLER, F.S., RICETTO, J., HAYES, L.N., ZAMBON, A., POLLAK, D.D., SAWA, A., MEYER, U. & WEBER-STADLBAUER, U. (2019). Influence of poly(I:C) variability on thermoregulation, immune responses and pregnancy outcomes in mouse models of maternal immune activation. *Brain Behav Immun* **80**, 406-418.
- MÜLLER-NEVEN, G., KUSTER, A., HEMMAN, U., KEUL, R., HORSTEN, U., MARTENS, A., GRAEVE, L., WIJDENEWS, J. & HEINRICH, P.C. (1998). Soluble IL-6 receptors potentiates the antagonistic activity of soluble gp 130 on IL-6 responses. *J Immunol* **161**, 6347-6355.

- MURATA, T., USHIBUBI, F., MATSUOKA, T., HIRATA, M., YAMASAKI, A., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., AZE, Y., TANAKA, T., YOSHIDA, N., UENO, A., OH-ISHI, S. & NARUMIYA, S. (1997). Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* **388**, 678-682.
- MUZIO, M., BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., D'AMICO, G., STOPPACCIARO, A., MANCINELLI, R., VAN'T VEER, C., PENTON-ROL, G., RUCO, L. P., ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**, 5998-6004.
- MUZIO, M., NI, J., FENG, P. & DIXIT, V. M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612-1615.
- NAKAMURA, K., KANEKO, T., YAMASHITA, Y., HASEGAWA, H., KATOH, H., ICHIKAWA, A. & NEGISHI, M. (1999). Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* **260**, 117-120.
- 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., KANEKO, T., KOBAYASHI, S., KATOH, H. & NEGISHI, M. (2002). The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci* **22**, 4600-4610.
- NAKAMURA, K. & MORRISON, S. (2008a). Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *J Physiol*.
- NAKAMURA, K. & MORRISON, S. F. (2007). Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R127-136.
- NAKAMURA, K. & MORRISON, S. F. (2008b). A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* **11**, 62-71.
- NAKAMURA, Y., NAKAMURA, K., MATSUMURA, K., KOBAYASHI, S., KANEKO, T. & MORRISON, S. F. (2005). Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *European Journal of Neuroscience* **22**, 3137-3146.
- NAVARRO, V.P., OYOMASA, M.M., LEITE-PANISSI, C.R.A., ALMEIDA, M.C. & BRANCO, L.G.S. (2006). New role of the trigeminal nerve as a neuronal pathway signalling brain in acute periodontitis. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **453**, 73-82.
- NISHIMURA, M. & NAITO, S. (2005). Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull* **28**, 886-892.
- NOMURA, F., AKASHI, S., SAKAO, Y., SATO, S., KAWAI, T., MATSUMOTO, M., NAKANISHI, K., KIMOTO, M., MIYAKE, K., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000).

- Cutting edge: Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* **164**, 3476-3479.
- OGANESYAN, G., SAHA, S. K., GUO, B., HE, J. Q., SHAHANGIAN, A., ZARNEGAR, B., PERRY, A. & CHENG, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**, 208-211.
- OHASHI, K., BURKART, V., FLOHE, S. & KOLB, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* **164**, 558-561.
- OKA, T. (2004). Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin e (EP) receptors. *Front Biosci* **9**, 3046-3057.
- OKAMURA, Y., WATARI, M., JERUD, E. S., YOUNG, D. W., ISHIZAKA, S. T., ROSE, J., CHOW, J. C. & STRAUSS, J. F., 3RD. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 10229-10233.
- OKAZAWA, M., TAKAO, K., HORI, A., SHIRAKI, T., MATSUMURA, K. & KOBAYASHI, S. (2002). Ionic basis of cold receptors acting as thermostats. *J Neurosci* **22**, 3994-4001.
- O'NEILL, L. A. & GREENE, C. (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* **63**, 650-657.
- O'NEILL, L. A. J., FITZGERALD, K. A. & BOWIE, A. G. (2003). The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends in Immunology* **24**, 287-290.
- OSHIUMI, H., SASAI, M., SHIDA, K., FUJITA, T., MATSUMOTO, M. & SEYA, T. (2003). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* **278**, 49751-49762.
- OSTBERG, J. R., TAYLOR, S. L., BAUMANN, H. & REPASKY, E. A. (2000). Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response. *J Leukoc Biol* **68**, 815-820.
- OTT, D., MURGOTT, J., RAFALZIK, S., WUCHERT, F., SCHMALENBECK, B., ROTH, J. & GERSTBERGER, R. (2010). Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res* **1363**, 93-106.
- OTT, D., SIMM, B., POLLATZEK, E., GERSTBERGER, R., RUMMEL, C. & ROTH, J. (2015). Prostaglandin D2 modulates calcium signals induced by prostaglandin E2 in neurons of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* **597**, 159-163.
- OTT, D., WUCHERT, F., MURGOTT, J., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2012). The viral mimetic polyinosinic: polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier. *Neurosci Lett* **530**, 64-68.

- OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., FONTENOT, J. D., HAJJAR, A. M., SMITH, K. D., WILSON, C. B., SCHROEDER, L. & ADEREM, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-13771.
- PATAPOUTIAN, A., PEIER, A. M., STORY, G. M. & VISWANATH, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* **4**, 529-539.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. R. (2005). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press.
- PEIER, A. M., MOQRICH, A., HERGARDEN, A. C., REEVE, A. J., ANDERSSON, D. A., STORY, G. M., EARLEY, T. J., DRAGONI, I., MCINTYRE, P., BEVAN, S. & PATAPOUTIAN, A. (2002a). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-715.
- PEIER, A. M., REEVE, A. J., ANDERSSON, D. A., MOQRICH, A., EARLEY, T. J., HERGARDEN, A. C., STORY, G. M., COLLEY, S., HOGENESCH, J. B., MCINTYRE, P., BEVAN, S. & PATAPOUTIAN, A. (2002b). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**, 2046-2049.
- PENNICA, D., NEDWIN, G.E., HAYFLICK, J.S., SEEBURG, P.H., DERYNK, R., PALLADINO, M.A., KOHR, W.J., AGGARWAL, B.B. & GOEDDEL, D.V. (1984). Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-729.
- 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.
- PORTANOVA, J. P., ZHANG, Y., ANDERSON, G. D., HAUSER, S. D., MASFERRER, J. L., SEIBERT, K., GREGORY, S. A. & ISAKSON, P. C. (1996). Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med* **184**, 883-891.
- PREHAUD, C., MEGRET, F., LAFAGE, M. & LAFON, M. (2005). Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* **79**, 12893-12904.
- QURESHI, S. T., LARIVIERE, L., LEVEQUE, G., CLERMONT, S., MOORE, K. J., GROS, P. & MALO, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* **189**, 615-625.
- RAETZ, C. R., ULEVITCH, R. J., WRIGHT, S. D., SIBLEY, C. H., DING, A. & NATHAN, C. F. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Faseb J* **5**, 2652-2660.
- 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.

- RASSA, J. C., MEYERS, J. L., ZHANG, Y., KUDARAVALLI, R. & ROSS, S. R. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2281-2286.
- REHLI, M. (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* **23**, 375-378.
- RIVEST, S. (2003). Molecular insights into the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* **17**, 13-19.
- ROBERTS, N. J., JR. & STEIGBIGEL, R. T. (1977). Hyperthermia and human leukocyte functions: effects on response of lymphocytes to mitogen and antigen and bactericidal capacity of monocytes and neutrophils. *Infect Immun* **18**, 673-679.
- ROEDER, A., KIRSCHNING, C. J., RUPEC, R. A., SCHALLER, M., WEINDL, G. & KORTING, H. C. (2004). Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* **42**, 485-498.
- ROELOFS, M. F., BOELEN, W. C., JOOSTEN, L. A., ABDOLLAHI-ROODSAZ, S., GEURTS, J., WUNDERINK, L. U., SCHREURS, B. W., VAN DEN BERG, W. B. & RADSTAKE, T. R. (2006). Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* **176**, 7021-7027.
- ROLLINGHOFF, M. & WARNER, N. L. (1973). Specificity of in vivo tumor rejection assessed by mixing immune spleen cells with target and unrelated tumor cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **144**, 813-818.
- 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., SUGIMOTO, N., SIMONS, C. T. & HUNTER, W. S. (2003). The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling: a reappraisal of lesion experiments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R420-428
- ROSENDAHL, M.S., KO, S.C., LONG, D.L., BREWER, M.T., ROSENZWEIG, B., HEDL, E., ANDERSON, L., PYLE, S.M., MORELAND, J., MEYERS, M.A., KOHNO, T., LYONS, D. & LICHENSTEIN, H.S. (1997). Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor- α -processing enzyme from ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem* **272**, 24588-24593.
- ROSENTHAL, M., ROTH, J., STÖRR, B. & ZEISBERGER, E. (1996). Fever response in lean (Fa/-) and obese (fa/fa) Zucker rats and its lack to repeated injections of LPS. *Physiol & Behav* **59**, 787-793.
- 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. (1996). *Mechanismen der Fieberentstehung und der endogenen Antipyrese: Ein Experimentalmodell zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Immunsystem und Nervensystem*. Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- ROTH, J. (2015). Who is the gatekeeper to let inflammation enter the brain? A concerted action of endothelial and perivascular cells. *Brain Behav Immun* **48**, 29-30.
- ROTH, J., ASLAN, T., STORR, B. & ZEISBERGER, E. (1997a). Lack of cross tolerance between LPS and muramyl dipeptide in induction of circulating TNF-alpha and IL-6 in guinea pigs. *Am J Physiol* **273**, R1529-1533.
- ROTH, J. & BLATTEIS, C.M. (2014). Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol* **4**, 1563-1604.
- 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., HARRÉ, E.M., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R. & HÜBSCHLE, T. (2004a). Signaling the brain in systemic inflammation: Role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* **9**, 290-300.
- ROTH, J., HOPKINS, S. J., HOADLEY, M. E., TRIPP, A., ASLAN, T., STORR, B., LUHESHI, G. N. & ZEISBERGER, E. (1997b). Fever and production of cytokines in response to repeated injections of muramyl dipeptide in guinea-pigs. *Pflugers Arch* **434**, 525-533.
- ROTH, J., HÜBSCHLE, T., PEHL, U., ROSS, G. & GERSTBERGER, R. (2002). Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. *Pflugers Arch* **443**, 411-417.
- ROTH, J., MARTIN, D., STÖRR, B. & ZEISBERGER, E. (1998). Neutralization of bacterial pyrogen-induced circulating tumor necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea pigs: Effects on fever and endogenous formation of interleukin-6. *J Physiol* **509.1**, 267-275.
- ROTH, J., McCLELLAN, J.L., KLUGER, M.J. & ZEISBERGER, E. (1994). Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea pigs. *J Physiol* **477.1**, 177-185.
- ROTH, J., RUMMEL, C., HARRÉ, E.M., VOSS, T., MÜTZE, J., GERSTBERGER, R. & HÜBSCHLE, T. (2004b). Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine? *J Therm Biol* **29**, 383-389.
- ROTH, J., STORR, B., MARTIN, D., VOIGT, K. & ZEISBERGER, E. (2000). The role of local induction of tumor necrosis factor by LPS within a subcutaneous air pouch in the development of a febrile response in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* **7**, 169-176.
- ROTHENFUSSE, S., GOUTAGNY, N., DiPERNA, G., GONG, M., MONKS, B. G., SCHOENEMEYER, A., YAMAMOTO, M., AKIRA, S. & FITZGERALD, K. A. (2005). The RNA helicase Lgp2

- inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-1. *J Immunol* **175**, 5260-5268.
- ROTONDO, D., ABUL, H. T., MILTON, A. S. & DAVIDSON, J. (1987). The pyrogenic actions of the interferon-inducer, polyinosinic:polycytidylic acid are antagonised by ketoprofen. *Eur J Pharmacol* **137**, 257-260.
- ROTONDO, D., ABUL, H.T., MILTON, A.S., DAVIDSON, J. (1988). Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E₂ in the blood simultaneously with the onset of fever. *Eur J Pharmacol* **154**, 145-152.
- RUMMEL, C. (2016). Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain Behav Immun* **54**, 1-14.
- RUMMEL, C., BARTH, S. W., VOSS, T., KORTE, S., GERSTBERGER, R., HUBSCHLE, T. & ROTH, J. (2005a). Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R340-R347.
- 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. *Journal of Physiology-London* **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.
- RUMMEL, C., VOSS, T., MATSUMURA, K., KORTE, S., GERSTBERGER, R., ROTH, J. & HUBSCHLE, T. (2005b). Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *Journal of Comparative Neurology* **491**, 1-14.
- RYTEL, M. W., SHOPE, R. E. & KILBOURNE, E. D. (1966). An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. V. Induction of interferon by helenine. *J Exp Med* **123**, 577-584.
- SAGAR, S. M., SHARP, F. R. & CURRAN, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**, 1328-1331.
- SAHA, S., ENGSTROM, L., MACKERLOVA, L., JACOBSSON, P.J. & BLOMQVIST, A. (2005). Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin E synthase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R1100-1107.
- SAITOH, S., AKASHI, S., YAMADA, T., TANIMURA, N., KOBAYASHI, M., KONNO, K., MATSUMOTO, F., FUKASE, K., KUSUMOTO, S., NAGAI, Y., KUSUMOTO, Y., KOSUGI, A. & MIYAKE, K. (2004). Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol* **16**, 961-969.

- SAMUELS, B. C., ZARETSKY, D. V. & DiMICCO, J. A. (2002). Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe. *J Physiol* **538**, 941-946.
- SAMUELSSON, B. (1983). From studies of biochemical mechanism to novel biological mediators: prostaglandin endoperoxides, thromboxanes, and leukotrienes. Nobel Lecture, 8 December 1982. *Biosci Rep* **3**, 791-813.
- SATO, M., SUEMORI, H., HATA, N., ASAGIRI, M., OGASAWARA, K., NAKAO, K., NAKAYA, T., KATSUKI, M., NOGUCHI, S., TANAKA, N. & TANIGUCHI, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-548.
- SATO, S., SUGIYAMA, M., YAMAMOTO, M., WATANABE, Y., KAWAI, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **171**, 4304-4310.
- 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.
- SCHINDLER, R., MANCILLA, J., ENDRES, S., GHORBANI, R., CLARK, S.C. & DINARELLO, C.A. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* **75**, 40-47.
- SCHMIDT, K. N., LEUNG, B., KWONG, M., ZAREMBER, K. A., SATYAL, S., NAVAS, T. A., WANG, F. & GODOWSKI, P. J. (2004). APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* **172**, 138-143.
- SCHNARE, M., HOLT, A. C., TAKEDA, K., AKIRA, S. & MEDZHITOV, R. (2000). Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* **10**, 1139-1142.
- SCHÖBITZ, B., PEZESHKI, G., POHL, T., HEMMANN, U., HEINRICH, P.C., HOLSBOER, F. & REUL, J.M. (1995). Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB J* **9**, 659-664.
- SCHRODER, N. W., MORATH, S., ALEXANDER, C., HAMANN, L., HARTUNG, T., ZHRINGER, U., GOBEL, U. B., WEBER, J. R. & SCHUMANN, R. R. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* **278**, 15587-15594.

- 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.
- SCUMPIA, P. O., KELLY, K. M., REEVES, W. H. & STEVENS, B. R. (2005). Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes. *Glia* **52**, 153-162.
- SEELY, J.J. & GOSH, S. (2017). Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukocyte Biol* **101**, 107-119.
- SEHIC, E. & BLATTEIS, C.M. (1996). Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* **726**, 160-166.
- SETH, R. B., SUN, L., EA, C. K. & CHEN, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682.
- SHARMA, S., TENOEVER, B. R., GRANDVAUX, N., ZHOU, G. P., LIN, R. & HISCOTT, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-1151.
- SHIBATA, M. & BLATTEIS, C. M. (1991). Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis. *Brain Res* **562**, 323-326.
- 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.
- SHOPE, R. E. (1953a). An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. I. Effect upon infection in mice with swine influenza virus and Columbia SK encephalomyelitis virus. *J Exp Med* **97**, 601-625.
- SHOPE, R. E. (1953b). An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. II. Effect of helenine upon infection in mice with Semliki Forest virus. *J Exp Med* **97**, 627-638.
- SHOPE, R. E. (1953c). An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. III. General properties and characteristics of helenine. *J Exp Med* **97**, 639-650.
- SHOPE, R. E. (1966a). An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. IV. Inquiry into the mechanism by which helenine exerts its antiviral effect. *J Exp Med* **123**, 213-227.
- SHOPE, R. E. (1966b). An antiviral substance from *Penicillium funiculosum*. VII. An attempt to determine whether the material responsible for the antipassive immunity effect exhibited by mice injected with helenine is an interferon. *J Exp Med* **124**, 915-919.
- SIEGAL, F. P., KADOWAKI, N., SHODELL, M., FITZGERALD-BOCARSLY, P. A., SHAH, K., HO, S., ANTONENKO, S. & LIU, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835-1837.

- SIEMENS, J. & KAMM, G. B. (2018). Cellular populations and thermosensing mechanisms of the hypothalamic thermoregulatory center. *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.* **470**, 809-822.
- SIMON, E. (1974). Temperature regulation: the spinal cord as a site of extrahypothalamic thermoregulatory functions. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1-76.
- SIMON, E. (2000). The enigma of deep-body thermosensory specificity. *Int J Biometeorol* **44**, 105-120.
- SIMM, B., OTT, D., POLLATZEK, E., MURGOTT, J., GERSTBERGER, R., RUMMEL, C. & ROTH, J. (2016). Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. *Neurosci* **313**, 23-35.
- SIRKO, S., BISHAI, I. & COCEANI, F. (1989). Prostaglandin formation in the hypothalamus in vivo: effect of pyrogens. *Am J Physiol* **256**, R616-624.
- SMILEY, S. T., KING, J. A. & HANCOCK, W. W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* **167**, 2887-2894.
- SMITH, G. D., GUNTHORPE, M. J., KELSELL, R. E., HAYES, P. D., REILLY, P., FACER, P., WRIGHT, J. E., JERMAN, J. C., WALHIN, J. P., OOI, L., EGERTON, J., CHARLES, K. J., SMART, D., RANDALL, A. D., ANAND, P. & DAVIS, J. B. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**, 186-190.
- SMITH, J. B., KNOWLTON, R. P. & AGARWAL, S. S. (1978). Human lymphocyte responses are enhanced by culture at 40 degrees C. *J Immunol* **121**, 691-694.
- SMITH, J. E., JANSEN, A. S., GILBEY, M. P. & LOEWY, A. D. (1998). CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat. *Brain Res* **786**, 153-164.
- SONG, K., WANG, H., KAMM, G.B., POHLE, J., DE CASTRO REIS, F., HEPPENSTALL, P., WENDE, H., SIEMENS, J. (2016). The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* **353**, 1393-1398.
- SOSZYNSKI, D., KOZAK, W. & SZEWCZENKO, M. (1991). Course of fever response to repeated administration of sublethal doses of lipopolysaccharides, polyinosinic:polycytidylic acid and muramyl dipeptide to rabbits. *Experientia* **47**, 43-47.
- SPRAY, D. C. (1986). Cutaneous temperature receptors. *Annu Rev Physiol* **48**, 625-638.
- STEINER, A.A., IVANOV, A.I., SERRATS, J., HOSOKWA, H., PHAYRE, A.N., ROBBINS, J.R., ROBERTS, J.L., KOBAYASHI, S., MATSUMURA, K., SAWCHENKO, P.E. & ROMANOVSKY, A.A. (2006). Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol.* **4**, 1517-1524.
- STEINER, A.A., LI, S., LLANOS-Q, J. & BLATTEIS, C.M. (2001). Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous- and intracerebroventricular-LPS-induced fever in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* **9**, 263-275.

- STOCK, J. L., SHINJO, K., BURKHARDT, J., ROACH, M., TANIGUCHI, K., ISHIKAWA, T., KIM, H. S., FLANNERY, P. J., COFFMAN, T. M., MCNEISH, J. D. & AUDOLY, L. P. (2001). The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J Clin Invest* **107**, 325-331.
- STORY, G. M., PEIER, A. M., REEVE, A. J., EID, S. R., MOSBACHER, J., HRICK, T. R., EARLEY, T. J., HERGARDEN, A. C., ANDERSSON, D. A., HWANG, S. W., MCINTYRE, P., JEGLA, T., BEVAN, S. & PATAPOUTIAN, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829.
- 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.
- TAKAHASHI, Y., SMITH, P., FERGUSON, A. & PITTMAN, Q. J. (1997). Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol* **273**, R1690-1695.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 199-207.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14.
- TAKEUCHI, O., KAUFMANN, A., GROTE, K., KAWAI, T., HOSHINO, K., MORR, M., MUHLRADT, P. F. & AKIRA, S. (2000a). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* **164**, 554-557.
- TAKEUCHI, O., KAWAI, T., MUHLRADT, P. F., MORR, M., RADOLF, J. D., ZYCHLINSKY, A., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-940.
- TAKEUCHI, O., SATO, S., HORIUCHI, T., HOSHINO, K., TAKEDA, K., DONG, Z., MODLIN, R. L. & AKIRA, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10-14.
- TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., HOSHINO, K., ADACHI, O., OGAWA, T. & AKIRA, S. (2000b). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* **12**, 113-117.
- TANAKA, M., NAGASHIMA, K., MCALLEN, R. M. & KANOSUE, K. (2002). Role of the medullary raphe in thermoregulatory vasomotor control in rats. *J Physiol* **540**, 657-664.
- TANAKA, M., OWENS, N. C., NAGASHIMA, K., KANOSUE, K. & MCALLEN, R. M. (2006). Reflex activation of rat fusimotor neurons by body surface cooling, and its dependence on the medullary raphe. *J Physiol* **572**, 569-583.

- TANAKA, M., TONOUCHI, M., HOSONO, T., NAGASHIMA, K., YANASE-FUJIWARA, M. & KANOSUE, K. (2001). Hypothalamic region facilitating shivering in rats. *Jpn J Physiol* **51**, 625-629.
- TOBIAS, P. S., SOLDAU, K. & ULEVITCH, R. J. (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* **164**, 777-793.
- TOELLNER B., ROTH, J., STÖRR, 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. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* **440**, 925-932.
- TOMINAGA, M. & CATERINA, M. J. (2004). Thermosensation and pain. *J Neurobiol* **61**, 3-12.
- TOMINAGA, M., CATERINA, M. J., MALMBERG, A. B., ROSEN, T. A., GILBERT, H., SKINNER, K., RAUMANN, B. E., BASBAUM, A. I. & JULIUS, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531-543.
- TRACEY, K.J., BEUTLER, B., LOWRY, S.F., MERRYWAETHER, J., WOLPE, S., MILSARK, J.W., HARIRI, R.J., FAHEY III, T.J., ZENTELLA, A., ALBERT, J.D., SHIRES, G.T. & CERAMI, A. (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **234**, 470-474.
- TRACEY, K.J. & CERAMI, A. (1993). Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* **21**, S415-S422.
- TRACEY, K.J., FONG, Y., HESSE, D.G., MANOGUE, K.R., LEA, A.T., KUO, G.C., LOWRY, S.F. & CERAMI, A. (1987) Anti-cachectin / TNF monoclonal antibodies prevent septic during lethal bacteremia. *Nature* **330**, 662-664.
- TRAYNOR, T. R., MAJDE, J. A., BOHNET, S. G. & KRUEGER, J. M. (2004). Intratracheal double-stranded RNA plus interferon-gamma: a model for analysis of the acute phase response to respiratory viral infections. *Life Sci* **74**, 2563-2576.
- TSAN, M. F. & GAO, B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* **76**, 514-519.
- TYTELL, A. A., LAMPSON, G. P., FIELD, A. K. & HILLEMANN, M. R. (1967). Inducers of interferon and host resistance. 3. Double-stranded RNA from reovirus type 3 virions (reo 3-RNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1719-1722.
- UEMATSU, S., & AKIRA, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* **84**, 712-725.
- ULEVITCH, R. J. & TOBIAS, P. S. (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13**, 437-457.
- UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A., HAJJAR, A. M., STEVENS, A., WILSON, C. B., BASSETTI, M. & ADEREM, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-815.

- 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.
- VABULAS, R. M., WAGNER, H. & SCHILD, H. (2002). Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 169-184.
- VALLIERES, L., LACROIX, S. & RIVEST, S. (1997). Influence of interleukin-6 on neural activity and transcription of the gene encoding corticotrophin-releasing factor in the rat brain: An effect depending upon the route of administration. *European Journal of Neuroscience* **9**, 1461-1472.
- 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-1 beta. *Journal of Neurochemistry* **69**, 1668-1683.
- VANE, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**, 232-235.
- VASILACHE, A.M., QUIAN, H. & BLOMQUIST, A. (2015). Immune challenge by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide directs gene expression in distinct blood-brain barrier cells towards enhanced prostaglandin E2 signaling. *Brain Behav Immun* **48**, 31-41.
- VAUGHN, L. K., BERNHEIM, H. A. & KLUGER, M. J. (1974). Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Nature* **252**, 473-474.
- VELLANI, V., MAPPLEBECK, S., MORIONDO, A., DAVIS, J. B. & MCNAUGHTON, P. A. (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* **534**, 813-825.
- VISINTIN, A., LATZ, E., MONKS, B. G., ESPEVIK, T. & GOLENBOCK, D. T. (2003). Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 48313-48320.
- VISINTIN, A., MAZZONI, A., SPITZER, J. H., WYLLIE, D. H., DOWER, S. K. & SEGAL, D. M. (2001). Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* **166**, 249-255.
- VOSS, T., BARTH, S.W., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. & ROTH, J. (2007). STAT3 and COX-2 activation in the guinea-pig brain during fever induced by the Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic : polycytidylic acid. *Cell Tissue Res* **328**, 549-561.
- VOSS, T., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. & ROTH, J. (2006). Fever and circulating cytokines induced by double-stranded RNA in guinea pigs: dependence on the route of administration and effects of repeated injections. *Acta Physiol* **187**, 379-389.

- WAINWRIGHT, A., RUTTER, A. R., SEABROOK, G. R., REILLY, K. & OLIVER, K. R. (2004). Discrete expression of TRPV2 within the hypothalamo-neurohypophysial system: Implications for regulatory activity within the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Comp Neurol* **474**, 24-42.
- WALLIN, R. P., LUNDQVIST, A., MORE, S. H., VON BONIN, A., KIESSLING, R. & LJUNGGREN, H. G. (2002). Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* **23**, 130-135.
- WAN, W., JANZ, L., VRIEND, C. Y., SORENSEN, C. M., GREENBERG, A. H. & NANCE, D. M. (1993). Differential induction of c-Fos immunoreactivity in hypothalamus and brain stem nuclei following central and peripheral administration of endotoxin. *Brain Res Bull* **32**, 581-587.
- WANG, W. C., GOLDMAN, L. M., SCHLEIDER, D. M., APPENHEIMER, M. M., SUBJECK, J. R., REPASKY, E. A. & EVANS, S. S. (1998). Fever-range hyperthermia enhances L-selectin-dependent adhesion of lymphocytes to vascular endothelium. *J Immunol* **160**, 961-969.
- WATANABE, H., VRIENS, J., SUH, S. H., BENHAM, C. D., DROOGMANS, G. & NILIUS, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 47044-47051.
- WECHSELBERGER, M., WRIGHT, C. L., BISHOP, G. A. & BOULANT, J. A. (2006). Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal thermosensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R518-529.
- WEINBERG, E. D. (1974). Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* **184**, 952-956.
- WELSCH, J., HÜBSCHLE, T., MURGOTT, J., KIRSCHNING, C., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R. & ROTH, J. (2012). Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36. *Innate Immun* **18**, 541-559.
- WESCHE, H., HENZEL, W. J., SHILLINGLAW, W., LI, S. & CAO, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**, 837-847.
- WIEGAND, F. (2012). *Untersuchung zur Stärke systemischer und lokaler inflammatorischer Reaktionen bei der Ratte nach Stimulation mit spezifischen Agonisten der endosomalen Toll-like Rezeptoren 7 und 9*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen. VVB Laufersweiler Verlag, Giessen.
- WILHELMS, D.B., KIRILOV, M., MIRRASEKHIAN, E., ESKILSSON, A., KUGELBERG, U.O., KLAR, C., RIDDER, D.A., HERSCHMAN, H.R., SCHWANINGER, M., BLOMQUIST, A. & ENGBLOM, D. (2014). Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever. *J Neurosci* **34**, 11684-11690.
- WILSON, I., VOGEL, J. & SOMERVILLE, S. (1997). Signalling pathways: a common theme in plants and animals? *Curr Biol* **7**, R175-178.

- WON, S. J. & LIN, M. T. (1988). Pyrogenicity of interferon and its inducer in rabbits. *Am J Physiol* **254**, R499-507.
- 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.
- WUCHERT, F., OTT, D., MURGOTT, J., RAFALZIK, S., HITZEL, N., ROTH, J. & GERSTBERGER, R. (2008). Rat area postrema microglial cells act as sensors for the Toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* **204**, 66-74.
- WUCHERT, F., OTT, D., MURGOTT, J., RAFALZIK, S., HITZEL, N., ROTH, J. & GERSTBERGER, R. (2009). Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *J Neuroimmunol* **206**, 44-51.
- XU, H., RAMSEY, I. S., KOTECHA, S. A., MORAN, M. M., CHONG, J. A., LAWSON, D., GE, P., LILLY, J., SILOS-SANTIAGO, I., XIE, Y., DiSTEFANO, P. S., CURTIS, R. & CLAPHAM, D. E. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**, 181-186.
- XU, L. G., WANG, Y. Y., HAN, K. J., LI, L. Y., ZHAI, Z. & SHU, H. B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**, 727-740.
- XU, Y., TAO, X., SHEN, B., HORNG, T., MEDZHITOV, R., MANLEY, J. L. & TONG, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-115.
- YAMAGATA, K., MATSUMURA, K., INOUE, W., SHIRAKI, T., SUZUKI, K., YASHIDA, S., SUGIURA, H., CAO, C., WATANABE, Y. & KOBAYASHI, S. (2001). Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* **21**, 2669-2677.
- YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., SANJO, H., UEMATSU, S., KAISHO, T., HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KOBAYASHI, M., FUJITA, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420**, 324-329.
- YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., UEMATSU, S., HOSHINO, K., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 1144-1150.
- YANG, E., SHIN, J. S., KIM, H., PARK, H. W., KIM, M. H., KIM, S. J. & CHOI, I. H. (2004). Cloning of TLR3 isoform. *Yonsei Med J* **45**, 359-361.
- YANG, R. B., MARK, M. R., GRAY, A., HUANG, A., XIE, M. H., ZHANG, M., GODDARD, A., WOOD, W. I., GURNEY, A. L. & GODOWSKI, P. J. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288.

- YAROVINSKY, F. & SHER, A. (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **36**, 255-259.
- YAROVINSKY, F., ZHANG, D., ANDERSEN, J. F., BANNENBERG, G. L., SERHAN, C. N., HAYDEN, M. S., HIENY, S., SUTTERWALA, F. S., FLAVELL, R. A., GHOSH, S. & SHER, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**, 1626-1629.
- YONEYAMA, M., KIKUCHI, M., MATSUMOTO, K., IMAIZUMI, T., MIYAGISHI, M., TAIRA, K., FOY, E., LOO, Y. M., GALE, M., JR., AKIRA, S., YONEHARA, S., KATO, A. & FUJITA, T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**, 2851-2858.
- YONEYAMA, M., KIKUCHI, M., NATSUKAWA, T., SHINOBU, N., IMAIZUMI, T., MIYAGISHI, M., TAIRA, K., AKIRA, S. & FUJITA, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737.
- YONEYAMA, M., SUHARA, W., FUKUHARA, Y., FUKUDA, M., NISHIDA, E. & FUJITA, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J* **17**, 1087-1095.
- YOUN, H. S., SAITOH, S. I., MIYAKE, K. & HWANG, D. H. (2006). Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol* **72**, 62-69.
- YOUNG, C. W. (1971). Interferon induction in cancer: with some observations on the clinical effects of poly I:C. *Med Clin North Am* **55**, 721-728.
- ZAREMBER, K. A. & GODOWSKI, P. J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* **168**, 554-561.
- ZARETSKAIA, M. V., ZARETSKY, D. V., SHEKHAR, A. & DIMICCO, J. A. (2002). Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Research* **928**, 113-125.
- ZEISBERGER, E., MERKER, G. & BLAHSER, S. (1981). Fever response in the guinea pig before and after parturition. *Brain Res* **212**, 379-392.
- ZEISBERGER, E. & ROTH, J. (1998). Tolerance to pyrogens. *Ann NY Acad Sci* **856**, 116-131.
- ZHANG, D., ZHANG, G., HAYDEN, M. S., GREENBLATT, M. B., BUSSEY, C., FLAVELL, R. A. & GHOSH, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-1526.
- ZHANG, Y. H., HOSONO, T., YANASE-FUJIWARA, M., CHEN, X. M. & KANOSUE, K. (1997). Effect of midbrain stimulations on thermoregulatory vasomotor responses in rats. *J Physiol* **503** (Pt 1), 177-186.
- ZIEGLER-HEIRBROCK, H.W. (1995). Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* **45**, 13-26.

- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W., WEDEL, A., SCHRAUT, W., STRÖBEL, M., WENDELGASS, P., STERNSDORF, T., BÄUERLE, P.A., HAAS, J.G. & RIETHMÜLLER, G. (1994). Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor κB with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* **269**, 17001-17004.
- ZIMMERMANN, K., LEFFLER, A., BABES, A., CENDAN, C. M., CARR, R. W., KOBAYASHI, J., NAU, C., WOOD, J. N. & REEH, P. W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* **447**, 855-858.

Eigene Publikationen

- ROTH, J., RUMMEL, C., HARRÉ, E.M., VOSS, T., MÜTZE, J., GERSTBERGER, R. & HÜBSCHLE, T. (2004). Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine? *J Therm Biol* **29**, 383-389.
- RUMMEL, C., BARTH, S. W., VOSS, T., KORTE, S., GERSTBERGER, R., HUBSCHLE, T. & ROTH, J. (2005a). Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R340-R347.
- RUMMEL, C., VOSS, T., MATSUMURA, K., KORTE, S., GERSTBERGER, R., ROTH, J. & HUBSCHLE, T. (2005b). Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *Journal of Comparative Neurology* **491**, 1-14.
- VOSS, T., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. & ROTH, J. (2006). Fever and circulating cytokines induced by double-stranded RNA in guinea pigs: dependence on the route of administration and effects of repeated injections. *Acta Physiol* **187**, 379-389.
- VOSS, T., BARTH, S.W., RUMMEL, C., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. & ROTH, J. (2007). STAT3 and COX-2 activation in the guinea-pig brain during fever induced by the Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic : polycytidylic acid. *Cell Tissue Res* **328**, 549-561.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den 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.

(Thilo Voß)



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6978-0



9 783835 196978 0