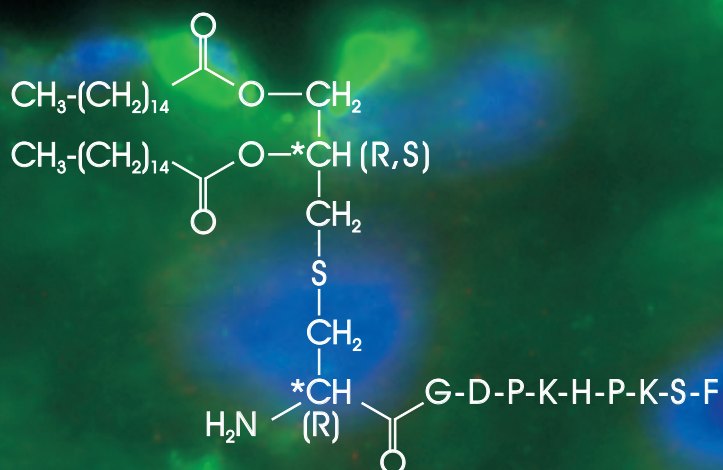


# CHARAKTERISIERUNG DER PYROGENEN EIGENSCHAFTEN DES FIBROBLASTEN- STIMULIERENDEN LIPOPEPTIDS-1 (FSL-1) BEIM MEERSCHWEINCHEN

**ANDREA GREIS**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

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

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

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

1. Auflage 2007

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

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Aus dem Institut für Veterinärphysiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

**Charakterisierung der pyrogenen Eigenschaften des  
Fibroblasten-stimulierenden Lipopeptids-1 (FSL-1)  
beim Meerschweinchen**

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

eingereicht von

**Andrea Greis**

Tierärztin aus Dillingen/Saar

Gießen 2007

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth  
Prof. Dr. Hans-Christian Siebert

Tag der Disputation: 05.07.2007

*Meiner Familie und meinem Freund Björn gewidmet*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>1.1</b>	<b>Fieber .....</b>	<b>- 12 -</b>
1.1.1	Fieber – ein kurzer historischer Abriss.....	- 12 -
1.1.2	Fieber – Nutzen oder Schrecken?.....	- 13 -
<b>1.2</b>	<b>Das Prinzip der Thermoregulation .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>1.3</b>	<b>Die Akut-Phase Reaktion und das „sickness behavior“ .....</b>	<b>- 16 -</b>
<b>1.4</b>	<b>Fiebererzeugende Substanzen: die Pyrogene .....</b>	<b>- 18 -</b>
1.4.1	Exogene Pyrogene.....	- 18 -
1.4.2	Endogene Pyrogene.....	- 18 -
<b>1.5</b>	<b>Zytokine als endogene Pyrogene und ihre Signalwege .....</b>	<b>- 19 -</b>
1.5.1	Das Netzwerk der Zytokine.....	- 19 -
1.5.1.1	Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) .....	- 22 -
1.5.1.1.1	Die TNF-Rezeptoren.....	- 23 -
1.5.1.1.2	Signaltransduktion am TNFR I.....	- 25 -
1.5.1.1.3	Signaltransduktion am TNFR II.....	- 28 -
1.5.1.2	Möglichkeiten zur Blockade von TNF .....	- 28 -
1.5.1.3	Interleukin 6 (IL-6) und sein Rezeptor .....	- 30 -
1.5.1.4	Signaltransduktion am IL-6R.....	- 32 -
<b>1.6</b>	<b>Die Interaktion von PAMPs mit Toll-like Rezeptoren .....</b>	<b>- 36 -</b>
1.6.1	„Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs).....	- 36 -
1.6.2	Ein klassisches PAMP: das Lipopolysaccharid (LPS) .....	- 36 -
1.6.3	Mycoplasmale Lipopeptide: die PAMPs MALP-2 und FSL-1 .....	- 38 -
1.6.3.1	Mycoplasmen.....	- 38 -
1.6.3.1.1	<i>Mycoplasma salivarium</i> und <i>Mycoplasma fermentans</i> .....	- 40 -
1.6.4	Das Makrophagen-stimulierende Lipopeptid-2 (MALP-2).....	- 40 -
1.6.5	Das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1) .....	- 43 -
1.6.6	Die Toll-like Rezeptoren .....	- 44 -
1.6.6.1	Der TLR4 als Rezeptor für LPS .....	- 49 -
1.6.6.2	Das TLR2/6 Heterodimer als Rezeptorpaar für mycoplasmale Lipopeptide .....	- 50 -
<b>1.7</b>	<b>Der Zylooxygenase Weg als wichtiger Zwischenschritt in der Fieberentstehung .-</b>	<b>51 -</b>
1.7.1	Die Zylooxygenasen.....	- 53 -
1.7.2	Prostagandin E <sub>2</sub> .....	- 55 -
<b>1.8</b>	<b>Fieberentstehungshypothesen .....</b>	<b>- 57 -</b>
1.8.1	Die Blut-Hirn Schranke (BHS) .....	- 58 -
1.8.2	Die zirkumventrikulären Organe (CVOs) .....	- 58 -
1.8.2.1	Die sensorischen CVOs .....	- 59 -

---

1.8.3	Die humorale Fieberhypothese.....	- 59 -
1.8.4	Die nervale Fieberhypothese.....	- 62 -
<b>1.9</b>	<b>Das Phänomen der Toleranzentwicklung gegenüber Pyrogenen .....</b>	<b>- 64 -</b>
1.9.1	Das Phänomen der Endotoxintoleranz .....	- 64 -
1.9.2	Toleranzentwicklung gegenüber anderen exogenen Pyrogenen.....	- 66 -
1.9.3	Toleranzentwicklung gegenüber endogenen Pyrogenen .....	- 68 -
<b>1.10</b>	<b>Ziele und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit.....</b>	<b>- 68 -</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>- 70 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>- 70 -</b>
2.1.1	Versuchstiere.....	- 70 -
2.1.2	Verwendete Geräte.....	- 71 -
2.1.3	Ge- und Verbrauchsmaterial .....	- 72 -
2.1.3.1	Medikamente .....	- 72 -
2.1.3.2	OP und OP Vorbereitung.....	- 72 -
2.1.3.3	Bioassays .....	- 73 -
2.1.3.4	Immunhistochemie .....	- 73 -
2.1.4	Der intraperitoneale Sender.....	- 74 -
2.1.5	Der intraarterielle Katheter.....	- 74 -
2.1.6	Verwendete Substanzen für die <i>in vivo</i> -Versuche.....	- 75 -
2.1.6.1	NaCl.....	- 75 -
2.1.6.2	PBS .....	- 75 -
2.1.6.3	Solvent.....	- 76 -
2.1.6.4	Heparin .....	- 76 -
2.1.6.5	Ethanol.....	- 76 -
2.1.6.6	Diclofenac.....	- 76 -
2.1.6.7	FSL-1 .....	- 77 -
2.1.6.8	LPS .....	- 78 -
2.1.6.9	Tumor Nekrose Faktor-Bindungsprotein (TNFbp).....	- 79 -
2.1.7	Verwendete Substanzen für den IL-6 Bioassay und das Passagieren der B9-Zelllinie .....	- 80 -
2.1.8	Verwendete Substanzen für den TNF Bioassay und das Passagieren der WEHI-Zelllinie .....	- 81 -
2.1.9	B9-Zelllinie .....	- 82 -
2.1.10	WEHI-Zellen.....	- 82 -
2.1.11	Verwendete Substanzen für den PGE <sub>2</sub> -ELISA.....	- 83 -
2.1.12	Verwendete Substanzen und Antikörper für die Immunhistochemie .....	- 83 -
2.1.12.1	Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) .....	- 83 -
2.1.12.2	Phosphatpuffer (0,1M PB).....	- 84 -
2.1.12.3	Paraformaldehyd (PFA).....	- 84 -
2.1.12.4	Primäre Antikörper .....	- 84 -

## -Inhalt-

---

2.1.12.5	Sekundäre Antikörper.....	- 85 -
2.1.12.6	Avidin/Biotin Blocking Kit .....	- 86 -
2.1.12.7	NHS-Blocking Lösung .....	- 86 -
2.1.12.8	Fluoreszenzfarbstoff .....	- 87 -
2.1.12.9	Gebrauchsfertige Substanzen.....	- 87 -
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>- 88 -</b>
2.2.1	Narkose und Operationstechniken.....	- 88 -
2.2.1.1	Narkose.....	- 88 -
2.2.1.2	Implantation des Verweilkatheters in die Arteria carotis.....	- 88 -
2.2.1.3	Implantation des Senders in die Bauchhöhle .....	- 89 -
2.2.2	Telemetrische Aufzeichnung der Körperkerntemperatur .....	- 90 -
2.2.3	Versuchsdurchführung .....	- 91 -
2.2.3.1	Zeitschema der in vivo Versuche.....	- 91 -
2.2.3.2	Applikation der Substanzen .....	- 92 -
2.2.3.3	Blutprobengewinnung aus dem Katheter.....	- 92 -
2.2.3.4	Aufbereitung der Proben.....	- 93 -
2.2.4	Analyse der Blutproben.....	- 93 -
2.2.4.1	Bioassays .....	- 93 -
2.2.4.2	Passagieren der B9-Zelllinie .....	- 94 -
2.2.4.3	Passagieren der WEHI-Zelllinie .....	- 94 -
2.2.4.4	Der IL-6-Bioassay .....	- 95 -
2.2.4.5	Der TNF-Bioassay .....	- 98 -
2.2.4.6	Der Prostaglandin E <sub>2</sub> ELISA .....	- 99 -
2.2.5	Immunhistochemische Analyse der Gehirnschnitte .....	- 101 -
2.2.5.1	Perfusion.....	- 101 -
2.2.5.2	Entnahme der Gehirne für die Immunfluoreszenz.....	- 101 -
2.2.5.3	Herstellen der Gehirnschnitte am Gefriermikrotom .....	- 102 -
2.2.5.4	Grundlagen der Immunhistochemie.....	- 103 -
2.2.5.5	Indirekte Immunfluoreszenz.....	- 103 -
2.2.5.6	Der STAT3 Antikörper.....	- 105 -
2.2.5.7	Immunhistochemisches Protokoll.....	- 105 -
2.2.6	Auswertung der Daten und Statistik.....	- 107 -
2.2.6.1	Computerprogramme.....	- 107 -
2.2.6.2	Telemetrische Daten .....	- 108 -
2.2.6.3	IL-6-Bioassay .....	- 109 -
2.2.6.4	TNF-Bioassay .....	- 109 -
2.2.6.5	PGE <sub>2</sub> -Immunoassay .....	- 111 -
2.2.6.6	Mikroskopie.....	- 111 -



---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>113</b>
<b>3.1</b>	<b>Pyrogene Eigenschaften von FSL-1.....</b>	<b>113</b>
3.1.1	Intraarterielle Injektionen.....	113
3.1.1.1	Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraarterieller Injektion verschiedener FSL-1 - Dosierungen im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppen .....	113
3.1.1.1.1	Niedrige Dosis .....	113
3.1.1.1.2	Hohe Dosis.....	114
3.1.1.2	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraarterieller Injektion verschiedener FSL-1-Dosierungen.....	115
3.1.1.2.1	Plasmawerte von TNF.....	115
3.1.1.2.2	Plasmawerte von IL-6 .....	117
3.1.2	Intraperitoneale Injektionen .....	119
3.1.2.1	Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraperitonealer Injektion verschiedener FSL-1 - Dosierungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe .....	119
3.1.2.1.1	Niedrige Dosis .....	119
3.1.2.1.2	Hohe Dosis.....	120
3.1.2.2	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Injektion verschiedener FSL-1-Dosierungen.....	121
3.1.2.2.1	Plasmawerte von TNF.....	121
3.1.2.2.2	Plasmawerte von IL-6.....	123
<b>3.2</b>	<b>Die Rolle von TNF bei der FSL-1 induzierten Fieberreaktion .....</b>	<b>124</b>
3.2.1	Das TNF-Bindungsprotein (TNFbp, „TNF binding protein“).....	124
3.2.1.1	Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp.....	125
3.2.1.2	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp.....	126
3.2.1.2.1	Plasmawerte von TNF.....	126
3.2.1.2.2	Plasmawerte von IL-6 .....	127
3.2.1.3	Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp.....	128
3.2.1.4	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit TNFbp .....	130
3.2.1.4.1	Plasmawerte von TNF.....	130
3.2.1.4.2	Plasmawerte von IL-6.....	130
<b>3.3</b>	<b>Die Rolle der Zyklooxygenasen bei der FSL-1-induzierten Fieberreaktion .....</b>	<b>132</b>
3.3.1	Der unselektive Zyklooxygenase Hemmer Diclofenac .....	132
3.3.1.1	Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem COX-Inhibitor Diclofenac .....	132

3.3.1.2	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit Diclofenac.....	134
3.3.1.2.1	Plasmawerte von TNF.....	134
3.3.1.2.2	Plasmawerte von IL-6.....	134
3.3.1.3	Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem COX-Inhibitor Diclofenac .....	135
3.3.1.4	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit Diclofenac .....	137
3.3.1.4.1	Plasmawerte von TNF.....	137
3.3.1.4.2	Plasmawerte von IL-6.....	137
3.3.1.5	Bildung von PGE <sub>2</sub> nach intraarterieller und intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem Zyklooxygenasehemmer Diclofenac.....	139
3.3.1.5.1	Intraarterielle Injektion .....	139
3.3.1.5.2	Intraperitoneale Injektion.....	140
<b>3.4</b>	<b>Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach Injektion von FSL-1.....</b>	<b>141</b>
3.4.1	Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 nach systemischer Stimulation von Meerschweinchen mit FSL-1 .....	141
3.4.2	Kolokalisation der nukleären STAT3 Translokation mit verschiedenen zellulären Phänotypen	144
3.4.2.1	vW positive Endothelzellen .....	144
3.4.2.2	GFAP –positive Astrozyten.....	145
3.4.2.3	NeuN-positive Zellen.....	146
<b>3.5</b>	<b>Toleranzerscheinungen gegenüber wiederholter Stimulation mit FSL-1 und Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS.....</b>	<b>146</b>
3.5.1	Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von FSL-1.....	147
3.5.2	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von FSL-1 .....	148
3.5.3	Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS bei intraarterieller Stimulation .....	150
3.5.4	Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 und TNF bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS nach intraarterieller Stimulation .....	150
3.5.5	Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von LPS.....	152
3.5.6	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von LPS.....	154
3.5.7	Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 bei intraarterieller Stimulation .....	156
3.5.8	Plasmakonzentration von bioaktivem TNF und IL-6 bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 nach intraarterieller Stimulation .....	156
3.5.9	Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von FSL-1 .....	158
3.5.10	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von FSL-1 .....	162
3.5.11	Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS bei intraperitonealer Stimulation .....	163

3.5.12	Plasmakonzentration von bioaktivem TNF und IL-6 bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS nach intraperitonealer Injektion.....	164
3.5.13	Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von LPS....	166
3.5.14	Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von LPS .....	168
3.5.15	Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 bei intraperitonealer Stimulation .....	170
3.5.16	Plasmakonzentration von bioaktivem TNF und IL-6 bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 nach intraperitonealer Injektion.....	171
<b>3.6</b>	<b>Einfluß wiederholter FSL-1 und LPS – Injektionen auf die Entwicklung des Körpergewichts.....</b>	<b>173</b>
3.6.1	Auswirkung der fünfmaligen Injektion von FSL-1 bei intraarterieller und intraperitonealer Applikation auf das Gewicht der Versuchstiere.....	173
3.6.2	Auswirkung der fünfmaligen Injektion von LPS bei intraarterieller und intraperitonealer Applikation auf das Gewicht der Versuchstiere.....	174
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>177</b>
<b>4.1</b>	<b>Pyrogene Eigenschaften von FSL-1.....</b>	<b>178</b>
4.1.1	Die Induktion von Fieber .....	178
4.1.2	Die FSL-1 induzierte Freisetzung von Zytokinen .....	180
4.1.2.1	Die Bedeutung des TNF .....	180
4.1.2.2	Die Bedeutung des IL-6.....	183
4.1.3	Die Bedeutung von COX und Prostaglandinen.....	184
4.1.4	Die Beteiligung der CVOs .....	185
4.1.4.1	Aktivierte Zellphänotypen .....	187
<b>4.2</b>	<b>Toleranz-Erscheinungen gegenüber Pyrogenen.....</b>	<b>188</b>
4.2.1	Die Endotoxin-Toleranz.....	188
4.2.2	Die Toleranz gegenüber FSL-1 .....	190
4.2.3	Die Kreuztoleranz .....	192
4.2.4	Anorektische Eigenschaften von FSL-1.....	194
<b>4.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>196</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>198</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>200</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>202</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>205</b>

<b>9 ANHANG.....</b>	<b>223</b>
<i>Publikationen.....</i>	<i>223</i>
<i>Danksagung.....</i>	<i>224</i>
<i>Erklärung.....</i>	<i>225</i>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Fieber

### 1.1.1 Fieber – ein kurzer historischer Abriss

Das bekannteste Phänomen im Rahmen von Erkrankungen ist das Fieber. Historische Quellen belegen, dass schon Ägypter und Griechen in der Antike Theorien zur Ursache des Fiebers aufstellten. Hippokrates (ca. 460-370 v.Chr.) vertrat die Ansicht, dass „Gesundheit bzw. deren Abwesenheit aus der Beziehung der Körpersäfte zueinander“ resultierte, also wurde Fieber als ein „Ungleichgewicht von Blut, Schleim, gelber und schwarzer Galle“ angesehen. Die erhöhte Körpertemperatur diente nach Meinung der Wissenschaftler dieser Zeit dazu, diesen Überschuss zu „verkochen“. Im Laufe der nächsten Jahrhunderte wurden des Weiteren viele z.T. sehr abwegige Ansichten über das Fieber verbreitet, z.B. Fieber sei eine „Strafe Gottes“ (zum Überblick: Atkins 1960). Obwohl Antoni van Leeuwenhoek schon 1676 Bakterien beobachtete und beschrieb, begann man erst Ende des 19. Jahrhunderts, den Zusammenhang zwischen Fieber und bakteriellen Zellwandbestandteilen zu verstehen. Louis Pasteur (1822-1895) prägte den Begriff der „Mikrobiologie“ und erkannte, dass Mikroben nicht nur nützlich sind, sondern auch in der Lage, eine Infektion hervorzurufen. Robert Koch (1843-1910) stellte als erster die These auf, dass jede Infektion durch einen bestimmten Mikroorganismus hervorgerufen wird. Ludwig Brieger (1849-1919) entdeckte 1886, dass Bakterien „giftige Stoffe“ bilden, die er Toxine nannte. 1892 brachte Richard Pfeiffer (1858-1945) durch die Isolierung eines hitzstabilen „Toxins“ aus *Vibrio cholerae* die Forschung über LPS (Lipopolysaccharid, siehe 1.6.2) in Gang. Er schrieb die endotoxischen Eigenschaften allerdings fälschlicherweise den grampositiven Bakterien zu. Eugenio Centanni (1863-1948) verstand zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen toxischen und pyrogenen Eigenschaften des „Giftes“ (zum Überblick: Beutler & Rietschel 2003). Allerdings können nicht nur das Endotoxin LPS, sondern auch andere Bestandteile von Bakterien, aber auch pathogene Mikroorganismen wie Viren, Pilze oder andere z.B. chemische oder physikalische Noxen, Fieber hervorrufen.

Dass Fieber allerdings nicht durch diese Stoffe selbst, sondern durch im Körper selbst synthetisierte Botenstoffe hervorgerufen wird, erkannte Beeson erst 1948, indem er eine Substanz aus Leukozyten isolierte, die in der Lage war, in gesunden Kaninchen Fieber zu erzeugen. Seine Entdeckung dieses Zytokins (1.5), das später Interleukin-1 (IL-1) genannt wurde, war ein immenser Fortschritt in der Erforschung des Fiebers.

Die Vorgänge in einem Organismus, der auf die Konfrontation mit einem pathogenen Agens mit der Entstehung von Fieber antwortet, sind sehr komplex und sollen in den nächsten Kapiteln näher beleuchtet werden.

### **1.1.2 Fieber – Nutzen oder Schrecken?**

Kluger et al. (1975) führten in den 70er Jahren Studien über die Nützlichkeit des Fiebers durch. Ihre Versuchstiere waren Eidechsen, die mit einem für diese Tierart pathologischen Bakterium (*Aeromonas hydrophila*) infiziert waren, und sie stellten fest, dass die Überlebensrate derjenigen Tiere am höchsten war, die einer hohen Umgebungstemperatur von 42°C ausgesetzt waren. Tiere, die nicht die Möglichkeit hatten, einen wärmeren Ort aufzusuchen, starben häufiger. Die Gabe eines Antipyretikums (Aspirin) wirkte sich ebenfalls kontraproduktiv aus. Eine weitere Studie von Kluger & Vaughn (1978) an nicht poikilothermen Tieren (Kaninchen) zeigte ähnliche Ergebnisse: Tiere mit einer Körpertemperaturerhöhung von bis zu 2,25°C nach *Pasteurella multocida*- Infektion überlebten häufiger als Tiere, die nur eine geringere Temperaturerhöhung zeigten, allerdings war eine Erhöhung darüber hinaus ebenfalls tödlich. Verschiedene Ursachen kommen für diesen positiven Effekt des Fiebers in Frage. Gram-negative Bakterien werden z.B. bei erhöhter Temperatur bei der Bildung von LPS gehemmt, so dass sie leichter angreifbar sind. Zudem hat Fieber auch immunologische Konsequenzen (Roberts 1991): es kommt zu einer Steigerung der Aktivität von Leukozyten, T-Zellproliferation, vermehrter Phagozytoseaktivität und Produktion von O<sub>2</sub>-Radikalen sowie Interferonen. Allerdings kann eine Dysregulation der Immunantwort zu endotoxischem Schock, einer Zytokinüberproduktion und damit zum so genannten SIRS (systemic inflammatory response syndrome), zu Sepsis und letztendlich zu multiplen Organversagen führen (Horn 1998). Daher scheint es sinnvoll, dass dem Fieber endogene antipyretische Substanzen wie Glucokortikoide, Arginin-Vasopressin, oder antipyretische Zytokine wie IL-10 entgegen

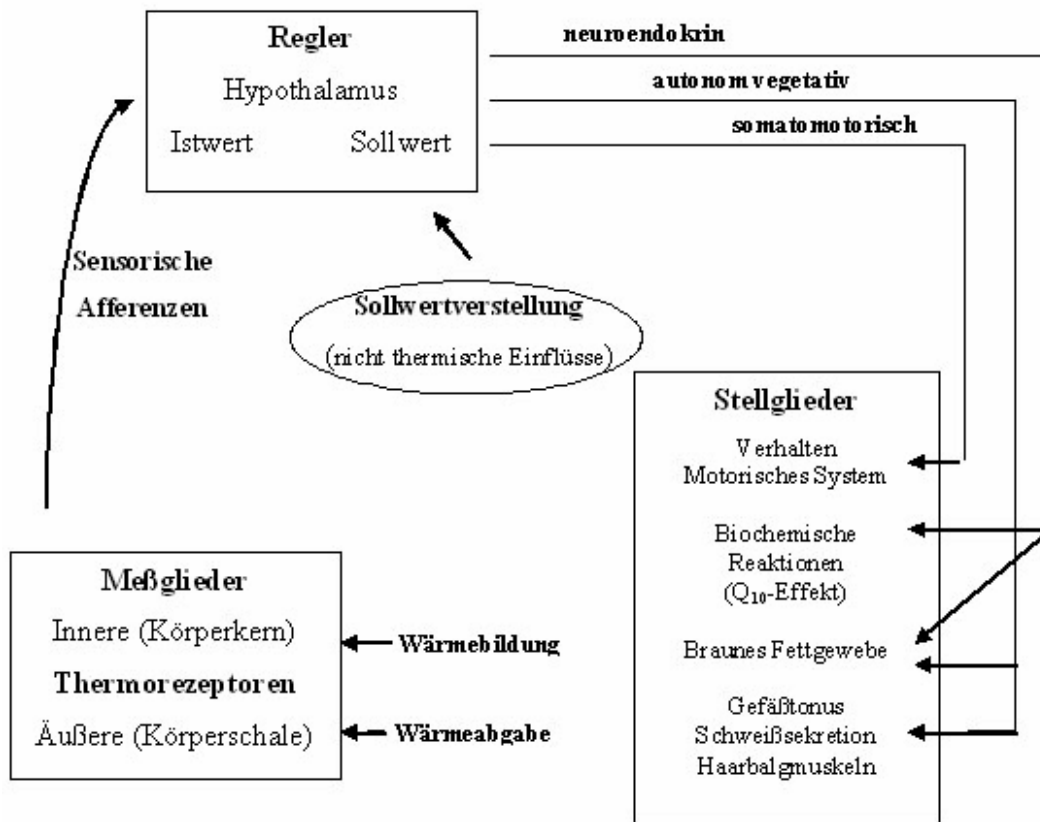
wirken (Roth et al. 2004a, Roth 2006). Auch Faktoren wie Immobilisierung, Streß oder Trächtigkeit können antipyretisch wirken (Roth 2006, Zeisberger & Roth 1994, Cooper et al. 1988). Ob es sich bei Fieber letztendlich um eine maladaptive oder adaptive Reaktion handelt, wird weiterhin kontrovers diskutiert (Roth 2002).

## **1.2 Das Prinzip der Thermoregulation**

Die Homöostase, also die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts lebensnotwendiger Stoffwechselprozesse, beinhaltet auch die Regulation der Körpertemperatur. Die „Isothermie“, die Balance zwischen Wärmeproduktion und Wärmeabgabe, ist daher ein wichtiger Bestandteil der Homöostase. Hierzu bedient sich der Körper zahlreicher Mechanismen (Abbildung 1). Poikilotherme Tiere sind dazu nicht in der Lage, sie suchen entsprechend kältere oder wärmere Plätze auf, um ihre Körpertemperatur zu regeln.

1875 beschrieb der deutsche Pathologe Liebermeister die Entstehung von Fieber folgendermaßen: „Der wesentliche Unterschied des Fieberkranken vom Gesunden besteht demnach weder in der höheren Körpertemperatur noch in der größeren Wärmeproduktion, sondern darin, dass Wärmeverlust und Wärmeproduktion für einen höheren Temperaturgrad reguliert werden. Zum Wesen des Fiebers gehört, dass die Wärmeregulierung auf einen höheren Temperaturgrad eingestellt ist“ (Liebermeister 1875). Mit dieser Aussage legte er die Grundlage der heutigen Definition des Fiebers und den Unterschied zwischen Fieber und Hyperthermie.

Werden die oberen oder unteren Grenzen der Thermoregulation überschritten, kommt es zu passiv erhöhten bzw. erniedrigten Körpertemperaturen, so genannter Hyperthermie bzw. Hypothermie. Zu einer Hyperthermie kommt es dann, wenn die Wärmeabgabemechanismen eines Organismus überlastet sind. Dies kann z.B. bei körperlicher Belastung in gewissen Grenzen physiologisch sein. Das Fortbestehen einer Hyperthermie allerdings führt zu einer schnellen Hirnschädigung durch zerebrale Ödeme und Zerstörung der Nervenzellen mit Todesfolge. Bei der Hypothermie ist der Wärmeverlust größer als die Wärmebildung. Auch sie ist bis zu einem gewissen Grad tolerierbar, sie wird sogar in der Medizin z.B. bei Herztransplantationen zur Sauerstoffeinsparung eingesetzt. Allerdings kann sie infolge einer Sepsis oder übermäßiger Kälteexposition lebensbedrohlich sein.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thermoregulation. In dem Regelkreis dienen Thermorezeptoren als Meßglieder, die Informationen über sensorische Afferenzen zum Gehirn senden. Der Hypothalamus als Regler vergleicht Ist- und Sollwert und kann über verschiedene Mechanismen Stellglieder aktivieren.**

Im Bereich des vorderen Hypothalamus (*Area hypothalamica anterior*) und der präoptischen Region (*Area präoptica*) erfolgt die Umsetzung der Temperatursignale in Steuersignale für thermoregulatorische Effekte. In diesen Regionen befindet sich die höchste Dichte an thermosensitiven Neuronen, von denen 30% warmsensitiv, 10% kaltsensitiv und 60% thermoinsensitiv sind (Eisenmann 1972), und die getrennt so genannte Effektorneurone kontrollieren (Boulant 1991). Eine lokale Stimulation dieser Regionen führt zu thermoregulatorischen Antworten in der Peripherie. Im Hypothalamus laufen alle eingehenden Informationen von den Thermosensoren (lokale und periphere) zusammen und werden dort gegen den Sollwert verglichen, um bei einer eventuellen Abweichung von Istwert und Sollwert Effektororgane zu aktivieren. Im Körperinneren gibt es so genannte Warmrezeptoren, in der Peripherie dominieren Kaltrezeptoren; beide dienen als eine Art



„Messfühler“ (Brück & Zeisberger 1990). Diese sind reziprok miteinander verschaltet. Daneben gibt es noch Interneurone, die eine reziprok hemmende Verbindung von Kaltsensoren zu Efferenzen der Wärmeabgabe und von Warmsensoren zur Efferenzen der Wärmebildung herstellen. Warmrezeptoren z.B. fördern die wärmeabgebenden Efferenzen und hemmen über die Interneurone die wärmebildenden Efferenzen.

Steigt die Außentemperatur, nimmt die Aktivität der Warmrezeptoren zu, die der Kaltrezeptoren ab. Eine Verschiebung der Körperkerntemperatur führt zu einer Aktivierung efferenter Systeme, die die Temperatur auf ihren Ausgangswert zurücksetzen sollen, wie beispielsweise Vasodilatation, -konstriktion, Schwitzen oder Zittern. Ist der „Input“ beider ausgeglichen, kommt es zu keiner Aktivierung von Effektorneuronen. Erfolgt ein Temperaturanstieg, werden Wärmesensoren aktiviert, es folgt eine gesteigerte Impulsrate der Neuronen für Wärmeabgabe und somit wird eine Wärmeproduktion gehemmt. Die Impulsrate der kaltsensitiven Neurone wird allerdings nicht beeinflusst bzw. vermindert, daher erfolgt aufgrund dieser Ungleichheit eine Aktivierung von Effektorneuronen, die für Wärmeabgabe zuständig sind. Die Körpertemperatur sinkt wieder und hiermit auch die Impulse der warmsensitiven Neurone, bis das Verhältnis wieder ausgeglichen ist.

Fieber ist ein Sonderfall der Thermoregulation, es ist das Resultat einer aktiven Verstellung des Sollwertes, den der Organismus dann zu erreichen versucht, indem er Wärme produziert und die Wärmeabgabe einschränkt. Diese Sollwertverstellung geschieht über Pyrogene (1.4), die die Aktivität hypothalamischer Neurone beeinflussen, und zwar kommt es wie beschrieben zu einer verminderten Impulsrate warmsensitiver Neurone, während die kaltsensitiven nicht betroffen sind (Boulant 1991). Durch die so entstandene Differenz wird letztendlich die Temperatur solange gesteigert, bis die Signale der warmsensitiven Neurone mit denen der kaltsensitiven wieder im Gleichgewicht stehen. Anders als bei der Hyperthermie kommt es also nicht zum Schwitzen, sondern zu einem Kältezittern. (vereinfachte Darstellung des Modells nach Hammel et al. 1963)

### **1.3 Die Akut-Phase Reaktion und das „sickness behavior“**

Nach Eindringen eines Fremdstoffes in einen Körper kommt es zu einer Vielzahl von komplexen Reaktionen, die sich zunächst lokal auf den Eintrittsort begrenzen, beispielsweise der Aktivierung und Rekrutierung von Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES),

welche dann Phagozytose betreiben und verschiedene Mediatoren (Stickstoffmonoxid (NO), Sauerstoffradikale ( $O_2$  Radikale), Prostaglandine (PG), Leukotriene (LT), Zytokine, Chemokine) sezernieren, die zu meist vaskulären Effekten wie Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung, Leukozytenmigration und Leukodiapedese, aber auch zur Stimulation sensorischer Nerven führen und die klassischen fünf Kardinalsymptome einer Entzündung (Rubor, Calor, Dolor, Tumor und Functio laesa) hervorrufen. Übersteigt die Entzündungsreaktion die Fähigkeiten der lokalen Mechanismen, kann sie sich zu einer systemischen, zentral gesteuerten Entzündungsreaktion ausdehnen und es kommt zu einer Reihe von Symptomen, die unter dem Begriff „Akut-Phase-Reaktion“ (APR) zusammengefasst werden. Es folgt die Bildung so genannter Akut-Phase Proteine (APP) in der Leber, die als Mediatoren einen großen regulatorischen Einfluß auf die Immunantwort haben. Die APR führt dann zu weiteren Symptomen wie Adipsie, Somnolenz, Anorexie, Aktivitätsverlust, Libidoverlust, Gewichtsverlust und Fieber, die unter dem Begriff des „*sickness behavior*“ zusammengefasst werden (Hart 1988). Im Laufe der APR kommt es auch zur Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysenachse (HPA-Achse), d.h. es kommt zu einer Ausschüttung von CRF (Corticotropin-releasing factor), der im paraventriculären hypothalamischen Nukleus gebildet wird und in der Adenohypophyse die Abgabe des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) ins Blutsystem induziert. Dies führt zu einer Produktion von Glucokortikoiden, die anti-inflammatorisch wirken und somit der Entzündungsreaktion einen negativen Feedback liefern.

Zytokine wie der Tumor Nekrose Faktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1), Interferon (IFN) und IL-6 werden als endogene Mediatoren der Akut-Phase-Reaktion angesehen (Kluger 1991) und sind somit mitentscheidend für Fieber und das „*sickness behavior*“ (Dantzer et al. 2001). Dabei ist diese Verhaltensänderung keineswegs eine passive Anpassung aufgrund von Schwäche, sondern Teil einer zentralnervös kontrollierten Reaktion, die der Aufrechterhaltung der Homöostase dient (Dantzer 2001). Die Abwehrstrategien eines Organismus sind sehr komplex und beinhalten neurologische, endokrine, metabolische und immunologische Veränderungen.

## **1.4 Fiebererzeugende Substanzen: die Pyrogene**

Pyrogene sind Stoffe, die - vereinfacht dargestellt - in der Lage sind, Fieber und seine Begleiterscheinungen auszulösen (Bennett & Beeson 1953).

Man unterscheidet zwischen endogenen und exogenen Pyrogenen (1.4.1 und 1.4.2). Für beide wurden von der IUPS Thermal Commission 2001 Definitionen festgelegt, die in 1.4.1 und 1.4.2 zusammenfassend und sinngemäß wiedergegeben werden.

### **1.4.1 Exogene Pyrogene**

Exogene Pyrogene sind Substanzen, die beim Eindringen in einen vielzelligen Organismus Fieber auslösen können. Allerdings ist nicht das exogene Pyrogen selbst fieberauslösend, sondern die von ihm induzierten endogenen Pyrogene. Das wohl wichtigste und am besten erforschte exogene Pyrogen ist das hitzestabile LPS (Lipopolysaccharid) gramnegativer Bakterien, das als „Endotoxin“ bezeichnet wird, da es in der Zellmembran dieser Bakterien inkorporiert ist. Weitere exogene Pyrogene sind im Prinzip bestimmte Komponenten von Viren, Bakterien, Pilzen oder auch andere nicht-mikrobielle Noxen wie chemische Stoffe oder Fremdproteine, die in der Lage sind, Fieber zu erzeugen. In experimentellen Studien oft verwendete Substanzen sind z.B. das Muramyl-dipeptid (MDP) als Zellwandbestandteil grampositiver Bakterien, das PI:PC (doppelsträngige RNA) als Nebenprodukt viraler Replikation. Über pyrogene Eigenschaften der erst kürzlich beschriebenen diacylierten Lipopeptide als Bestandteile mycoplasmaler Zellwände, wie das MALP-2 (Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2) bzw. das in der vorliegenden Arbeit näher untersuchte FSL-1 (Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1), liegen bislang, mit Ausnahme einer Studie (Hübschle et al. 2006), noch keine systematischen Untersuchungen vor.

### **1.4.2 Endogene Pyrogene**

Bei den endogenen Pyrogenen handelt es sich um körpereigene Polypeptide oder Proteine, die von den eigenen Zellen eines Organismus produziert werden und in ihm Fieber auslösen können. Auslösende Faktoren hierfür sind beispielsweise exogene Pyrogene (von außen) oder

auch Antigen-Antikörper-Komplexe (von innen). Laut der IUPS Thermal Commission 2001 gehören viele Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, Interferon- $\alpha$  und- $\gamma$  zu den endogenen Pyrogenen, aber auch Substanzen, die nicht zu den Zytokinen gezählt werden, wie z.B. Chemokine wie der Lymphozyten-aktivierende Faktor (LAF) oder das Makrophagen-Inflammatorische Protein-1 (MIP-1). Fast alle Körperzellen sind in der Lage, endogene Pyrogene zu produzieren, eine wichtige Bedeutung kommt hierbei aber vor allem den Zellen des Immunsystems, wie Leukozyten, Makrophagen oder auch Mikrogliazellen zu.

Kluger stellte 1991 fünf Kriterien auf, die ein endogenes Pyrogen erfüllen sollte. Zusammenfassend gehören hierzu die Eigenschaften, Fieber erzeugen zu können, auf die Stimulation mit einem exogenen Pyrogen im Organismus gebildet und freigesetzt zu werden, und zwar in quantitativem Zusammenhang mit dem Fieberanstieg, weitere thermoregulatorische Antworten hervorzurufen wie Vasokonstriktion oder eine Verhaltensänderung, und letztendlich durch Blockade entweder in seiner Entstehung oder in seiner biologischen Wirkung unter simultaner Abschwächung des Fiebers gehemmt werden zu können.

## **1.5 Zytokine als endogene Pyrogene und ihre Signalwege**

### **1.5.1 Das Netzwerk der Zytokine**

Zytokine sind lösliche, hitzelabile Polypeptide oder Glycoproteine mit einem Molekulargewicht <30 kDa. Zytokine werden konstitutiv nur in sehr geringen Mengen gebildet. Synthetisierende Zellen sind vor allem Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Endothelzellen. Zytokine können in drei funktionelle Gruppen eingeteilt werden, von denen die Typ I Zytokine die angeborene Immunantwort betreffen (z.B. TNF, IL-6, IL-1, IFN, Chemokine), die Typ II Zytokine die erworbene Immunantwort (z.B. IL-2, IL-4, IL-5, IL-13) und in eine dritte Gruppe gehören Zytokine, die die Hämatopoese regulieren (z.B. CSF, IL-3, IL-7). Eine strikte Trennung dieser Gruppen ist allerdings nicht möglich, so sind beispielsweise Typ I Zytokine wie IL-6 auch an der Hämatopoese beteiligt.

Die Produktion der Typ I Zytokine erfolgt über die Ebene der Translation und Transkription und wird meist über einen exogenen Stimulus wie beispielsweise LPS induziert. Typ II Zytokine werden überwiegend von antigentragenden T-Lymphozyten gebildet und dienen in

erster Linie der Proliferation und Differenzierung von B- und T- Lymphozyten. Die Typ III Zytokine werden von Zellen des Knochenmarks gebildet und regulieren die vielen Zwischenschritte der Hämatopoese.

Die Produktion von Zytokinen ist transient, d.h. eher kurzlebig. Sie haben einen relativ kleinen Aktionsradius, d.h. sie wirken eher parakrin, seltener auch autokrin. Um wirken zu können, besitzen sie hochaffine spezifische Rezeptoren (Taga & Kishimoto 1992). Auf zellulärer Ebene bewirken Zytokine über diese Rezeptoren und die dadurch in Gang gesetzten Signalkaskaden eine Veränderung im Genexpressionsmuster, was beispielsweise zu Zellproliferationen, Zelldifferenzierungen oder veränderten Zellfunktionen führt (Ibelgaufts 1995). Einige dieser Eigenschaften treffen auch auf Hormone zu, allerdings gibt es viele Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. In Tabelle 1 sind diese Unterschiede aufgeführt.

**Tabelle 1: Unterschiedliche Eigenschaften von Zytokinen und Hormonen**

	<b>Zytokine</b>	<b>Hormone</b>
<b>Produzierende Zellen</b>	Mehrere unterschiedliche Zelltypen	Ein spezieller Zelltyp
<b>Wirkspektrum</b>	Mehrere verschiedene Wirkungen (Ambiguität)	Einzigartige, charakteristische Wirkung
<b>Zielzellen</b>	Verschiedene Zelltypen	Ein spezifischer Zelltyp
<b>Reichweite</b>	Lokal, autokrin, parakrin, z.T. systemisch, endokrin	Systemisch, endokrin

Desweiteren verfügen Zytokine über einige Besonderheiten (Tabelle 2). Ihre Effekte überlappen sich teilweise (Redundanz), TNF und IL-1 $\beta$  sind beispielsweise zusammen in hohen Konzentrationen verantwortlich für einen septischen Schock. Zytokine besitzen mehrere Zielzellen (Pleiotropie) und sie haben, je nachdem auf welchen Zelltyp sie wirken, verschiedene Effekte (Ambiguität), so stimuliert IL-6 z.B. Leberzellen zur Produktion von Akut-Phase Proteinen und B-Zellen zur Proliferation. Zytokine agieren in einem so genannten Zytokin-Milieu, d.h. *in vivo* rufen immer eine ganze Reihe von Zytokinen einheitliche Resultate hervor. Der endgültige Effekt wird von der Konzentration, dem Ort der Wirkung und der Wirkdauer beeinflusst. Sie sind auch in der Lage, sich gegenseitig zu induzieren, so induziert beispielsweise TNF die Produktion von IL-1 $\beta$  (Dinarello et al. 1986), und IL-1  $\beta$

und TNF zusammen die Produktion von IL-6 (Zhang et al. 1990). Der Zeitraum, innerhalb dessen nach Pyrogenstimulation proinflammatorische Zytokine im Blut erscheinen, wird „Zytokin-Kaskade“ genannt. Es kommt zu quantitativ unterschiedlicher Produktion aufgrund von Synergismus bzw. Antagonismus und Rezeptormodulation der Zytokine untereinander. Das Netzwerk der Zytokine ist in die Regulierung einer Vielzahl von biologischen Effekten involviert, sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen.

**Tabelle 2: Die Eigenschaften von Zytokinen im Überblick**

<b>Ambiguität</b>	<b>Ein Zytokin kann verschiedene Zelltypen aktivieren und sie zu unterschiedlichen Wirkungen anregen</b>
<b>Redundanz</b>	<b>Strukturell verschiedene Zytokine können gleiche, überlappende Wirkungen erzielen</b>
<b>Synergismus/Antagonismus</b>	<b>Die Exposition von Zellen gegenüber zwei oder mehreren Zytokinen gleichzeitig kann zu qualitativ unterschiedlichen Wirkungen führen</b>
<b>Zytokinkaskade</b>	<b>Zytokine können die Bildung anderer Zytokine steigern oder vermindern</b>
<b>Rezeptormodulation</b>	<b>Zytokine können die Expression ihres Rezeptors oder den eines anderen Zytokins steigern oder vermindern</b>

Zytokine sind die wichtigsten Mediatoren der Immunantwort. Sie wirken als endogene Pyrogene, d.h. sie sind in der Lage, als humorale Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Fieberentstehung zu nehmen (Dinarello 1999, Conti et al. 2004). Dass Fieber nicht durch exogene Pyrogene, sondern vielmehr durch die Aktivierung endogener Pyrogene hervorgerufen wird, wurde erstmals von Beeson 1948 beschrieben. Er isolierte eine Substanz (IL-1 $\beta$ ) aus Peritonealmakrophagen, die in der Lage war, bei Kaninchen Fieber zu erzeugen. Damit legte er den Grundstein für die Zytokinforschung.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF sind in die Regulation der Immunantwort, der Hämatopoese und Entzündungsreaktionen bzw. dem daraus resultierenden Fieber involviert. Nach Stimulation mit LPS werden die höchsten TNF-Werte in der Anfangsphase des Fiebers gemessen, während die IL-6 Aktivität im Plasma mit der Fieberantwort korreliert (Roth et al. 1993). Das durch die Zytokine ausgelöste Fieber ist kein unkontrolliertes Geschehen, sondern es wird über verschiedenste sehr komplexe Mechanismen gesteuert, die im Folgenden noch näher betrachtet werden.

### 1.5.1.1 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ )

William B. Coley (1862-1936) zeigte erstmals, dass eine Mixtur aus abgetöteten Bakterien (*Serratia marcescens* und *Streptococci*) nicht nur Fieber verursachte, sondern auch zu einer Remission verschiedener maligner Tumoren führte (Nauts et al. 1953). Dies legte den Grundstein für die Entdeckung des Tumor Nekrose Faktors, die jedoch erst viele Jahre später stattfand. 1975 konnten Carswell et al. zeigen, dass ein durch Bakterien induzierter Faktor einen starken antitumorösen Effekt auf Hauttumoren bei Mäusen ausübte. Die molekularbiologische Struktur dieses Faktors, den man dann Tumor Nekrose Faktor nannte, wurde später isoliert und kloniert (Pennica et al. 1984). Beutler & Cerami beschrieben 1986 die Bedeutung des TNF für Entzündungsreaktionen.

Aufgrund seiner Eigenschaften wird TNF als endogenes Pyrogen angesehen (Dinarello et al. 1986), der eine entscheidende Rolle in der durch Endotoxin induzierten Fieberreaktion, Hypothermie und Anorexie spielt (Kawasaki et al. 1989, Töllner et al. 2000). Er ist einer der wichtigsten Mediatoren akuter Infektionen und in hohen Mengen die Hauptursache für den septischen bzw. Endotoxin- Schock (Rothstein & Schreiber 1988, Fiedler et al. 1992). Seine Funktionen sind sehr vielfältig. TNF stimuliert beispielsweise Endothelzellen zur Produktion von Chemokinen, Selektinen und Integrinen, die eine wichtige Rolle in der Leukodiapedese spielen; des weiteren stimuliert er Hepatozyten zur Produktion von Akut-Phase Proteinen und Makrophagen zur Ausschüttung von IL-1 (Dinarello et al. 1986). Wie sein Name besagt, wirkt er auf verschiedene Tumorzellen zytotoxisch.

TNF gehört in die Gruppe der ständig wachsenden so genannten TNF-Superfamilie, in die noch eine Reihe weiterer Liganden wie LT $\alpha$  (Lymphotoxin  $\alpha$ ), LT $\beta$ , FasL, CD40L, CD27L, CD30L, TRAIL, TWEAK u.a., gehören (Baker and Reddy 1998). Abgesehen von TNF- $\beta$  sind alle Mitglieder dieser Familie Typ II membrangebundene Glycoproteine, d.h. sie besitzen einen intrazellulären N-Terminus (Gruss & Dower 1995). Die Mitglieder dieser Familie vermitteln die Interaktion zwischen Zellen des Immunsystems wie T- und B-Zellen oder Monozyten. Ihnen ist die Beteiligung an der Immunantwort durch Stimulation der Zytokinproduktion, Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und Aktivierung von kostimulatorischen Proteinen gemeinsam (Gruss & Dower 1995).

TNF- $\alpha$  ist ein entscheidender Faktor bei der Regulierung des Immunsystems und bei Entzündungen. Daher wurden auch viele therapeutische Hoffnungen auf die Blockade von TNF- $\alpha$  gesetzt, die auch teilweise zu Erfolgen, z.B. in der Therapie der rheumatoiden

Arthritis, führten. Trotzdem bleiben die Langzeit-Effekte dieser Therapien noch unsicher und das Restrisiko unerwarteter Reaktionen der Patienten besteht weiterhin.

Bei membrangebundenem TNF handelt es sich um ein 17 kDa schweres Protein mit einem relativ kurzen zytoplasmatischen Segment und einer relativ langen extrazellulären Region, die einen C-Terminus besitzt (Gruss and Dower 1995).

TNF existiert entweder in gebundener oder löslicher Form. Beide Formen sind biologisch aktiv, allerdings scheint der lösliche TNF potenter zu sein (Decoster et al. 1995) Die lösliche Form entsteht durch proteolytische Spaltung eines 26 kDa schweren membrangebundenen Vorläufermoleküls (pro-TNF) mit Hilfe eines TNF- $\alpha$  Converting Enzymes (TACE), einem Mitglied der Familie der Zink-Metalloproteasen (Moss et al 1997, Rosendahl et al. 1997). Der lösliche TNF zirkuliert in der Regel als Homotrimer (Smith & Baglioni 1987). In zahlreichen Studien wurde belegt, dass die Zahl der Zelltypen, die TNF bilden können, enorm groß ist. Hierzu zählen auszugsweise Makrophagen, T-Zellen, Osteoblasten, Dendritische Zellen, Astrozyten, Neurone und Monozyten.

#### **1.5.1.1.1 Die TNF-Rezeptoren**

Die Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie (TNFR I, TNFR II, LTbR, Fas, NGFR u.a.) sind im Gegensatz zu ihren Liganden Typ I transmembranäre Glycoproteine und zeichnen sich durch die strukturelle Gemeinsamkeit einer Cystein-reichen extrazellulären N-terminalen Region aus, welche für die Ligandenbindung wichtig ist (Gruss and Dower 1995). Sie existieren, wie die Liganden, ebenfalls in einer membrangebundenen und einer löslichen Form, wobei die lösliche Form in der Regel durch eine proteolytische Spaltung entsteht.

Es gibt zwei verschiedene TNF Rezeptoren (Tartaglia & Goeddel 1992, Goeddel 1999), TNFR I (p55/CD120a) und TNFR II (p75/CD120b). Löslicher TNF kann an beide Rezeptoren binden, aber nur der TNFR I wird aktiviert (Krippner-Heidenreich et al. 2002), während membrangebundener TNF beide Rezeptoren aktivieren kann (Decoster et al. 1995).

Eine Bindung von TNF an einen dieser Rezeptoren führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors (Banner et al. 1993), welche die Signalkaskade in Gang setzt. Die Trimere werden über intracysteine Disulfidbrücken stabilisiert. Eine Autoaggregation in Abwesenheit des Liganden ist ebenfalls möglich, es kommt nach Ligandenbindung dann lediglich zu einer Neuordnung des vorgeformten Rezeptorkomplexes (Chan et al. 2000).



Während der TNFR I konstitutiv auf fast allen kernhaltigen Säugetierzellen exprimiert wird, ist die Expression von TNFR II eher restriktiv und vor allem auf Zellen des Immunsystems, Endothelzellen und neuronale Zellen beschränkt (Krippner-Heidenreich et al. 2002). Alle Liganden und Rezeptoren der TNF Superfamilie werden ausnahmslos auf T-Zellen exprimiert, d.h. eine der Gemeinsamkeiten der Mitglieder dieser Familien ist die Stimulation der T-Zell vermittelten Immunantwort. Die durch Aktivierung der TNFR induzierten Signalkaskaden führen zu drei unterschiedlichen Zielen: der Aktivierung des Nuclear Factor-kappaB (NF-kB), oder der c-Jun-Kinase (JNK), oder aber zu Apoptose.

Der TNFR I (p55/60; CD120a) ist ein 55 kDa schweres, aus 455 Aminosäuren (AS) bestehendes transmembranäres Glycoprotein, das in fast allen Zellen exprimiert wird. Die lösliche Form dieses Rezeptors besitzt eine 50-60fach höhere Affinität für TNF- $\alpha$  als für TNF- $\beta$  (Pennica et al. 1992). Das Molekül besteht aus einer extrazellulären (190 AS), einer transmembranären (25 AS) und einer zytoplasmatischen Region (220 AS). Der extrazelluläre Bereich besitzt vier cysteinreiche Domänen (Naismith et al. 1996), die für die Bindung von TNF- $\alpha$  zuständig sind. Der lösliche TNFR I ist in der Lage, eine Signaltransduktion in der Anwesenheit von TNF zu hemmen oder die TNF-Aktivität zu blockieren (siehe 1.5.1.2) (Naismith et al. 1996).

Der TNFR II (p75/80; CD120b) ist ein 75 kDa schweres, aus 461 AS bestehendes transmembranäres Glycoprotein. Wie der TNFR I besitzt er eine extrazelluläre Domäne (240 AS), ein transmembranäres Segment (27 AS) und eine zytoplasmatische Domäne (173 AS). Die Sequenzanalogie zum TNFR I beträgt für den extrazellulären Anteil 20%, für den zytoplasmatischen nur 5%. Die Funktion des TNFR II ist noch nicht hinreichend geklärt. Es wird vermutet, dass TNF- $\alpha$  an den TNFR II bindet und zum TNFR I transferiert wird, also fungiert TNFR II sozusagen als Lieferant für gebundenen TNF (Tartaglia et al. 1993). Wahrscheinlich bindet eher membrangebundener TNF an den TNFR II, während beide TNF-Formen gleich stark an den TNFR I binden (Krippner-Heidenreich 2002).

Beiden Rezeptoren fehlt eine intrinsische Protein-Kinase Aktivität. Um eine Signaltransduktion in Gang zu setzen, assoziieren sie daher mit verschiedenen Signalproteinen: einmal den „TNF receptor associated factors“ (TRAFs) und zum anderen den so genannten „death domains“ (Todesdomänen, DD) (Darnay & Aggarwal 1999), und den c-IAPs (cellular inhibitor of apoptosis protein) (Goeddel 1999). Die Mitglieder der TNFR Familie wurden in zwei Gruppen eingeteilt: in Rezeptoren mit und ohne DD (Locksley et al. 2001). Der TNFR I besitzt eine Todesdomäne, der TNFR II hingegen nicht.

### 1.5.1.1.2 Signaltransduktion am TNFR I

Bevor TNF an den TNFR I bindet, ist der Rezeptor mit einer SODD (Silencer of Death Domain) assoziiert, der eine Autoaggregation verhindert. Nach Ligandenbindung trimerisiert der Rezeptor und die SODD wird abgespalten (Goeddel 1999). Die Death domain des TNFR I wird somit frei, um mit Adapterproteinen zu interagieren.

Die „TNF-Receptor associated death domain“ (TRADD) interagiert nach Ligandenbindung über ihre C-terminale DD mit derjenigen des TNFR I und über ihr N-terminales Ende mit der TRAF-C Subdomäne von TRAF2, und fungiert als eine Art Adapter Protein, das noch weitere Signalproteine rekrutieren kann (Hsu et al. 1996). Dazu gehören das “Receptor interacting Protein” (RIP) (Kelliher et al. 1998), die “Fas associated Death Domain” (FADD) und TRAF. Die TRAF Familie besteht aus sechs verschiedenen Proteinen, die alle über ein Ringfinger und ein Zinkfinger Motiv in ihren N- und C-terminalen Domänen verfügen, welche für die Interaktion untereinander oder mit anderen Proteinen von Nöten sind (Darnay & Aggarwal 1999). Neben TRAF2 gibt es noch TRAF1, das aber nur in bestimmten Geweben ausgebildet wird und am TNFR I offensichtlich keine Rolle spielt. Das C-terminale Ende der TRAF1 und TRAF2 (230AS) besteht aus zwei Subdomänen: TRAF-N und TRAF-C. Durch diese Subdomänen können TRAF1 und 2 je nach Zelltyp entweder Homo- oder Heterodimere bilden. Studien an TRAF2 knock out Mäusen konnten zeigen, dass TNF zwar noch NF- $\kappa$ B aktivieren konnte, nicht aber die JNK (Lee et al. 1997). Studien an RIP knock out Mäusen zeigten, daß TNF RIP benötigt, um NF- $\kappa$ B zu aktivieren (Kelliher et al. 1998). FADD (Mort1) hingegen wird benötigt, um die Apoptose einzuleiten.

Micheau & Tschopp (2003) beschreiben die Signalkaskade (Abbildung 2) am TNFR I wie folgt: Bindet TNF an den TNFR I entsteht ein initialer Komplex aus TNFR I, TRADD, TRAF2 und RIP (Komplex I) und führt über noch unbekannte Zwischenschritte zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Der Komplex ist transient und TRADD, TRAF2 und RIP dissoziieren innerhalb einer Stunde wieder vom Rezeptor. Die DD von TRADD wird dann verfügbar für eine Interaktion mit FADD, und es kommt durch Oligomerisation zu einer Aktivierung der Caspase-8 (Komplex II), welche dann weitere Caspasen 3 und -7 aktiviert, die die Apoptose einleiten. Komplex II führt also zum Zelltod. Es ist noch nicht klar, welcher Mechanismus dafür zuständig ist, einen der beiden Komplexe zu bilden.

Die TRAF-N Subdomäne rekrutiert zwei weitere Proteine, das c-IAP1, welches in allen Zellen exprimiert wird, und c-IAP2, welches nur in Zellen des Immunsystems exprimiert wird

(Rothe et al. 1995). Sie können die durch TRAF2 und TRAF1 vermittelte Aktivierung der Caspase-8 inhibieren.

Die Aktivierung von RIP, einer zytoplasmatischen Serin/Treonin Proteinkinase mit einer C-terminalen DD, aktiviert außer NFκB (Kelliher et al. 1998) auch die zu den MAPK zählende JNK (Liu et al. 1996) mit nachfolgender AP-1 Aktivierung. Es wird vermutet, dass die Aktivierung dieses Weges ebenfalls Apoptose einleiten kann (Baker & Reddy 1998).

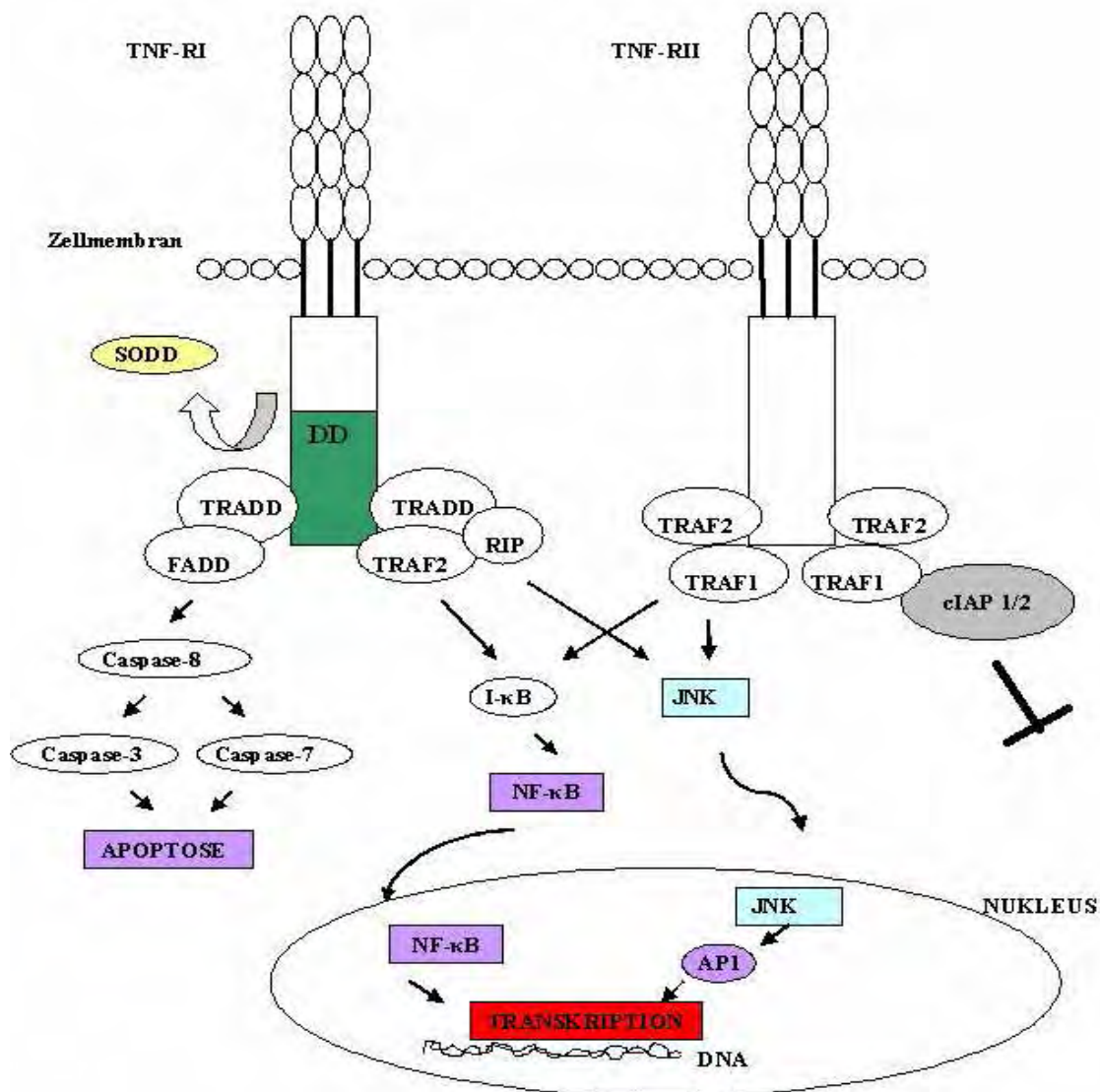


Abbildung 2: Die Signaltransduktion an den TNFRs. Bindet TNF an TNFR I, kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors, SODD wird abgespalten und entweder über TRADD, FADD und die Caspasen eine Apoptose eingeleitet, oder über TRADD, TRAF2 und RIP der NF-κB aktiviert. Als dritte Möglichkeit kann über RIP auch noch eine JNK aktiviert werden, die dann den Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert. Die Transkriptionsfaktoren bewirken dann eine

**Transkription der Zielgene. Bindet TNF an TNFR II trimerisiert der Rezeptor ebenfalls und es werden auch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B aktiviert. Koppelt eine cIAP an einen der Rezeptoren, wird der Signalweg blockiert.**

Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der Signalkaskade, die durch TNF ausgelöst wird, ist NF- $\kappa$ B. Dieser Transkriptionsfaktor spielt auch im Hinblick auf die Signalkaskaden der Toll-like Rezeptoren (1.6.6) eine zentrale Rolle, aber auch am TNF und IL-1 Rezeptor. NF- $\kappa$ B Dimere bestehen aus fünf verschiedenen Genprodukten: p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2) c-Rel, p65 (RelA) und RelB (Hoffmann et al. 2002), von denen alle eine so genannte Rel Homologie Domäne aus etwa 300 Aminosäuren besitzen. Das C-terminale Ende dieser Region ist zuständig für die Dimerisation und die Bindung von I- $\kappa$ B, während die N-terminale Region in erster Linie für die DNA Bindung zuständig ist (Jacobs & Harrison 1998). Die Untereinheiten p50 und p52 werden aus viel längeren Vorstufen (p105 und p100) gebildet. Die Rel-Proteine (c-Rel, RelA und RelB) besitzen zudem eine so genannte Transaktivierungsdomäne, die für die transkriptionelle Aktivierung der DNA zuständig ist. Die Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie können untereinander Homo- oder Heterodimere bilden. NF- $\kappa$ B Dimere befinden sich durch die Bindung an einen I- $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplex in einem inaktiven Zustand. Die Rekrutierung des IKK am TNFR I wird durch TRAF2 bewirkt (Devin et al. 2001), er phosphoryliert und wird über eine Ubiquitinylierung abgebaut, so dass das NF- $\kappa$ B Dimer frei werden kann, in den Kern transloziert, dort an die DNA bindet und eine Transkription bestimmter Gene veranlasst (Ghosh & Karin 2002).

Wenn die inflammatorischen Signale nachlassen, muß auch NF- $\kappa$ B wieder „abgeschaltet“ werden. Da I- $\kappa$ B abgebaut wird, muss es also neu synthetisiert werden (Hoffmann et al. 2002). Zwei Mitglieder dieser Familie, I $\kappa$ B $\beta$  und I- $\kappa$ B $\epsilon$ , werden konstitutiv gebildet und spielen eine Rolle bei länger andauernden Stimulationen. Die Synthese eines dritten, I- $\kappa$ B $\alpha$ , geschieht unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B selbst: es gelangt in den Zellkern, bindet an NF- $\kappa$ B und befördert es durch ein nukleares Export-Signal zurück ins Zytoplasma. Diese Inaktivierung erfolgt sehr schnell (Hoffmann et al. 2002). NF- $\kappa$ B ist also in der Lage sich selbst zu limitieren.

Neben diesem „normalen“ Signalweg gibt es noch einen alternativen. Hierbei wird NF- $\kappa$ B durch die C-terminale Sequenz einer der beiden Vorstufen p105 oder p100 im inaktiven Zustand gehalten. Diese sind in ihrer Struktur mit I- $\kappa$ B identisch. Während p105 konstitutiv gebildet wird, dient p100 als eine Art regulatorischer Partner im NF- $\kappa$ B Heterodimer. Durch

die Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer proteolytischen Spaltung und dem Abbau des inhibitorischen C-Terminus von p100 und damit wird der entstehende p52 Komplex freigesetzt und aktiv (Coope et al. 2002). Dieser alternative Signalweg wird vor allem von den Mitgliedern der TNFR Familie eingeleitet, die keine DD besitzen.

#### **1.5.1.1.3 Signaltransduktion am TNFR II**

Die Vorgänge am TNFR II sind weit weniger gut erforscht als diejenigen am TNFR I. Eine Trimerisierung erfolgt ebenfalls nach Ligandenbindung. TNFR II besitzt keine DD, rekrutiert aber die Adapterproteine inklusive TRAF2. Die intrazelluläre Domäne des TNFR II bindet an die TRAF-C Subdomäne des TRAF2 Proteins (Takeuchi et al. 1996). Die Signalkaskade am TNFR II führt zu einer Aktivierung der JNK und dem NF- $\kappa$ B (Liu et al. 1996). TNFR II, TRAF1, TRAF2 und die c-IAPs formen, wenn sie überexprimiert werden, einen Komplex, der unabhängig von der Anwesenheit von TNF ist. Obwohl der TNFR II keine DD besitzt, ist er in der Lage Apoptose zu induzieren (Grell et al. 1999). Daher wird folgende Möglichkeit vermutet: wird TNFR II aktiviert, kommt es über den NF- $\kappa$ B Signalweg u.a. zur Expression des TNF Proteins selbst. Dieses aktiviert dann als membranständiger TNF nun auch den TNFR I und leitet quasi stellvertretend für TNFR II den Zelltod ein (Grell et al. 1999).

#### **1.5.1.2 Möglichkeiten zur Blockade von TNF**

Da TNF bei inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, wird intensiv daran geforscht, dieses Zytokin zu unterdrücken. Dazu gibt es verschiedene mehr oder weniger erfolgreiche Möglichkeiten, wie beispielsweise monoklonale Antikörper (Kawasaki et al. 1989), TNFR Immunoadhäsine (Espat et al. 1995) oder auch lösliche TNF Rezeptoren (Van Zee et al. 1992, Roth et al. 1998, Solorzano et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Kaninchen mit einem TNF-Antiserum in bestimmten Grenzen, also dosis-abhängig, vor dem letalen Effekt von LPS schützen kann, obwohl es das entstehende Fieber nicht abschwächen konnte. Die Gabe eines Antikörpers konnte allerdings die Fieberreaktion bei Kaninchen abschwächen (Kawasaki et al. 1989) und einen letalen Endotoxinschock bei Rhesusaffen verhindern (Fiedler et al. 1992). Dies bestätigt die Annahme, dass TNF einer der wichtigsten Faktoren im Bezug auf Sepsis und Letalität von

LPS darstellt. Allerdings führten verschiedene Versuche bei Ratten und Mäusen, den TNF zu neutralisieren auch zu gegenteiligen Effekten, sprich einer Erhöhung des Fiebers (Kozak et al. 1995). Dies liegt u.a. daran, dass Zytokine und somit auch ihre Antikörper speziesspezifisch sind.

Humanes TNFbp hingegen ist in der Lage, sowohl TNF von Menschen, Pavianen (Solorzano et al. 1998), Ratten (Töllner et al. 2000) und Meerschweinchen (Roth et al. 1998) zu neutralisieren und wirkt somit zumindest teilweise speziessübergreifend. Die Gabe von TNFbp und LPS konnte beim Meerschweinchen deutlich die zweite Fieberphase abschwächen und den Plasmaspiegel an IL-6 absenken (Roth et al. 1998). Die durch LPS hervorgerufene verminderte Futter- und Wasseraufnahme konnte durch Neutralisation des TNFs bei Ratten deutlich abgeschwächt werden, und zudem konnten die Tiere eine Hypothermie schneller überwinden (Töllner et al. 2000), obwohl das entstehende Fieber höher ausfiel. Über pro- und anti-pyretische Eigenschaften von TNF wird daher kontrovers diskutiert.

Die Gabe von TNFbp bei Pavianen mit einer E.coli Septikämie führte zu einer abgeschwächten Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6, nicht aber IL-8 (Solorzano et al. 1998).

Bei dem in den Versuchen eingesetzten TNFbp handelt es sich um die lösliche Form des humanen TNFR I (p55) (1.5.1.1.1), der in der dimeren Form vorliegt und an ein Polyethylenglycol-Molekül gebunden ist (PEG(rsTNF-RI)<sub>2</sub>). Obwohl auch die lösliche Form des TNFR II (p75) existiert, wirkt nur der lösliche p55 protektiv, da der p75 den gebundenen TNF scheinbar wieder abgibt. Die Injektion von TNFbp führt zu einer Bildung von IgG Antikörpern, es wird also bei wiederholter Applikation teilweise gebunden, dadurch vermindert sich die biologische Halbwertszeit. Die Bindung an PEG erhöht die Fähigkeit, TNF- $\alpha$  zu binden und verlängert wiederum die Plasmahalbwertszeit. Die dimere Form dieses Rezeptors ist etwa 20fach effektiver als die monomere Form (Solorzano et al. 1998). Hergestellt wird das TNFbp auf gentechnischen Weg über eine E.Coli FM 15 Zelllinie und wird nach Aufreinigung kovalent an PEG gebunden.

Obwohl die Unterdrückung von Bakteriämie und endotoxischem Schock im Versuchstiermodell, unter anderem auch im Primaten, sehr vielversprechend sind, bleiben die Ergebnisse eines therapeutischen Einsatzes von TNF-Inhibitoren bisher aufgrund unkalkulierbarer Nebenwirkungen leider fragwürdig.

### 1.5.1.3 Interleukin-6 (IL-6) und sein Rezeptor

IL-6 wurde ursprünglich als ein so genannter „B-Zell-stimulierender-Faktor-2“ (BSF-2) bezeichnet, der aus Blutmonozyten isoliert wurde (Hirano et al. 1985). Weitere Studien zeigten allerdings, dass IL-6 nicht nur B-Zellen beeinflusst, sondern auch T-Zellen, Keratinozyten, Osteoklasten, Hepatozyten, Zellen des hämatopoetischen Systems, Endothelzellen und sogar neuronale Zellen. Seine physiologischen Funktionen betreffen in erster Linie die Differenzierung und Proliferation von Zellen.

IL-6 ist einer der wichtigsten Mediatoren in der Entstehung von Fieber und der Akut Phase Reaktion (Blatteis et al. 1990) und hat großen Anteil am „sickness behavior“ (Bluthé et al. 2000). IL-6 defiziente Mäuse entwickeln auf die Injektion von TNF- $\alpha$  kein Fieber, d.h. die Entwicklung eines TNF-induzierten Fiebers ist von IL-6 abhängig, und zwar anscheinend in erster Linie von zentralem IL-6 (Sundgren-Andersson et al. 1998).

Erfolgt eine Applikation von IL-6 intracerebroventriculär (LeMay et al. 1990) oder systemisch (Blatteis et al. 1990), kommt es zu Fieber und der Produktion von APP (Mackiewicz et al. 1992). IL-6 wird aufgrund dieser Eigenschaften als endogenes Pyrogen angesehen (LeMay et al. 1990, Kluger et al. 1991). IL-6 defiziente Mäuse entwickeln auf die Injektion mit IL-1 $\beta$  oder LPS kein Fieber (Chai et al. 1996). Die Injektion von IL-6 selbst führt allerdings nur zu einem moderaten Fieber (Blatteis et al. 1990, Harré et al. 2002, Rummel et al. 2006). Lokal (s.c.) injiziert verursacht es sogar keine Fieberreaktion, sondern nur zusammen mit IL-1 $\beta$  (Cartmell et al. 2000). Von der Zirkulation kann es über mehrere Mechanismen (1.8.3) die Blut-Hirn-Schranke überwinden und bewirkt durch die Stimulation thermosensitiver Neurone im vorderen Hypothalamus eine Fieberentstehung, und zwar über einen Prostaglandin-abhängigen Weg (Xin & Blatteis 1992). IL-6 wird im ZNS selbst vor allen Dingen von Astrozyten, Mikroglia-Zellen und Endothelzellen gebildet. Der gemessene Plasmaspiegel an IL-6 korreliert am besten mit der Fieberantwort auf LPS (Roth et al. 1993, 1994), was es ebenfalls als endogenes Pyrogen auszeichnet.

Molekularbiologisch handelt es sich bei IL-6 um ein lösliches Glycoprotein, das aus 184 AS besteht und in seiner nicht-glycolisierten Form ein Molekulargewicht von 23 kDa, in der glycolisierten von 26 kDa besitzt und aus einer 212 kDa schweren Vorstufe hergestellt wird (Hirano et al. 1985). Es besteht strukturell aus vier antiparallelen  $\alpha$ -Helices mit einer kurzen und zwei langen „loops“ (Schleifen) (Bazan 1990).

Interleukin 6 gehört in die gp130 (Glycoprotein 130/CD130) Rezeptor Familie, d.h. alle Mitglieder dieser Familie binden an Rezeptoren mit dieser Rezeptoruntereinheit (Kishimoto et al. 1995, Taga & Kishimoto 1997). In diese Familie gehören noch verschiedene andere Zytokine wie z.B. IL-11, IL-27, Kardiotrophin-I, Neuropoetin, Leukemia inhibitory factor (LIF), Oncostatin M u.a.

Der IL-6R besteht aus zwei Polypeptidketten, wovon eine 80 kDa schwere Kette (IL-6R $\alpha$ ) für die Bindung des Liganden, also IL-6, zuständig ist und eine so genannte Signal-Transduktionskette, die gp130 Einheit (IL-6R $\beta$ ) (Kishimoto et al 1995). Letztere kann den Liganden alleine nicht binden, sie ist aber für die folgende Signaltransduktion unentbehrlich. Die extrazellulären Domänen des IL-6R und des gp130 besitzen so genannte Fibronectin Typ III (FNIII) und Ig (Immunglobulin)- ähnliche Regionen, und außerdem mindestens ein CBM (Cytokine-binding module), das je zwei FNIII besitzt (Heinrich et al. 2003). Diese CBM hat eine festgelegte Struktur, sie besitzt am N-terminalen Ende eine definierte Anzahl an Cysteinen und am C-terminalen Ende ein WSXWS Motiv (W steht für Tryptophan, S für Serin und X für eine nicht konservierte Aminosäure) (Bazan 1990). Die gemeinsame Nutzung des gp130 erklärt die Redundanz vieler Zytokine, die in die IL-6 Zytokin-Familie gehören. IL-6 bindet an den membrangebundenen Rezeptor IL-6R (CD126) und es kommt relativ schnell zu einer Internalisierung des Liganden. Die Bindung von IL-6 an den Rezeptor führt zu einer Zusammenlagerung mit gp130, welches homodimerisiert (Kishimoto et al. 1995) und letztlich die Signaltransduktion induziert. Die gp 130-Einheit wird in den Zellen fast aller Organe exprimiert (Saito et la. 1992), der IL-6R allerdings ist nur auf bestimmten Zellen, überwiegend auf Hepatozyten und verschiedenen Leukozytenarten ausgebildet, und auf verschiedenen Zelltypen des ZNS wie Astrozyten und Mikroglia (Schöbitz et al. 1993). Interessanterweise kann LPS sowohl die Expression von IL-6, IL-6R und dem gp130 in den CVOs (Zirkumventrikuläre Organe) (1.8.2) induzieren, und IL-6 kann die Synthese seines Rezeptors innerhalb zentraler Blutgefäße selbst induzieren (Vallières & Rivest 1997).

IL-6R existiert auch in einer löslichen Form (sIL-6R); er wird entweder durch Proteolyse der membrangebundenen Form mittels einer Metalloprotease gebildet (Müllberg et al 1993, Rose-John & Heinrich 1994) oder durch Translation einer alternativ gesplizeten mRNA (Lust et al. 1992). Obwohl lösliche Rezeptoren in der Regel die Aktivität ihrer membrangebundenen Analoga hemmen, wirkt der lösliche IL-6R synergistisch zu seiner membrangebundenen Form.



Nach der Bindung von IL-6 an diesen löslichen Rezeptor, dessen Affinität genauso hoch ist wie die des mIL-6R, kann der Komplex an eine gp 130 Einheit einer Zelle binden, obwohl diese den mIL-6R nicht besitzt und dort trotzdem eine Signalkaskade auslösen (Mackiewicz et al. 1992). Vor allen Dingen Neurone (März et al. 1999), Astrozyten (Van Wagoner et al. 1999) und hämatopoetische Stammzellen (Rose-John & Heinrich 1994) sind auf die Anwesenheit des sIL-6R für ihre Proliferation, Differenzierung oder Aktivierung in inflammatorischen Prozessen angewiesen. Diese alternative Aktivierung des Signalweges wird auch als „trans-signaling“ bezeichnet (Rose-John & Heinrich 1994, Scheller & Rose-John 2006).

Neben der löslichen Form des IL-6R gibt es auch eine löslichen Form der gp130-(sgp130) Untereinheit. Dieses vermag das „trans-signaling“ selektiv zu hemmen, ohne den klassischen Signalweg zu beeinflussen. Die sgp130 dient also als ein natürlicher Inhibitor der Interaktion zwischen IL-6 und dem sIL-6R und kann somit überschüssende Reaktionen durch zirkulierendes IL-6 verhindern (Scheller & Rose-John 2006).

#### **1.5.1.4 Signaltransduktion am IL-6R**

Da verschiedene Zytokine an einem einzigen Zelltyp die Transkription unterschiedlichster Gene verursachen, muss es für jeden Zytokin-Rezeptor einen spezifischen Signalweg geben, der zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Teil dieser Reaktion sind die so genannten STAT (Signal Transducer and Activator of Transkription)-Proteine. Es handelt sich um zytoplasmatische Proteine, die durch eine Phosphorylierung aktiviert werden, daraufhin dimerisieren und in den Zellkern translozieren, wo sie dann durch Bindung an bestimmte DNA-Abschnitte die Transkription einleiten (Ihle 1996). Bis heute wurden 7 Mitglieder der STAT Familie charakterisiert (STAT1-4, STAT5a und 5b, und STAT6). Strukturell besitzen sie alle eine Src Homologie 2 (SH2) Domäne und am Carboxyende eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle. Der Aminosäureanteil ist entscheidend für ihre Bindung an die DNA (Ihle 1996). Die verschiedenen STAT-Proteine werden von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert (Takeda & Akira 2000). Dabei bilden STAT1 und STAT3 Homodimere, oder STAT1:STAT3 Heterodimere.

Der von IL-6 aktivierte Transkriptionsfaktor STAT3 wird von einer JAK (Janus-Kinase) aktiviert, daher wird der durch IL-6 aktivierte Signalweg auch JAK-STAT Signalweg

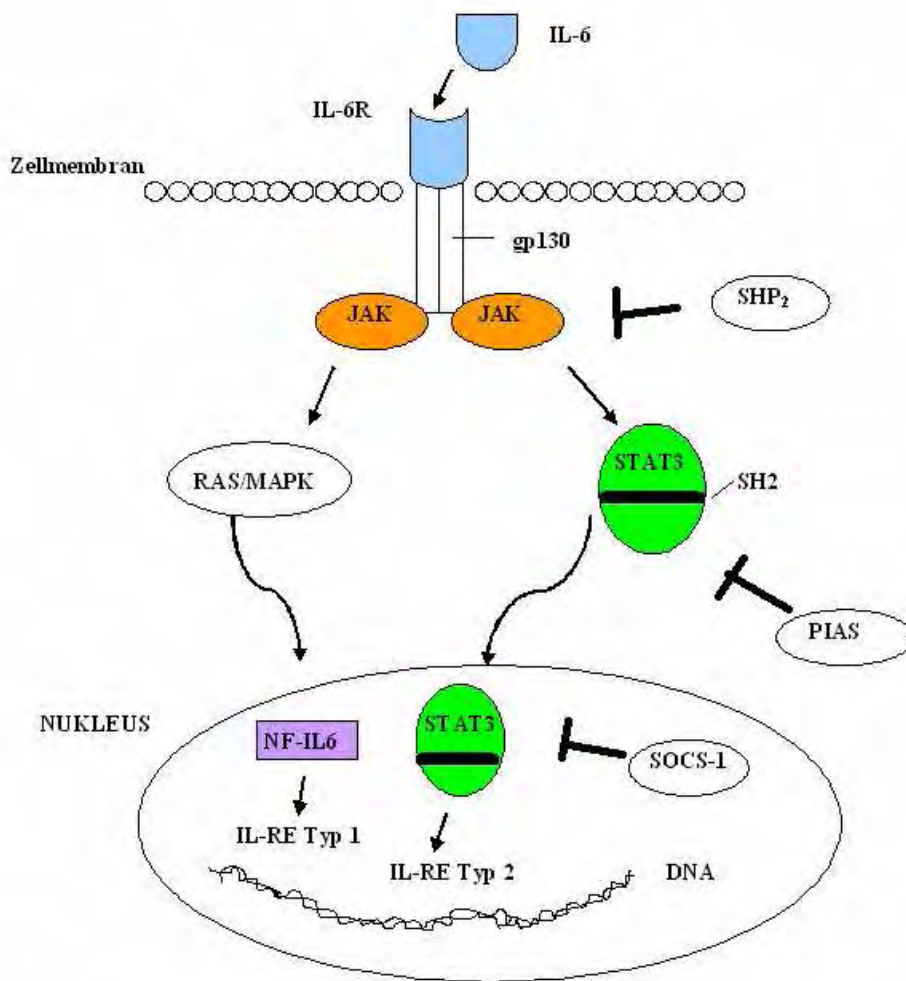
genannt, er wird allerdings auch von zahlreichen anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren benutzt (Darnell Jr. et al. 1994). STAT3 wurde ursprünglich in einer Studie einer durch Interferon induzierten intrazellulären Signaltransduktion entdeckt (Darnell Jr. et al. 1994). Der Transkriptionsfaktor wurde zunächst APRF (Akut-Phase response factor) benannt, da Leberzellen durch Stimulation mit IL-6 zur Akut-Phase Reaktion angeregt werden konnten (Wegenka et al. 1993). STAT3 wird zudem von den anderen Mitgliedern der gp130 Rezeptorfamilie und von verschiedenen Wachstumsfaktoren phosphoryliert. Da STAT3 gut mittels Immunhistochemie nachweisbar ist, wird er als Indikator der IL-6 vermittelten Aktivierung genutzt. Die intraperitoneale Injektion von IL-6 oder LPS, oder die intrazerebrovenikuläre Injektion von IL-6 führt bei Ratten zu einer nukleären STAT3 Translokation in den verschiedenen Hirnarealen, vor allem den sensorischen CVOs (sCVOs) (1.8.2.1) (Hübschle et al 2001, Harré et al. 2002).

Bei den Mitgliedern der Familie der JAK (JAK1-3, TYK2), von denen alle außer JAK3 in die Signalkaskade am IL-6R involviert sind, handelt es sich um 120-140 kDa große intrazelluläre Tyrosin Kinasen. JAK stand ursprünglich für „just another kinase“, wurde dann aber nach Janus, dem thessalonischen Himmelstorwächter benannt, der laut römischer Mythologie zwei Gesichter besaß. Die JAKs sind nach ihm benannt, da sie zwei Phosphat-transferierende Domänen besitzen. In ruhenden Zellen sind die JAKs katalytisch inaktiv. Während JAK1 und JAK2 in fast allen Geweben exprimiert werden, finden sich JAK3 und TYK2 nur in hämatopoetischen Zellen und einigen Tumorzellen. Die Janus Kinasen besitzen eine strukturelle Gemeinsamkeit, nämlich so genannte JH (Janus Homologie) Segmente (JH1-JH7), die Bedeutung für die Enzymaktivität oder Interaktion mit Zytokinrezeptoren haben. Aktiviert werden die JAKs durch die Homodimerisierung der gp130-Untereinheit. Die JAK assoziiert mit einer distalen Region der zytoplasmatischen Domäne von gp130, die box1/box2 genannt wird (Heinrich et al. 2003). Bindet das entsprechende Zytokin an den Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung, die die JAKs so nahe zueinander bringt, dass sie sich gegenseitig oder auto-phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes am Rezeptor wird eine Bindungsstelle für Proteine geschaffen, die eine Phosphotyrosin bindende SH2 Domäne besitzen. Dabei handelt es sich um STAT, der daraufhin zum Rezeptor rekrutiert wird. Die JAKs phosphorylieren dann einen Tyrosinrest (Tyr<sup>705</sup>) am STAT-Protein, welches sich mit seiner Phosphotyrosin-bindenden SH2 Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosinresten anderer STAT-Moleküle verbinden kann. Zusätzlich zur Phosphorylierung des Tyrosins kommt es auch zu Serin-Phosphorylierungen (Ser<sup>727</sup>) des STAT-Moleküls (Zhang et

al. 1995). Das aktivierte STAT-Monomer dissoziiert vom Rezeptor und homodimerisiert. Das so entstandene Dimer wird nach seiner Aktivierung aktiv über NLS (Nuclear localisation signals) in den Nukleus transportiert, wo es an eine Stelle im Promotor der DNA bindet, die man GAS (gamma activated sites) nennt und letztendlich die Transkription bestimmter Gene aktiviert. Inaktiviert wird STAT3 über nukleäre Phosphatasen und wird dann über NESs (Nuclear export signals) wieder aktiv ins Zytosol zurückbefördert.

Der JAK/STAT Signalweg kann an verschiedenen Stellen blockiert werden bzw. herunterreguliert werden, z.B. um eine überschießende Produktion an weiteren Zytokinen zu verhindern. Dazu gehören z.B. die sogenannten SOCS (Suppressor of cytokine signaling) (Nicholson & Hilton 1998, Alexander et al. 1999). SOCS-1 beispielsweise, das durch die Liganden, also die Zytokine, selbst hochreguliert wird, verhindert die STAT Phosphorylierung indem er an die JAK bindet, oder er konkurriert mit den JAK um die Phosphotyrosinbindungsstellen an den Zytokin-Rezeptoren (Nicholson & Hilton 1998). Die sogenannten PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs) inhibieren vor allem STAT3 selbst über verschiedene Mechanismen im Nukleus (Chung et al. 1997, Rakesh & Agrawal 2005). Eine Protein Tyrosin Phosphatase (SHP<sub>2</sub>) wirkt im Zytoplasma hemmend auf den JAK/STAT Signalweg (Heinrich et al. 2003).

Neben dem Signalweg über STAT3 gibt es alternativ noch die Möglichkeit der Aktivierung des NF-IL6 (Nuclear Factor IL-6) durch IL-6 (Akira 1997). NF-IL6 wird im Ruhezustand der Zelle nicht exprimiert, kann aber durch Stimulation mit LPS, TNF oder IL-6 in Monozyten und Hepatozyten induziert werden (Natsuka et al. 1992). In diesem Fall aktiviert die JAK eine RAS/MAPK, (Mitogen-activated Protein-Kinasen), eine Gruppe von Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen. Der NF-IL6 wird vor allem in Makrophagen exprimiert und spielt nicht nur eine Rolle in der Bildung von IL-6 selbst, sondern auch verschiedener APP und einer Reihe anderer Zytokine wie TNF oder IL-8 (Akira et al. 1997). Der Signalweg ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Die Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B und NF-IL6 befinden sich vor allem in der Promotorregion der Gene, die in die Immunantwort involviert sind (Akira 1997). Diese werden IL-6 responsive Elemente (IL-6RE) genannt, wobei NF-IL6 an das IL-6RE Typ1 (Kishimoto et al. 1995) und STAT3 an Typ 2 bindet (Wegenka et al. 1993).



**Abbildung 3: Die Signaltransduktion am IL-6R.** Bindet IL-6, kommt es zu einer Dimerisierung der gp130 Adapterproteine. Der dadurch in Gang gesetzte JAK/STAT Signalweg führt entweder zur Aktivierung des STAT3, der dann in der Promotorregion der DNA an das IL-RE Typ 2 bindet, oder zur Aktivierung eines NF-IL6 über einen RAS/MAPK-Weg, der dann an das IL-RE Typ 1 bindet. Die Bindung beider Transkriptionsfaktoren verursacht dann die Transkription der Zielgene. Der JAK/STAT Signalweg kann über verschiedene Proteine im Zytosol (SHP<sub>2</sub>, PIAS) oder Nukleus (SOCS-1) gehemmt werden.

Die Gabe eines Antiserums gegen IL-6 nach lokaler Applikation von LPS führte zu einer vollständigen Unterdrückung des Fiebers (Cartmell et al. 2000). Von der Blockade von IL-6 mittels eines IL-6R-Antikörpers, der sowohl den klassischen als auch den „trans-signaling“ Signalweg hemmt, verspricht man sich große therapeutische Fortschritte in der Therapie verschiedener Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (Scheller & Rose-John 2006).

## **1.6 Die Interaktion von PAMPs mit Toll-like Rezeptoren**

### **1.6.1 „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs)**

Pathogene Agentien, also Bakterien, Viren oder Pilze besitzen so genannte „pathogen-associated molecular Patterns“ (PAMPs). Diese PAMPs sind Proteine, Carbohydrate, Nucleinsäuren, Lipide oder auch Kombinationen dieser Stoffe, und sie können sowohl intern als auch extern des betreffenden Pathogens lokalisiert sein.

Die spezifischen Rezeptoren für PAMPs werden Pattern Recognition Receptors (PRRs) genannt (Janeway & Medzhitov 2002). Zu ihnen gehören z.B. die C-Lectin Rezeptor-Familie, der Mannose Rezeptor, die Pentraxin Familie und andere, deren Bedeutung für die Immunantwort nicht klar ist. Eine entscheidende Rolle in der Erkennung von PAMPs und der Beteiligung an der Immunantwort haben dagegen die ebenfalls zu den PRR zählenden, erst vor wenigen Jahren entdeckten Toll-like Rezeptoren (1.6.6) (Medzhitov & Janeway 1997), die als eine der wichtigsten Komponenten des angeborenen Immunsystems angesehen werden (Aderem & Ulevitch 2000).

In den folgenden Kapiteln sollen auf der einen Seite die PAMPs LPS und FSL-1 (bzw. MALP-2), mit denen auch in der vorliegenden Arbeit gearbeitet wurde, und auf der anderen Seite ihre spezifischen PRRs, die TLRs (TLR4 und TLR2/6), näher beleuchtet werden.

### **1.6.2 Ein klassisches PAMP: das Lipopolysaccharid (LPS)**

Als die ersten und somit ältesten Lebewesen der Erde sind Bakterien ein Produkt von Millionen von Jahren an Evolution. Sie haben sich trotz ihrer Einfachheit im Vergleich zu anderen Organismen erstaunlich angepasst und hoch entwickelt. Ihre Überlebensstrategie hat sich kaum verändert, aber bewährt. Die Membran der gramnegativen Bakterien besteht aus einer inneren Membran, einem periplasmatischen Raum, einem Mureingerüst, einer äußeren Membran und einer Kapsel. In der äußeren Membran sind Phospholipide, Phospholipoproteine und die Lipopolysaccharide (LPS) verankert.

LPS ist wohl die mit Abstand am häufigsten eingesetzte und am besten bekannte Substanz zur Studie von experimentell erzeugten Fieber- und Entzündungsmodellen. Alle Säugetiere, aber

auch verschiedene poikilotherme Lebewesen reagieren auf LPS mit Fieber (Kluger 1991). Lipopolysaccharide als Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien sind endogene Toxine. Ihr Molekulargewicht beträgt zwischen 5 und 9000 kDa. Es sind relativ thermostabile Verbindungen aus mehreren Teilbereichen: dem Polysaccharidanteil mit der inneren und äußeren Kernregion und der O-spezifischen Seitenkette, und schließlich dem als Endotoxin wirkenden Lipid A, das die Verankerung mit der äußeren Membran darstellt. Das LPS aus *Escherichia coli* wurde erstmals von Braun 1975 charakterisiert und sequenziert. Synthetisches LPS aus *E. coli* wurde dann erst zehn Jahre später, nämlich 1985 von Kusomoto & Shiba hergestellt (Takada & Kotani 1989). LPS per se ist, solange es in der Membran inkoorporiert ist, nicht toxisch, sondern nur dann, wenn es bei Zellyse oder Vermehrung von der Bakterienwand gelöst wird und das Lipid A frei wird, welches den reaktiven Teil des LPS darstellt (Rietschel et al. 1994). Dabei ist eine definierte Konformation des Lipids A (negative Ladung, hydrophobe Anteile usw.) wichtig für die Toxizität (Miller et al. 2005). Als zwei der wichtigsten durch LPS induzierten Zytokine werden TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  angesehen (Kluger 1991).

Wird ein Organismus mit LPS konfrontiert, kommt es zu einer Reihe von Reaktionen des angeborenen Immunsystems, auf das exogene Pyrogen zu wirken (zur Übersicht: Van Amersfoort et al. 2003). Wird das LPS an eine High-Density-Lipoprotein (HDL) gebunden, kommt es zur Neutralisation. Viel häufiger allerdings ist die Bindung an ein Akut-Phase Protein, dem 58-60,5 kDa schweren, so genannten LPS-Bindungsprotein (LBP) (Tobias et al. 1986). Der entstehende Komplex kann dann in großen Mengen vorliegen und ist etwa 1000fach aktiver als LPS alleine bezüglich der Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Raetz et al. 1991). Dieser Komplex interagiert nun mit einem CD14 Protein (CD=Cluster of differentiation) (Raetz et al. 1991). Bei CD 14 handelt es sich um ein 50-55 kDa schweres membrangebundenes Glycoprotein aus 356 AS. Das Fehlen dieses Rezeptors führte in einer Studie an CD14 defizienten Mäusen zu einer hohen Resistenz gegenüber der Konfrontation mit LPS (Haziot et al. 1996). CD14 wird auf allen myeloiden Zellen, B-Zellen, Hepatozyten, Fibroblasten, und Mikroglia exprimiert. Bei systemischer Injektion von LPS kommt es zu einer Hochregulierung des membrangebundenen CD14 Rezeptors in verschiedenen Zellpopulationen im Gehirn, v.a. im Plexus choroideus und in den CVO's (Lacroix et al. 1998).

Daneben gibt es noch einen löslichen CD14 Rezeptor. So können also auch Zellen, die keinen membrangebundenen CD14 besitzen, wie z.B. Endothel- oder Epithelzellen, durch LPS aktiviert werden (Golenbok et al. 1995).

Da dem CD14 allerdings eine transmembranäre Signaldomäne fehlt, wurde vermutet, dass es einen zusätzlichen Rezeptor für LPS gibt. Hierbei handelt es sich um einen der so genannten Toll-like Rezeptoren (Medzhitov & Janeway 1997, Wright 1999). Aus CD14 und LPS als Liganden eines TLRs entsteht ein membrangebundener Rezeptorkomplex, der eine Signaltransduktions-Einheit besitzt. LPS interagiert vor allem mit dem TLR4, der über das Adaptermolekül MyD88 die gleiche Signalkaskade aktiviert wie IL-1 (Laflamme & Rivest 2001, Laflamme et al. 2003, Rivest 2003). Mäuse mit einer Mutation im TLR4 Gen bzw. TLR4 defiziente Mäuse konnten nicht mehr auf LPS reagieren (Poltorak et al. 1998, Hoshino et al. 1999). Wichtig für die Erkennung des LPS am TLR4 ist die Struktur des Lipids A (Miller et al. 2005). Zwischen der Bindung von LPS und der dadurch induzierten Antwort, wie beispielsweise der Produktion von Zytokinen, liegen etwa 15-30 Minuten, d.h. um den Signalweg in Gang zu setzen kommt es zu „zeitaufwendigen“ Prozessen wie etwa der Internalisierung, Translation und Transkription. Die von LPS in Gang gesetzte Signalkaskade am TLR4 ist sehr komplex und wird in 1.6.6.1 noch einmal näher erläutert.

Die Stimulation eines Organismus mit LPS führt in der Regel zu einem, je nach Dosis mehr oder weniger biphasischen Fieber. Septische Dosen LPS von führen zu einer Hypothermie oder sogar zum Tod (Kluger 1991). Die wiederholte Konfrontation des Organismus mit LPS führt zu einer Toleranzentwicklung (Atkins 1960, Roth & Zeisberger 1995), es handelt sich hierbei um die so genannte „Endotoxintoleranz“. Auf dieses Phänomen soll später noch einmal ausführlich eingegangen werden (1.9.1).

### **1.6.3 Mycoplasmale Lipopeptide: die PAMPs MALP-2 und FSL-1**

#### **1.6.3.1 Mycoplasmen**

Mykoplasmen sind die kleinsten und einfachsten selbst-replizierenden Bakterien. Sie besitzen ein minimales Genom (0.58-2.20 Mb). Ihre Vermehrung beginnt mit der Replikation des Genoms und endet wie bei anderen Prokaryonten mit einer Zweiteilung. Phylogenetisch sind sie mit den gram-negativen Bakterien verwandt. Bis heute sind über 190 Arten bekannt.

Taxonomisch werden sie in die Klasse der Mollicutes (Weichhäuter) zusammengefasst (Razin et al. 1998). Das Fehlen einer Zellwand unterscheidet sie von anderen Bakterien, sie besitzen ausschließlich eine cholesterinhaltige Zytoplasmamembran. Dies macht sie unangreifbar für bestimmte Antibiotika wie  $\beta$ -Lactame, die die Synthese des Mureingerüsts hemmen. Die Membran besteht aus einer Doppellipidschicht und Membranproteinen, die entweder in der Membran integriert sind oder peripher sitzen. Letztere werden als so genannte „LAMPs“ (Lipid-associated membrane proteins) oder „membranäre Lipoproteine“ bezeichnet (You et al. 2006). Des Weiteren sind Mykoplasmen durch eine fehlende stabile Membran pleiomorph, d.h. ihre Form reicht von kokkoid bis hin zu filamentös. Auf Nährböden wachsen sie charakteristischerweise in einer „Spiegeleikolonie“ mit dichtem Zentrum und einer hellen peripheren Zone. Mykoplasmen sind sehr anspruchsvoll in der Kultivierung, da ihnen aufgrund ihres kleinen Genoms viele Syntheseigenschaften verloren gegangen sind. Viele Arten können nur noch wenige Vitamine, Fettsäuren oder Nucleinsäurevorstufen synthetisieren (Razin et al. 1998).

Die meisten Mykoplasmen-Arten leben als Kommensalen auf Schleimhäuten. Allerdings gibt es auch pathogene Vertreter, die vor allen Dingen bei Entzündungen der Lunge, des Urogenitaltraktes oder der Gelenke (Jansson et al. 1983, Rottem 2003) zu finden sind. Ihre Beteiligung an der rheumatoiden Arthritis des Menschen wird kontrovers diskutiert. Sie spielen jedoch öfter eine Rolle bei der Verunreinigung von Zellkulturen und werden als Kofaktor von AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) in Betracht gezogen (Razin et al. 1998). In der humanen Zelllinie THP-1 (Monozytäre Leukämie Zelllinie) führt die Stimulation mit Mykoplasmen zu einer Zytotoxizität aufgrund der Ausschüttung von  $\text{TNF-}\alpha$  (Sugama et al. 1990).

Mykoplasmen haben verschiedenen Mechanismen entwickelt, sich mit der Immunabwehr des Wirtes zu arrangieren und möglichst lange in ihm zu überleben. Sie sind z.B. in der Lage, ein so genanntes molekulares Mimikry zu begehen und ihre phänotypische Gestalt zu verändern (Rottem 2003). Dadurch können sie sich der Immunantwort des Wirtes teilweise entziehen. Es ist erstaunlich, dass Mykoplasmen trotz ihres kleinen Genoms eine Menge an Genen besitzen, die für die Antigenität ihrer Zelloberfläche zuständig sind. Da sie wie schon erwähnt keine Zellwand besitzen, fehlen ihnen also auch klassische PAMPs wie das Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien oder Peptidoglycane (1.6.1 und 1.6.2). Trotzdem wurde nachgewiesen, dass ihre membranären Lipopeptide verschiedene humane Zelllinien zur Produktion von  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-6}$  stimulieren können, allerdings auf einem anderen



Signalweg als LPS (Rawadi et al. 1996). Wie heute bekannt ist, sind für diese Stimulation mycoplasmale Lipopeptide verantwortlich. Daher sollen die LAMPs „MALP-2“ und „FSL-1“, die aus *M. fermentans* bzw. *M. salivarium* isoliert wurden, in den nächsten Kapiteln näher betrachtet werden.

#### **1.6.3.1.1 *Mycoplasma salivarium* und *Mycoplasma fermentans***

*Mycoplasma salivarium* ist, wie der Name schon vermuten läßt (saliva=Speichel), in der Mundflora zu finden. Obwohl es auch bei klinisch gesunden Patienten vorkommt, ist es der Hauptvertreter bei Erkrankungen in der Mundhöhle, wie Peridontitis, Osteitis oder Phlegmonen. Shibata et al. konnten 1998 zeigen, dass *M.salivarium* bzw. seine isolierte Zellmembran in der Lage ist, IL-6 und IL-8, zwei wichtige Zytokine bei Entzündungsreaktionen, in humanen Gingiva-Fibroblasten zu induzieren. Für die Aktivierung humaner gingivaler Fibroblasten (HGF), die zur Induktion inflammatorischer Zytokine und der Expression eines interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM, CD54) auf ihrer Oberfläche führt, wurden *M. salivarium* und *M. fermentans* verantwortlich gemacht (Dong et al. 1999).

*Mycoplasma fermentans* gehört, wie der Name sagt, zu den fermentativen Mycoplasmen, d.h. sie können Glucose sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen verstoffwechseln (Miles et al. 1991). Die Beteiligung von *M.fermentans* an Infektionen ist umstritten, denn obwohl der Keim in erkrankten Patienten vermehrt zu finden ist, wird er auch immer wieder aus Gesunden isoliert. Über seine mögliche Beteiligung an Erkrankungen wie Arthritis oder AIDS wird diskutiert. Ein 48 kDa Membranprotein aus *M. fermentans* induziert in Monozyten die Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Kostyral et al. 1994). Bei intracerebraler Administration von *M. fermentans* kommt es ebenfalls zu der Produktion dieser Zytokine und zudem Prostaglandinen, was zu neuroendokrinen Veränderungen und „sickness behavior“ führt (Yirmiya et al. 1997, 1999).

#### **1.6.4 Das Makrophagen-stimulierende Lipopeptid-2 (MALP-2)**

Das Makrophagen stimulierende Lipopeptid-2 (MALP-2) wurde aus einer mit *Mycoplasma fermentans* und *Mycoplasma hyorhinis* kontaminierten humanen Zelllinie HL-60 (human

acute myeloid leukemia) isoliert (Quentmeier et al. 1990). Man nannte diese damals noch unbekannte bioaktive Substanz „mycoplasma-derived high molecular weight material“ (MDHM) und fand heraus, dass eine Stimulation von Makrophagen mit dieser Substanz zu einer Ausschüttung von IL-1, IL-6, TNF und Prostaglandinen (Mühlradt & Schade 1991) sowie Stickstoffmonoxid (NO) (Mühlradt & Frisch 1994) führte. Nach verschiedenen Reinigungsschritten konnte MALP-2 als ein 2 kDa schweres Lipopeptid mit zwei langen, durch Esterbindungen an Glycerol-Lysin gebundenen Fettsäureketten identifiziert und synthetisch hergestellt werden (Mühlradt et al. 1997). Der N-terminale Anteil ist in der Membran verankert. Seine Struktur wurde wie folgt festgelegt: S-(2,3-bispalmitoyloxypropyl) Cys-Gly-Asn-Asn-Asp-Glu-Ser-Asn-Ile-Ser-Phe-Lys-Glu-Lys (Mühlradt et al. 1996, 1997). Es unterscheidet sich daher charakteristisch von anderen bakteriellen Lipoproteinen, weil eine dritte N-terminale Fettsäure fehlt. Durch Sequenzierung der Genome von *M.pneumoniae* und *M.genitalium* konnte gezeigt werden, dass ihnen das entscheidende Enzym, eine N-Acetyltransferase, die zur Biosynthese eines Lipoproteins mit drei Fettsäuren notwendig ist, fehlt. Die Peptidsequenz ist offenbar essentiell für Zytotoxizität und Antigenizität, die komplette molekulare Struktur, also sowohl das Lipid als auch das N-terminale Peptid, scheinen für die Spezifität der sie erkennenden Toll-like Rezeptoren (1.6.6) eine Rolle zu spielen und für die Interaktion von Ligand-Rezeptor verantwortlich zu sein (Morr et al. 2002, Buwitt-Beckmann et al. 2005). Die Konzentration für eine halbmaximale Makrophagen stimulierende Aktivität liegt im picomolaren Bereich, d.h. tausendfach niedriger als bei anderen bakteriellen Lipopeptiden (Mühlradt et al 1997). Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass diacylierte Lipopeptide sogar potentere Aktivatoren des Immunsystems darstellen als triacylierte. Allerdings ist MALP-2 in seiner pyrogenen Wirkung weit schwächer als LPS. Um denselben pyrogenen Effekt zu erzeugen, welchen 1 ng LPS im Kaninchen hat, musste MALP-2 in der 1000fach höheren Dosierung eingesetzt werden (Deiters et al. 2003).

Natürlicherweise liegt MALP-2 als R-Stereoisomer vor. Dieses ist >100fach aktiver als das synthetisch hergestellte S-Stereoisomer (Takeuchi et al. 2000). MALP-2 wird als so genanntes PAMP von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt, und zwar von dem auf diesen Zellen befindlichen Heterodimer aus TLR2/6. Bei dem synthetisch hergestellten S-Stereoisomer scheint das Oberflächenmolekül CD36, ähnlich wie CD14 bei LPS, eine große Rolle in der Erkennung zu spielen (Hoebe et al. 2005).

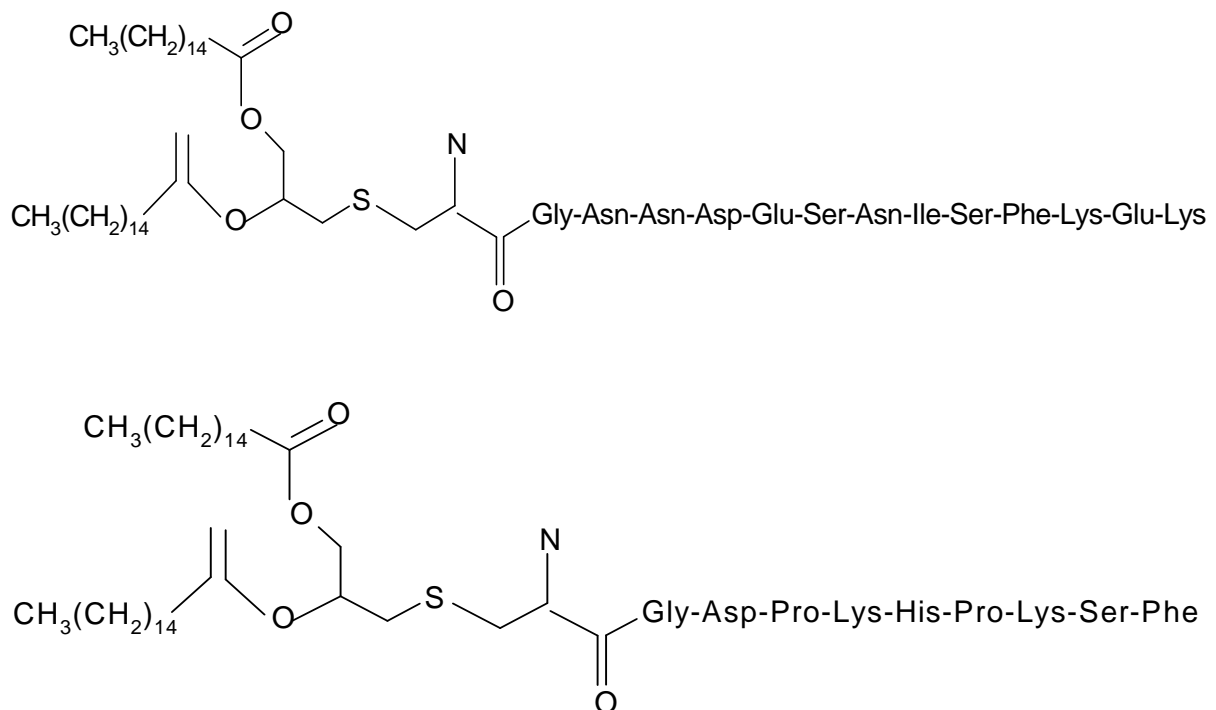
Stimulierte Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen reagieren auf MALP-2 mit der Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF sowie Chemokine wie MIP-1 (Makrophagen-inflammatorisches Protein-1), MIP-2, MCP-1 (Monozyten chemoattractant protein-1) (Kaufmann et al 1999), NO und Prostaglandinen (Takeuchi et al. 2000). MCP-1 wird auch von MALP-2 stimulierten Fibroblasten freigesetzt (Deiters & Mühlradt 1999). Ausserdem kommt nach Stimulation mit MALP-2 zu einer Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (CD40, CD80, CD83, CD86), die als kostimulatorische Moleküle für Zell-Zell-Interaktionen v.a. zwischen Zellen des Immunsystems zuständig sind. Außer der Stimulation der Freisetzung von Zytokinen reguliert das Mycoplasmalipoppeptid die Expression von Klasse-II MHC auf Makrophagen herunter und inhibiert damit die Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen (Frisch 1996). Dies könnte die Chronizität einiger Mycoplasmeninfektionen erklären. Da mycoplasmale Infektionen oft nicht unbedingt mit einer starken Immunantwort einhergehen, wurde vermutet, dass es zu einer Art „Downregulation“ kommt. Dies geschieht z.B. über die Bildung des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 (Rawadi et al. 1996).

Die intraperitoneale Injektion von MALP-2 verursacht eine massive Infiltration der Bauchhöhle mit Granulozyten und Makrophagen. Wird es in die Lunge appliziert, kommt es zu einem ähnlichen Ergebnis, es werden Leukozyten rekrutiert (Lührmann et al. 2002, Tschernig et al. 2003) und die klinischen Befunde sind vergleichbar mit jenen von Patienten mit *M.pneumoniae* oder jenen von Nagern mit *M.pulmonis*-Infektion.

Obwohl der Begriff „Endotoxin“ bislang nur für LPS gebraucht wurde, postulieren Galanos et al. (2000), dass auch MALP-2 dieser Name zusteht, da es klassische Endotoxin-Eigenschaften besitzt, wie etwa die Fähigkeit, Makrophagen zur Produktion von Zytokinen zu stimulieren, B-Zellen zur Proliferation anzuregen, als Pyrogen oder sogar „letales Toxin“ zu wirken und wie LPS eine Schwartzman Reaktion hervorzurufen.

Von MALP-2 erhofft sich die Forschung auch medizinische Fortschritte, wie etwa den Einsatz als Adjuvans oder zur Förderung der Wundheilung. Erste vielversprechende Studien wurden dazu schon durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass MALP-2 intranasal appliziert ein potentes Adjuvans darstellt und die lokale mucosale Abwehr stärkt, was im Hinblick auf die Eintrittspforte für Mycoplasmen (Schleimhaut) großen Sinn macht (Borsutzky 2004). Bei diabetischen Mäusen konnte eine enorme Steigerung der Wundheilung bewirkt werden (Deiters et al. 2004). Hierbei kommt es zu einer Ausschüttung von Chemokinen aus Fibroblasten und Keratinozyten, wodurch Makrophagen und andere

Leukozyten angelockt werden, die dann in der Wunde von MALP-2 stimuliert werden, Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor) oder VEGF (vascular endothelial growth factor) und andere Wundheilungsfaktoren wie TGF- $\beta$  (transforming growth factor) auszuschütten. Bei Asthmapatienten kam es zu einer Abschwächung der Symptome, und bei Peritonitis (Feterowski et al. 2005) und Pankreastumoren (Schneider et al. 2004) konnte MALP-2 die Lebenszeit verlängern. Neuere Studien *in vitro* (Sato et al. 2000) und *in vivo* (Deiters 1999, Deiters et al. 2003) geben Hinweise darauf, dass sich die Reaktivität auf LPS durch eine Vorbehandlung mit MALP-2 modifizieren könnte.



**Abbildung 4: Strukturformeln von MALP-2 (oben) und FSL-1 (unten). FSL-1 unterscheidet sich von MALP-2 in der Aminosäuresequenz und in der Länge des Peptidanteils. Beide mycoplasmale Lipopeptide besitzen zwei durch Esterbindungen verbundene Fettsäuren, die an den Glycerol-Cys Anteil gebunden sind, und einen freien N-Terminus am Ende des Peptidanteils.**

### 1.6.5 Das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1)

Auch viele andere Mycoplasma Spezies wie *M.hyorhina* oder *M.salivarium* enthalten MALP-2 ähnliche Lipoproteine mit einer ähnlichen biologischen Aktivität. Für die

Aktivierung humaner gingivaler Fibroblasten (HGF) zur Induktion inflammatorischer Zytokine und der Expression eines interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1/CD54) auf ihrer Oberfläche ist ein 44-kDa Lipopeptid aus *M. salivarium* verantwortlich (Shibata et al. 2000). Dabei ist der Lipid Anteil, nicht aber der Protein-Anteil entscheidend. Das synthetisch hergestellte Lipopeptid „Fibroblast-stimulating Lipopeptide“ (FSL-1, C<sub>84</sub>H<sub>140</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub>S) stellt die N-terminale Sequenz des LP44 aus *M. salivarium* dar. Diese Sequenz wurde als Pam<sub>2</sub>- (Diacylglyceryl)Cys-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe festgelegt und zeigte dieselbe Aktivität wie LP44 selbst (Shibata et al. 2000). FSL-1 ist dosisabhängig, ähnlich wie MALP-2, in der Lage, HGF zur Produktion von IL-6, IL-8 und MCP-1 und Monozyten bzw. Makrophagen zur Produktion von TNF- $\alpha$  anzuregen (Okusawa et al. 2004).

Da sowohl der Diacylglyceryl- (Pam<sub>2</sub>Cys) als auch der Peptidanteil alleine nicht in der Lage waren, Makrophagen zu aktivieren, wird angenommen, dass die komplette Struktur des Lipopeptids dazu benötigt wird (Okusawa et al. 2004).

FSL-1 unterscheidet sich von MALP-2 in der Aminosäuresequenz und in der Länge des Peptidanteils. Beide mycoplasmale Lipopeptide (bzw. Analoge) besitzen zwei durch Esterbindungen verbundene Fettsäuren, die an den Pam<sub>2</sub>Cys Anteil gebunden sind, und einen freien N-Terminus am Ende des Peptidanteils. FSL-1 wird wie MALP-2 durch das Heterodimer TLR2/6 erkannt (Fujita et al. 2003, Takeda et al. 2002), allerdings kommt es durch FSL-1 Stimulation zu keiner vermehrten Expression dieser Rezeptoren (Okusawa et al. 2004). FSL-1 ist in der Lage, dendritische Zellen zur Ausschüttung des für T-Helferzellen-1 benötigten IL-12 anzuregen und die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle (CD80, CD86 und IA<sup>b</sup>, letzteres gehört zum MHC II) zu verstärken. Dies geschieht über einen TLR2 abhängigen Signalweg (Kiura et al. 2005). Auf die Details des Signalweges soll in 1.6.6.2 noch näher eingegangen werden. FSL-1 und MALP-2 besitzen *in vivo* fast identische Eigenschaften: sie induzieren bei Ratten die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ , erzeugen fast gleich hohes Fieber und führen zu „sickness behavior“ (Hübschle et al. 2006).

### **1.6.6 Die Toll-like Rezeptoren**

Das ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckte Toll Protein ist ein Typ I transmembranärer Rezeptor, der in einem Entwicklungsschritt der Fliegenlarve eine

wichtige Rolle spielt (Hashimoto et al. 1988). Allerdings konnten Lemaitre et al. 1996 zeigen, dass eine Signalkaskade am Toll-Rezeptor eine antifungale (gegen *Aspergillus fumigatus*) und somit auch eine immunologische Wirkung für die Fruchtfliege hat. In diese Signalkaskade sind 12 Proteine involviert, die inzwischen schon sehr gut erforscht sind. „Spätzle“ fungiert als ein endogener Ligand und führt nach seiner proteolytischen Spaltung zu einer Dimerisierung des Rezeptors. Dabei werden die Adapterproteine „Tube“ (Homolog zu „MyD88“), und die Serin-threonin Kinase „Pelle“ (Homolog zu IRAK) aktiviert. Diese ist dann in der Lage, den Inhibitor „Cactus“ zu phosphorylieren und abzubauen und auf diesem Weg einen für *Drosophila* spezifischen Transkriptionsfaktor (DIF) zu aktivieren (Rutschmann et al. 2000), der dann in den Nukleus gelangt, um die Genexpression für die Entstehung des antimikrobiellen Wirkstoffes „Drosomycin“ zu steuern, der antifungal wirkt. Die Signalkaskade, die die für die Entwicklung des Embryos (dorso-ventrale Polarität) wichtigen Gene steuert, unterscheidet sich hiervon leicht und es wird ein anderer Transkriptionsfaktor (Rel/Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B) benötigt (Hoffmann 2003). Für die Immunantwort auf gram-negative Bakterien spielt der Toll-Rezeptor bei *Drosophila* keine Rolle, sondern hier gibt es einen so genannten Imd-Signalweg (Lemaitre et al. 1996). Die beiden verschiedenen Signalwege sind in einigen Zwischenschritten den Signalwegen im Säugetier sehr ähnlich, vor allem Dingen mit dem IL-1 Rezeptor Signalweg gibt es mehrere Parallelen. Bisher sind neun Toll-Proteine in der Fruchtfliege beschrieben.

Ein zum Toll-Protein homologer Rezeptor im Säugetier war in der Lage, die Immunantwort zu beeinflussen (Medzhitov et al. 1997). Nach dieser Entdeckung wurden zahlreiche weitere Proteine charakterisiert, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Toll-Rezeptor aufwiesen und Toll-like Rezeptoren genannt (TLR) (Rock et al. 1998). Die TLRs werden derzeit als Schlüsselrezeptoren des angeborenen Immunsystems angesehen.

Bei den Toll-like Rezeptoren handelt es sich um eine ganze Familie homologer Typ I transmembranärer Proteine, die als charakteristisches Merkmal eine extrazelluläre Leucinreiche Region besitzen (LRRs-Leucine rich repeats), innerhalb derer sich mehrere kleine cystein-reiche Regionen befinden. Die zytoplasmatische Region ist für die Signaltransduktion zuständig. Sie ist identisch zu derjenigen des IL-1 Rezeptors (IL-1R) und wird als Toll/IL-1R Homologie Domäne (TIR) bezeichnet (Aderem & Ulevitch 2000). Die Folge der Aktivierung von TLRs durch ihr jeweils spezifisches PAMP, ist eine Expression von Genen, die in die Immunantwort involviert sind, wie beispielsweise für proinflammatorische Zytokine. Die Signalkaskade (Abbildung 5), die an den TLRs in Gang gesetzt wird, ist sehr komplex und

wird gegenwärtig ständig durch neue Erkenntnisse vervollständigt, daher soll hier nur ein grober Überblick geschaffen werden (ausführlich in: Heine & Lien 2003, Takeda & Akira 2005, Uematsu & Akira 2006). Bei Ligandenbindung kommt es zu einer Dimerisierung des jeweiligen Rezeptors. Im Fall von TLR2 werden Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 gebildet, bei anderen TLRs entstehen Homodimere (Ozinsky et al. 2000). Die Zusammenlagerung verschiedener TLRs erhöht ihre Spezifität (Ozinsky et al. 2000). Die TIR Domäne besitzt bei allen TLRs außer TLR3 ein Adaptor Molekül, das MyD88 (Medzhitov et al. 1998), das auch an der Signaltransduktion am IL-1R und IL-8R eine Rolle spielt. Es ist wichtig für die Produktion proinflammatorischer Zytokine, denn MyD88-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, diese nach Endotoxin Stimulation zu induzieren (Kawai et al. 1999). Ein MyD88 unabhängiger Signalweg am TLR3 und TLR4 führt dagegen über den Transkriptionsfaktor IRF3 zur Expression von Interferonen (Kawai & Akira 2005).

Bei dem MyD88 abhängigen Signalweg kommt zu einer relativ identischen Signalkaskade wie am IL-1R. MyD88 besteht aus einer C-terminalen TIR Domäne und einer N-terminalen „Todesdomäne“, die mit der TIR Domäne des TLRs assoziiert ist (Medzhitov et al. 1998). Es rekrutiert IRAK-4 (IL-1R associated kinase), welche wiederum zu einer Phosphorylierung von IRAK-1 führt. IRAK-M hingegen besitzt keine Kinaseaktivität und verhindert die Dissoziation von IRAK-1 und -4 vom Rezeptor und wirkt somit hemmend (Kobayashi et al. 2002). IRAK-1 assoziiert mit TRAF6 (TNF receptor-associated factor-6) und bildet einen Komplex mit Ubiquitin-konjugierten Enzymen, um die TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activating kinase) und weitere MAPK zu aktivieren und somit den Transkriptionsfaktor AP-1, oder den NF $\kappa$ B über die NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK) und die nachfolgende Phosphorylierung des I $\kappa$ B Kinase Komplexes (IKK) zu bewirken.

Ein komplexer MyD88 unabhängiger Signalweg wurde für den TLR3-Liganden PI:PC (Alexopoulou et al. 2001), aber auch für LPS (Kawai & Akira 2005) beschrieben. Weitere in die Signalkaskade involvierte alternative Adaptorproteine an der TLRs sind jeweils eine TIR Domäne enthaltende Proteine TIRAP/MAL (TIR- domain containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like) (Horng et al. 2001), TRIF/TICAM-1 (TIR domain containing adaptor inducing interferon beta/TIR domain containing adaptor molecule-1), TRAM/TICAM-2 (TRIF-related adaptor molecule/ TIR domain containing adaptor molecule-2) (Yamamoto et al. 2002, Oshiumi et al. 2003). TRAM beispielsweise fungiert als Brücke zwischen TLR4 und TRIF (Oshiumi et al. 2003). Diese Moleküle sind Teile der unterschiedlichen Signalkaskaden an

einem oder mehreren spezifischen TLRs, meist sind sie Teil der MyD88 unabhängigen Wege und sie sind fähig, verschiedene zelluläre Antworten zu aktivieren (Paul-Clark et al. 2006).

Es wird vermutet, dass sowohl der MyD88 abhängige als auch –unabhängige Signalwege parallel eine Rolle am TLR2 und TLR4 spielen (Yamamoto et al. 2002).

Bislang sind 10 Toll-like Rezeptoren im Menschen und 13 in der Maus beschrieben worden (Tabelle 3), die eine große Bandbreite an Liganden bzw. PAMPs erkennen können (Heine & Lien 2003).

**Tabelle 3: Vielfalt der PAMPs und ihre spezifische Erkennung durch Toll-like Rezeptoren**

Liganden (PAMPs)	Toll-like Rezeptoren
Tri-acylierte Lipopeptide	TLR1
Lipoproteine/-peptide (gram+), Zymosan	<b>TLR2</b>
Doppelsträngige RNA (virale & nicht virale), Poly I:C	TLR3
Lipopolysaccharid (gram -), Taxol (pflanzlich)	<b>TLR4</b>
Flagellin	TLR5
Di-acylierte Lipopeptide	<b>TLR6</b>
Einzelsträngige RNA (virale & nicht-virale)	TLR7
Einzelsträngige virale RNA	TLR8
Doppelsträngige DNA (CpG-reiche, virale & nicht virale)	TLR9
?	TLR10
Ligand aus Bakterien des Urogenitaltraktes	TLR11
CpG-reiche Oligodesoxynukleotide (Zytomegalievirus)	TLR12
CpG-reiche Oligodesoxynukleotide (Zytomegalievirus)	TLR13

Die TLRs 1, 2, 4 und 6 sitzen auf der Zelloberfläche, während die TLRs 3, 7, 8 und 9 auf intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen zu finden sind. Abgesehen von ihrer Expression auf Immunzellen spielen die TLRs auch im Gehirn eine entscheidende Rolle, und zwar nicht nur als Teil der angeborenen Immunantwort, sondern sie sind auch an der ZNS Autoimmunität, Neurodegeneration und Gewebeschäden beteiligt (Kielian 2006).

Zusätzlich zu den TLRs spielen wahrscheinlich auch zytoplasmatische Rezeptoren wie NOD1 und 2 (nucleotide-oligomerization domain) eine Rolle bei der Erkennung von PAMPs. Sie wirken wahrscheinlich synergistisch bei polymikrobiellen Infektionen und führen über eine



komplexe Signalkaskade, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, ebenfalls zu der Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Uematsu & Akira 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die spezifischen TLRs für LPS und FSL-1 im Folgenden noch einmal näher eingegangen.

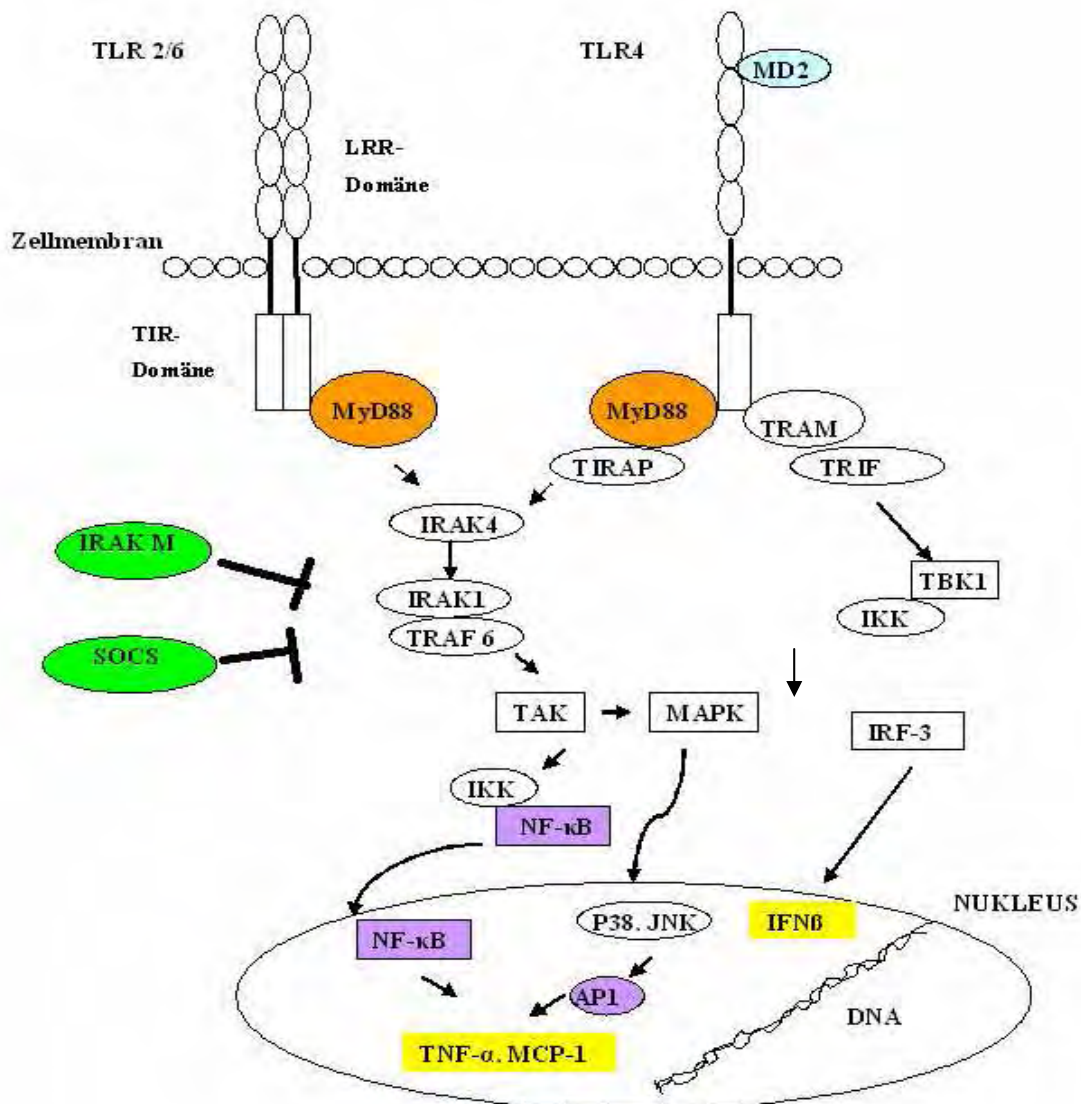


Abbildung 5: Die Signalkaskaden der Toll-like Rezeptoren TLR4 und TLR2/6. Mycoplastmale Lipopeptide binden an das TLR2/6 Heterodimer. Über das Adapterprotein MyD88 kommt es über IRAK4 zur Bildung von IRAK1, welches mit TRAF6 einen Komplex bildet. Hierüber wird dann eine TAK aktiviert, die entweder zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder über MAPK und p38/JNK zur Aktivierung von AP-1 führt. Beide Transkriptionsfaktoren leiten die Transkription von TNF- $\alpha$  oder MCP-1 ein. IRAK M verhindert die Dissoziation von IRAK1 und-4 vom Rezeptor und wirkt somit hemmend. Auch SOCS kann den Signalweg hemmen. Der TLR4-

**MD2-LPS Komplex kann einerseits einen MyD88-abhängigen Signalweg über das Adaptormolekül TIRAP einleiten und andererseits über TRAM und TRIF die Aktivierung eines IRF-3, der die Bildung von Interferon- $\beta$  induziert, bewirken.**

### **1.6.6.1 Der TLR4 als Rezeptor für LPS**

Kirschning et al. 1998 und Yang et al. 1998 vermuteten zunächst den TLR2 als Rezeptor für LPS. Es stellte sich dann aber heraus, dass der TLR2 nicht nötig ist für LPS, aber eine Rolle in der Erkennung von gram-positiven Bakterien und anderen bakteriellen Lipopeptiden (Takeuchi et al. 1999, Aliprantis et al. 1999) spielt. Die Interaktion von LPS mit dem TLR2 wird auf die Verunreinigung vieler LPS Präparationen mit anderen bakteriellen Lipoproteinen zurückgeführt.

Prinzipiell wird aber der TLR4 als der zuständige Rezeptor für LPS, bzw. seinem Lipid A angesehen (Lien et al. 2000). TLR4 defiziente Mäuse zeigten sich als hyporesponsiv gegenüber der Konfrontation mit LPS (Poltorak et al. 1998, Hoshino et al. 1999). LPS bindet allerdings wohl nicht direkt an den TLR4, sondern benötigt dafür das CD14 (Wright 1999). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Anwesenheit von CD14 die Antwort auf LPS verstärkt. Der TLR4 und CD14 werden konstitutiv im Gehirn exprimiert, insbesondere in den CVO's, allerdings kommt es bei der Stimulation mit LPS nicht zu einer vermehrten Expression des TLR4 (Laflamme & Rivest 2001).

MD-2 wird als Adaptermolekül für die Interaktion zwischen LPS und TLR4 benötigt (Fitzgerald et al. 2004). Am TLR4 läuft der komplexeste Signalweg ab (Abbildung 5), entweder über TIRAP und MyD88 oder über die Adaptorproteine TRAM und TRIF und einer TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator binding kinase (TBK-1) (Fitzgerald 2003, Takeda & Akira 2005). Die Internalisierung des TLR4-MD2-CD14 Komplexes und der folgende Transport zu Golgi Apparat sind allerdings unabhängig von einer Signaltransduktion (Latz et al. 2002).

Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit LPS läuft also über den MyD88 Signalweg ab, während die Transkription von Interferonen induzierenden Genen über den MyD88 unabhängigen Signalweg abläuft (Heine & Lien 2005).

Die Aktivierung von TLR4 führt neben der Induktion von Zytokinen und Interferonen auch zur Produktion von NOSII (NO-Synthase), wofür vermutlich der MyD88 unabhängige Weg über das Adapterprotein TRIF benötigt wird (Paul-Clark et al. 2006).

Es wird diskutiert, dass es noch einen TLR unabhängigen Weg für die Erkennung von LPS gibt, in dem die bereits erwähnten NOD1 und 2 im Zytosol eine Rolle spielen (Takeda & Akira 2005).

#### **1.6.6.2 Das TLR2/6 Heterodimer als Rezeptorpaar für mycoplasmale Lipopeptide**

Der TLR2 erkennt ein sehr großes Spektrum an mikrobiellen Komponenten, da er Heterodimere mit anderen, strukturell verwandten TLRs bilden kann, wie beispielsweise TLR1 oder TLR6.

Es konnte gezeigt werden, dass MALP-2 bzw. strukturelle Analoga durch den TLR2 erkannt werden (Seya & Matsumoto 2002). Eine Studie von Takeuchi et al. 2001 konnte zeigen, dass der TLR2 den TLR6 als „Korezeptor“ benötigt um diacylierte Lipopeptide zu erkennen. Makrophagen aus TLR6 Knock-out Mäusen reagierten nicht auf die Konfrontation mit MALP-2. TLR2/6 benötigt zur Erkennung diacylierter Lipopeptide zusätzlich ein Adaptormolekül, das CD36 (Hoebe et al. 2005). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Heterodimere aus TLR2 und TLR6 nicht von den Liganden induziert werden, sondern vorher bestehen, allerdings ist die Assoziation mit dem Adaptormolekül CD36 Liganden induziert (Triantafilou et al. 2006). Das TLR2/6 Heterodimer internalisiert nach Bindung an FSL-1 und gelangt zum Golgi Apparat, wobei CD36 für die Internalisierung offensichtlich keine Rolle spielt. Die Internalisierung scheint von so genannten Lipid-Rafts (Cholesterin-reiche Mikrodomänen in Zellmembranen) abhängig zu sein, da diese Domänen spaltende Stoffe wie Nystatin oder Filipin enthalten, die den Transport von TLR2/6 und CD36 zum Golgi Apparat verhindern können. Allerdings befindet sich das Heterodimer nicht in dieses Rafts, sondern wird nach Stimulation mit dem Liganden dorthin rekrutiert (Triantafilou et al. 2006). Der Transport zum Golgi Apparat ist wie bei LPS unabhängig von einer Signalkaskade, daher ist seine Bedeutung in diesem Zusammenhang noch unklar.

Ein Teil der Signalkaskade, die durch MALP-2 am TLR2/6 in Gang gesetzt wird, sind die MAPK (Mitogen-aktiviertes Protein-Kinasen). Bei MALP-2 handelt es sich im Speziellen um die MAPK ERK1/2 (Extracellulär signal regulierte Kinase), p38 und SAPK/JNK (cJun N-H<sub>2</sub>-terminal Kinase) (Garcia et al. 1998). Bei den durch MALP-2 aktivierten Transkriptionsfaktoren handelt es sich um AP-1 und NFκB (Garcia et al. 1998). Die

Aktivierung von p38, SAPN/JNK, AP-1 und NF $\kappa$ B konnte auch für FSL-1 nachgewiesen werden (Nakamura et al. 2002).

Es wird vermutet, dass die Aktivierung des TLR2/6 Heterodimers durch MALP-2 zwei zeitlich versetzte Ereignisse hervorruft: die NF- $\kappa$ B Aktivierung, die über MyD88 gesteuert wird und relativ früh geschieht, und die Einleitung der Apoptose als ein spätes Ereignis, das sowohl über MyD88 als auch die MAPK p38 gesteuert wird (Into et al. 2004)

FSL-1 aktiviert THP-1 Zellen zur Produktion von TNF- $\alpha$  und HEK293 (Human embryonic kidney) Zellen, die mit TLR2 oder TLR2/6 transfiziert waren, zur Ausschüttung von NF $\kappa$ B, nicht aber Zellen, die nur mit TLR6 transfiziert waren (Okusawa et al. 2004). FSL-1 induziert in Makrophagen die Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , allerdings nicht von NO (Paul-Clark et al. 2006). Für die Erkennung am TLR2/6 wurde vor allen Dingen der hydrophobe Anteil der mycoplasmalen Lipopeptide vermutet (Okusawa et al. 2004). Das spräche allerdings dafür, dass FSL-1 sogar potenter ist als MALP-2, welches ein hydrophiles Lys-Ende besitzt. Bei einer Injektion von 100 $\mu$ g/kg waren Fieberreaktion und Zytokinebildung von Ratten auf MALP-2 und FSL-1 aber nicht signifikant unterschiedlich (Hübschle et al. 2006). Die erzielten Ergebnisse *in vitro* sind somit nicht auf die Versuche *in vivo* übertragbar.

## **1.7 Der Zyklooxygenase Weg als wichtiger Zwischenschritt in der Fieberentstehung**

Der Aktivierung des Zyklooxygenase-Weges zur Synthese von Prostaglandinen wird eine Schlüsselrolle bei den Zytokin-vermittelten inflammatorischen Prozessen zugeschrieben.

Die Prostaglandin-Synthese läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst kommt es durch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) zu einer Spaltung von Phospholipiden aus Zellmembranen zu Arachidonsäure (AA). Diese wird dann durch die Zyklooxygenase (Zyklooxygenaseweg) zu zyklischen Endoperoxiden gespalten (PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub>), die dann über eine Prostaglandin-Synthase (PG(E)S) zu Prostaglandinen, Thromboxanen oder Prostazyklinen synthetisiert werden. Alternativ kommt es über die 5-Lipoxygenase zur Bildung von Leukotrienen (Lipoxygenaseweg) (Abbildung 6). Dies ist allerdings ein stark vereinfachtes Schema, denn die letztendliche Bildung von PGE<sub>2</sub> wird über eine Reihe von Enzymen und Isoenzymen gesteuert (Ivanov & Romanovsky 2004).

Die Mitglieder der PLA<sub>2</sub> Familie gehören zu einer der folgenden vier Gruppen: zu den Calcium abhängigen sekretorischen (sPLA<sub>2</sub>) und cytosolischen (cPLA<sub>2</sub>), den Calcium-

unabhängigen cytosolischen PLA<sub>2</sub>s oder zu den Plättchen aktivierenden Faktoren (PAF) (Murakami & Kudo 2002). Letztere zwei spielen allerdings keine Rolle in der PGE<sub>2</sub> Synthese. Ihnen ist allerdings gemeinsam, dass sie die Esterbindungen der membrangebundenen Phospholipide durch Hydrolyse spalten können. Bei Stimulation von Zellen durch inflammatorische Agentien kommt es zu einer raschen Aktivierung von cPLA<sub>2</sub>- $\alpha$  durch Phosphorylierung und zum Transport zum Golgi Apparat, dem Endoplasmatischen Retikulum oder der Kernmembran (Murakami & Kudo 2002), während verschiedene Isoformen der sPLA<sub>2</sub> extrazellulär sezerniert werden. Die Stimulation von Versuchstieren mit LPS führt zur Hochregulierung beider genannter Formen der PLA<sub>2</sub> in verschiedenen Organen, unter anderem dem Gehirn (Ivanov & Romanovsky 2004).

Außer den PLA<sub>2</sub>s und den Zyklooxygenasen (COX) (1.7.1) kommt auch der PGES eine größere Bedeutung zu. Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym, das als mikrosomale PGES (mPGES-1) bezeichnet wird und in verschiedenen Organen, inklusive dem Gehirn, nach Stimulation mit LPS hochreguliert wird (Mancini et al. 2001). Drei Isoformen der mPGES sind bisher beschrieben (Park et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass stimulierte Endothelzellen eine Co-Expression von mPGES und COX-2 Proteinen zeigen, und zwar bevorzugt im Nukleus (Yamagata et al. 2001). Eine zytosolische PGES wurde ebenfalls beschrieben, sie scheint allerdings eher an COX-1 zu koppeln und für die basale Synthese von PGE<sub>2</sub> zuständig zu sein (Tanioka et al. 2000); ihre Rolle bei inflammatorischen Prozessen ist noch nicht hinreichend geklärt. Im Zuge der Hochregulierung PGE<sub>2</sub> synthetisierender Enzyme kommt es zu einer Herunterregulierung der entsprechenden katabolisierenden Enzyme.

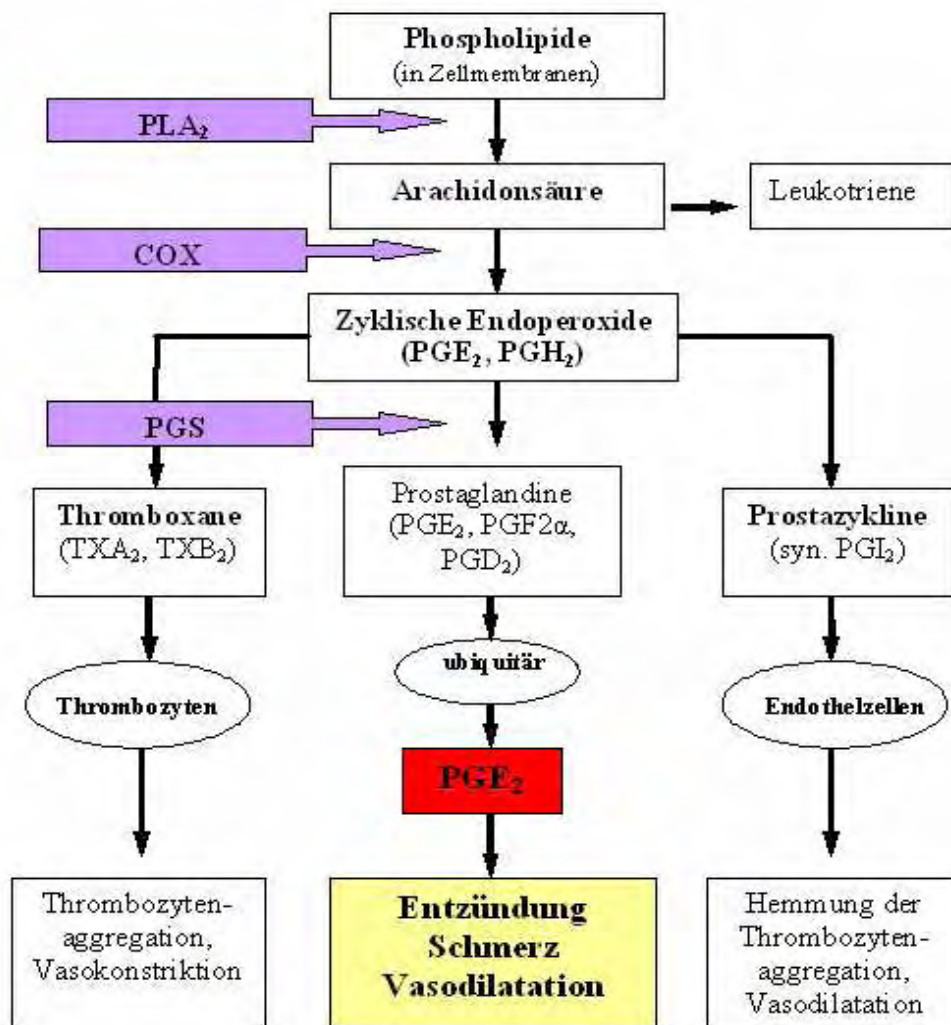


Abbildung 6: Die PGE<sub>2</sub> Kaskade: Durch die Spaltung von Phospholipiden durch eine PLA<sub>2</sub> zu Arachidonsäure, die dann über COX zu zyklischen Endoperoxiden gespalten wird, kommt es dann durch eine PGS zur Bildung von Thromboxanen, Prostazyklinen oder Prostaglandinen. Thromboxane wirken auf Thrombozyten und führen zu Aggregation und Vasokonstriktion, Prostazykline wirken auf Endothelzellen und führen zu einem gegenteiligen Ergebnis. Prostaglandine werden hingegen ubiquitär gebildet und bewirken u.a. Entzündungssymptome, Schmerz und Vasodilatation.

### 1.7.1 Die Zykllooxygenasen

Schon seit mehr als 3500 Jahre benutzt die Menschheit so genannte NSAIDs (nicht steroidale Antiphlogistika), doch erst seit etwa 30 Jahren sind die Mechanismen, die zu einer antiphlogistischen und antipyretischen Wirkung führen, nämlich die Blockade der Zykllooxygenasen, geklärt. Trotzdem gibt es noch immer Teile in diesem Puzzle, die in den

nächsten Jahren ergänzt werden müssen. Desweiteren verspricht man sich durch die Aufklärung des vollständigen Prostaglandin-Stoffwechsels neue therapeutische Ansätze, wie etwa durch eine selektive Blockade anderer, in der Prostaglandin-Synthese involvierter Enzyme, und damit einem Schutz derjenigen Prostaglandine, die wichtige physiologische Funktionen ausüben (Park et al. 2006).

Das Enzym Zyklooxygenase (COX) katalysiert eine zweifache Reaktion, in der AA zyklisiert und peroxidiert wird und folglich zu PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub> umgewandelt wird.

Die zwei Isoformen COX-1 und COX-2 sind schon hinreichend bekannt (Vane et al. 1998). Chandrasekharan et al. beschrieben 2002 eine weitere Isoform: COX-3. Sie stellt eine Splicing-Variante von COX-1 dar, ihre Bedeutung ist allerdings noch weitgehend unbekannt. Obwohl COX-1 und COX-2 60% Sequenzhomologie zeigen und dieselbe Reaktion katalysieren, besitzen sie unterschiedliche physiologische Funktionen (Vane et al. 1998).

COX-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert, sie spielt z.B. bei der Bildung physiologisch relevanter Prostaglandine im Magen eine Rolle. Im Laufe eines Entzündungsgeschehen kommt es zu keiner Hochregulierung der COX-1 Expression, in der Spätphase der Infektion kommt es im Gegenteil zu einer verminderten Expression der COX-1 mRNA in Leber, Lunge und Hypothalamus (Ivanov & Romanovsky 2004). COX-1 scheint eine untergeordnete Rolle bei der Fieberentstehung zu haben, da COX-1 defiziente Mäuse auf die Stimulation mit LPS mit einem zu erwartenden Fieber reagieren, während es bei COX-2 defizienten Tieren unterdrückt wird (Li et al. 1999).

Die COX-2 ist induzierbar, allerdings wird sie zu einem geringen Teil auch konstitutiv gebildet, und zwar in wenigen Organen (unter anderem dem Gehirn) und ist ebenfalls in physiologische Prozesse wie beispielsweise dem Flüssigkeitshaushalt der Niere involviert (Ivanov & Romanovsky 2004). Unter nicht inflammatorischen Bedingungen ist ein COX-2 Spiegel nicht messbar, er steigt aber während einer Entzündung sehr schnell an (Vane et al. 1998).

Bei LPS-Fieber kommt es zu einer Hochregulierung der Expression von COX-2 und mPGES-1 (Ivanov & Romanovsky 2004). Die Hochregulierung der COX-2 erfolgt erstaunlich schnell, nimmt im Verlauf der Infektion schnell wieder ab, während dann die PGE<sub>2</sub>-synthetisierenden Enzyme vermehrt gebildet werden.

Eine vermehrte Expression der COX-2 mRNA konnte nach systemischer Injektion von LPS, IL-1 und TNF in Gefäßendothelien nachgewiesen werden, allerdings nicht bei der Injektion von IL-6 (Lacroix & Rivest 1998). Die durch proinflammatorische Zytokine (insbesondere

IL-1 $\beta$ ) induzierte PG Synthese verläuft über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der in Gehirndothelzellen die COX-2 Expression auslöst, da eine Kolo-kalisation von COX-2 und I $\kappa$ B $\alpha$  dort nachgewiesen werden konnte (Laflamme et al. 1999). Es wurde daher vermutet, dass IL-6 in diese Produktion nicht involviert ist, da es den NF- $\kappa$ B nicht aktiviert. Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass ein spezifisches Antiserum gegen IL-6 in der Lage ist, die Expression der mRNA von COX-2 zu inhibieren, und zudem waren STAT3 positive Zellen mit der COX-2 kolo-kalisiert (Rummel et al. 2006). Dies spricht somit auch für eine Beteiligung von IL-6 an der PG-Synthese über den STAT3.

Welche Zellen in die COX-2 Synthese im Gehirn involviert sind, ist teilweise noch unklar, auf jeden Fall spielen Endothelzellen, perivaskuläre Mikroglia und meningeale Makrophagen eine entscheidende Rolle (Rummel et al. 2006).

Die Blockade der Prostaglandinsynthese durch unselektive COX-Inhibitoren verhindert effektiv die Fieberentstehung sowohl nach systemischer (Milton 1998) als auch nach lokaler Injektion von LPS (Ross et al. 2003), während die Menge an gebildetem TNF sogar ansteigt (Roth et al. 2002). Plasmaspiegel von IL-6 und Cortisol blieben beim Meerschweinchen bei der Injektion von Diclofenac, einem unselektiven COX-2 Inhibitor, in Kombination mit LPS, unbeeinträchtigt. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung der HPA-Achse von PG unabhängig ist (Roth et al. 2002). Dies widerspricht den Ergebnissen einer Studie von Turnbull & Rivier (1999), die einen ansteigenden Plasmaspiegel von ACTH nach systemischer oder intracerebraler Applikation von PGE<sub>2</sub> zeigen konnten.

Durch die Hemmung der COX-2 werden auch andere Begleiterscheinungen des „sickness behavior“, in erster Linie Anorexie gehemmt. Die selektive Hemmung von COX-1 hingegen hat keinen Effekt auf die Stimulation mit LPS.

Eine mögliche Beteiligung von Produkten des Zyklooxygenase-Weges bei der Vermittlung FSL-1 induzierter Effekte wurde bislang noch nicht erforscht und beinhaltet einen Teilaspekt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

### **1.7.2 Prostagandin E<sub>2</sub>**

Prostaglandine sind lipophile Hormone, sie gehören zu den Eikosanoiden, sind relativ kurzlebig und können parakrin oder autokrin wirken. Im Vergleich zu den Zytokinen sind sie eher leicht (350 Da) und sie können aufgrund ihrer Ladungseigenschaften in Kompartimenten



unterschiedlichen pH-Wertes passiv aus dem Zytosol durch die Zellmembran diffundieren, allerdings nicht mehr zurück (Schuster 1998). Diese Eigenschaft spielt vor allem für eine eventuelle Diffusion von PGE<sub>2</sub> durch die BHS eine entscheidende Rolle. Die Halbwertszeit von Prostaglandinen ist mit etwa 60 Sekunden sehr kurz. Sie werden über spezifische PG-Transporter (PGT) oder multispezifische Anionentransporter (MOAT) in die Zellen zurückbefördert und enzymatisch, vor allen Dingen in Leber und Lunge, metabolisiert (Schuster 1998). Diese Transporter werden interessanterweise in einer späten Phase der LPS-Stimulation in Leber und Lunge vermindert exprimiert, im Gehirn allerdings vermehrt (Ivanov & Romanovsky 2004). Dies resultiert wahrscheinlich in einer längeren Stimulation thermoregulatorischer Zentren mit PGE<sub>2</sub>. Das Gehirn besitzt wohl kaum katalytische Eigenschaften um PGE<sub>2</sub> abzubauen, sondern dieses wird wahrscheinlich über den Plexus chorioideus ins Blut abgegeben (DiBenedetto & Bito 1986)

Die physiologischen Funktionen der Prostaglandine sind sehr weitreichend, sie betreffen unter anderem den Kreislauf, die Thrombozytenaggregation, die Nierenfunktion, die gastrointestinale Sekretion und natürlich auch die Entzündungsreaktion. Die lokale Produktion führt zu einer Sensitivierung von Schmerzrezeptoren und einem verminderten Blutfluß, und es kommt zum Schmerzempfinden (Dolor), einem der Kardinalsymptome einer Entzündungsreaktion.

Prostaglandine nehmen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Fieber ein (Milton 1998). In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass die Entstehung von Fieber von dem Prostaglandin PGE<sub>2</sub> abhängig ist, das im Hinblick auf LPS induziertes Fieber als Hauptmediator angesehen wird (Sehic et al. 1996, Blatteis & Sehic 1997, Milton 1998, Engblom et al. 2002). Prostaglandine passieren in einem nicht fieberhaften Zustand die BHS nicht (Abul et al. 1997), aber während des Fiebers kommt es zu einer erhöhten Konzentration an PGE<sub>2</sub> in Blut, cerebrospinaler Flüssigkeit (Davidson et al. 2001) und dem Hypothalamus (Sehic et al. 1996), die mit der Veränderung der Körpertemperatur relativ parallel korreliert. Unter „normalen“ Bedingungen wird die PGE<sub>2</sub>-Synthese dadurch limitiert, dass die gebildete Arachidonsäure über alternative Wege verbraucht wird. Unter inflammatorischen Bedingungen hingegen scheint dem PGE<sub>2</sub> Syntheseweg ein Vorzug eingeräumt zu werden. Die PG-Synthese findet zum einen in der Peripherie statt und PG gelangt von dort über die Zirkulation ins Gehirn, dies konnte mit markiertem PGE<sub>2</sub> nachgewiesen werden (Davidson et al. 2001), zum anderen wird es auch im Gehirn selbst gebildet (Sehic et al. 1996).

Engblom et al. (2002) gehen davon aus, dass das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  an seinen Rezeptor bindet und in den Endothelzellen der BHS eine Expression von COX -2 und mPGES bewirkt, was dann letztendlich zur PGE<sub>2</sub> Produktion führt. In der POA wirkt PGE<sub>2</sub> als finaler Fiebermediator, indem es thermosensitive Neurone stimuliert und thermoinsensitive hemmt. Eine weitere Möglichkeit ist der neuronale Transport von PGE<sub>2</sub>-Signalen ins Gehirn, es wurde nachgewiesen, dass der *Nervus vagus* sowohl Rezeptoren für IL-1 $\beta$  als auch für PGE<sub>2</sub> besitzt (Ek et al. 1998).

Neben PGE<sub>2</sub> werden nach inflammatorischer Stimulation auch PGD und sein Metabolit 15deoxy-Prostaglandin J<sub>2</sub> durch COX-2 aus Arachidonsäure gebildet (Ivanov & Romanovsky 2004). In Zellen der Peripherie (Monozyten, Fibroblasten) kommt es durch diesen Metaboliten zu einem positiven Feedback auf die COX-2 Expression, während es im Gehirn eher zu einem antipyretischen Effekt und somit negativem Feedback kommt.

Da Prostaglandine überall im Gehirn gebildet werden, aber nur an definierten Strukturen wirken, muß es einen Mechanismus geben, der dies gezielt regelt. Dabei handelt es sich um die so genannten PG-Rezeptoren. Bisher sind acht dieser G-Protein gekoppelten, transmembranären Rezeptoren im Menschen beschrieben, darunter vier Subtypen des PGE<sub>2</sub> Rezeptors: EP1, EP2, EP3 und EP4 (Breyer et al. 2001), für den EP3 existieren speziesspezifisch mehrere Isoformen. Mäuse, denen der EP3 fehlt, zeigten nach Stimulation mit LPS oder IL-1 $\beta$  eine verminderte Fieberreaktion (Ushikubi et al. 1998). Der EP3 nimmt somit eine Schlüsselrolle in der durch PGE<sub>2</sub> vermittelten Fieberentstehung ein. Von ihm ist bekannt, dass er im Gehirn exprimiert wird, und zwar in Strukturen, die in inflammatorische Prozesse involviert sind wie der POA, dem NTS (Nucleus tractus solitarius) und der ventrolateralen Medulla, oder an der Schmerzrezeption beteiligt sind, wie z.B. dem Dorsalganglion oder dem Raphe System (Ek et al. 2000).

## **1.8 Fieberentstehungshypothesen**

Wird ein Organismus mit einem infektiösen Agens stimuliert, kommt es zu einer Reihe von Erscheinungen, die im Gehirn reguliert werden, wie Fieber, „sickness behavior“ oder die Aktivierung der HPA-Achse. Wie gelangen die hierzu erforderlichen Informationen von der Peripherie nun ins Gehirn?

Generell können zwei Kommunikationswege zwischen Peripherie und Gehirn unterschieden werden (Zeisberger 1999, Roth & DeSouza 2001). Einmal ist es der humorale Weg mittels verschiedener Mediatoren, insbesondere Zytokine oder Prostaglandine über die Blutzirkulation, und zum anderen der nervale Weg über afferente Nervenbahnen. Beide Wege sollen hier kurz erläutert werden, das Hauptaugenmerk richtet sich allerdings auf den humoralen Weg, da sich ein Versuchsteil der vorliegenden Arbeit darauf bezieht.

### **1.8.1 Die Blut-Hirn Schranke (BHS)**

Der Sitz der Thermoregulation befindet sich in der präoptischen Region. Diese ist allerdings, wie fast das gesamte Gehirn, von der peripheren Zirkulation weitgehend isoliert und zwar über eine so genannte Blut-Hirn Schranke (BHS).

Die BHS ist eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf. Die Endothelien der Kapillaren sind hier nicht fenestriert, sondern besitzen *tight junctions* (*Zonae occludentes*) (Bradbury 1984). Durch sie können nur Ionen und Substanzen passieren, deren Molekülmasse  $<90$  Da beträgt und deren Radius  $<0,2$  nm ist. Die Ausbildung dieser *tight junctions* wird vor allem durch Astrozyten induziert, die mit ihren Fortsätzen durch „*gap junctions*“ mit den Endothelzellen verbunden sind und so die *Membrana gliae limitans perivascularis* bilden, die fast impermeabel ist. Die BHS dient dazu, das Milieu im Gehirn aufrecht zu halten und es vor dem Übertritt bestimmter Krankheitserreger, Toxine oder Botenstoffe zu schützen. Polare Substanzen können durch das Endothel kaum durch parazellulären Transport ins Gehirn gelangen, unpolare wie beispielsweise Alkohol, Nikotin oder Narkosegase dagegen schon.

### **1.8.2 Die zirkumventrikulären Organe (CVOs)**

Die Zirkumventrikulären Organe (CVOs) sind Regionen des Gehirns, die Kontakt zu dem cerebroventrikulären System besitzen, eine dichte Vaskularisation und eine fehlende Blut-Hirn Schranke aufweisen (Hofer 1958). Folgende Strukturen gehören zu den CVOs: das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), das Subfornicalorgan (SFO), die Area postrema (AP), die Eminentia mediana (ME), die Neurohypophyse (NL), das Organum

subcommissurale (SCO), die Glandula pinealis (PIN, Epiphyse) und die Plexus chorioidei der vier Ventrikel (Mc Kinley et al. 1990, Oldfield & McKinley 1995).

### **1.8.2.1 Die sensorischen CVOs**

Als Untergruppe der CVOs werden die so genannten sensorischen CVOs abgegrenzt, zu denen das OVLT, das SFO und die AP zählen. OVLT und SFO sind im anterioren Anteil des dritten Ventrikels lokalisiert, die AP ist ein Bestandteil des dorsalen vagalen motorischen Komplexes, einem großen viszerosensorischen und autonomen Zentrum der *Medulla oblongata*. Physiologischerweise spielen sie eine Rolle in der Homöostase, indem sie als „Fenster des Gehirns“ über neuronale und humorale Hormone den Flüssigkeitshaushalt, kardiovaskuläre Funktionen und den Blutdruck regulieren (McKinley et al. 1990, Johnson & Gross 1993).

Alle drei Strukturen gelten als Zielregion für inflammatorische Substanzen, seien es endogene oder exogene Pyrogene. Läsionen in der Lamina terminalis führen zu einem vollständigem Ausbleiben eines Fiebers nach Injektion mit LPS (Blatteis et al. 1983).

Dem OVLT kommt im Hinblick auf Fieber aufgrund seiner Lage eine besondere Bedeutung zu, denn es befindet sich in naher Umgebung zur ventromedialen präoptischen Region, die Fieber induziert. Jedenfalls kommt es dort nach LPS Injektion zu einer starken FOS-Immunreaktivität, welches als Marker für aktivierte Neurone verwendet wird (Elmqvist et al 1996). Daher wird dieser Teil der präoptischen Region als eine „pyrogene Zone des Gehirns“ angesehen (Scammell et al. 1996).

### **1.8.3 Die humorale Fieberhypothese**

Man ist sich einig darüber, dass die fieberhafte Veränderung des thermoregulatorischen Sollwertes („set-points“) in der präoptischen hypothalamischen Region stattfindet. Da Zytokine als humorale Mediatoren des Fiebers angesehen werden (Kluger 1991, Zeisberger 1999), stellt sich die Frage, wie diese doch relativ großen (15-25 kDa), hydrophilen Stoffe die Blut-Hirn Schranke passieren können.

Die humorale Fieberhypothese umfasst hierfür mehrere Thesen:

Eine Möglichkeit ist, dass Zytokine die Barriere mit Hilfe eines aktiven Transporters passieren, dies wurde für IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  nachgewiesen (Banks et al. 1995). Allerdings sind diese Transportsysteme sehr schnell gesättigt und haben somit eine geringe Kapazität. Daher spielen sie in der Fieberentstehung keine große Rolle.

Weiterhin könnten Zytokine über aktivierte T-Zellen die BHS passieren, allerdings scheint dieser Weg ebenfalls nur eine nebensächliche Rolle zu spielen (Neumann & Wekerle 1998).

Eine weitere Möglichkeit ist die rezeptorunabhängige Diffusion der Zytokine durch Regionen im Gehirn, denen eine Blut-Hirn Schranke fehlt, den Zirkumventrikulären Organen (Roth et al. 2004b). Alternativ gelangen sie nicht durch die BHS, sondern interagieren mit ihren spezifischen endothelialen (Matsumura und Kobayshi 2004) oder perivaskulären (Schlitz und Sawachenko 2003) Rezeptoren und wirken über second messenger (NO oder Prostaglandine), die dann die BHS passieren. Letzteren beiden Theorien kommt wohl die meiste Beachtung zu. Verschiedene Rezeptoren proinflammatorischer Zytokine werden im Gehirn exprimiert und aktiviert. Hierbei spielt die Expression in den CVOs die größte Rolle.

TNFR I wird konstitutiv im Plexus chorioideus, dem PVN, OVLT, der ME und der AP sowie entlang der Blutgefäße exprimiert, während TNFR II nur im Hippocampus zu finden ist (Nadeau & Rivest 1999). Die Applikation von TNF führt zu einer vermehrten Expression des TNFR I in OVLT, AP und SFO. Anhand von p55 und p75 „knock out“ Mäusen konnte allerdings gezeigt werden, dass der Transport von TNF durch die BHS von beiden Rezeptoren abhängig zu sein scheint (Pan & Kastin 2002). Zentral injizierter TNF ist in der Lage, Mikrogliazellen entlang des Parenchyms zur Expression der Gene für andere proinflammatorische Zytokine zu stimulieren (Nadeau & Rivest 2000).

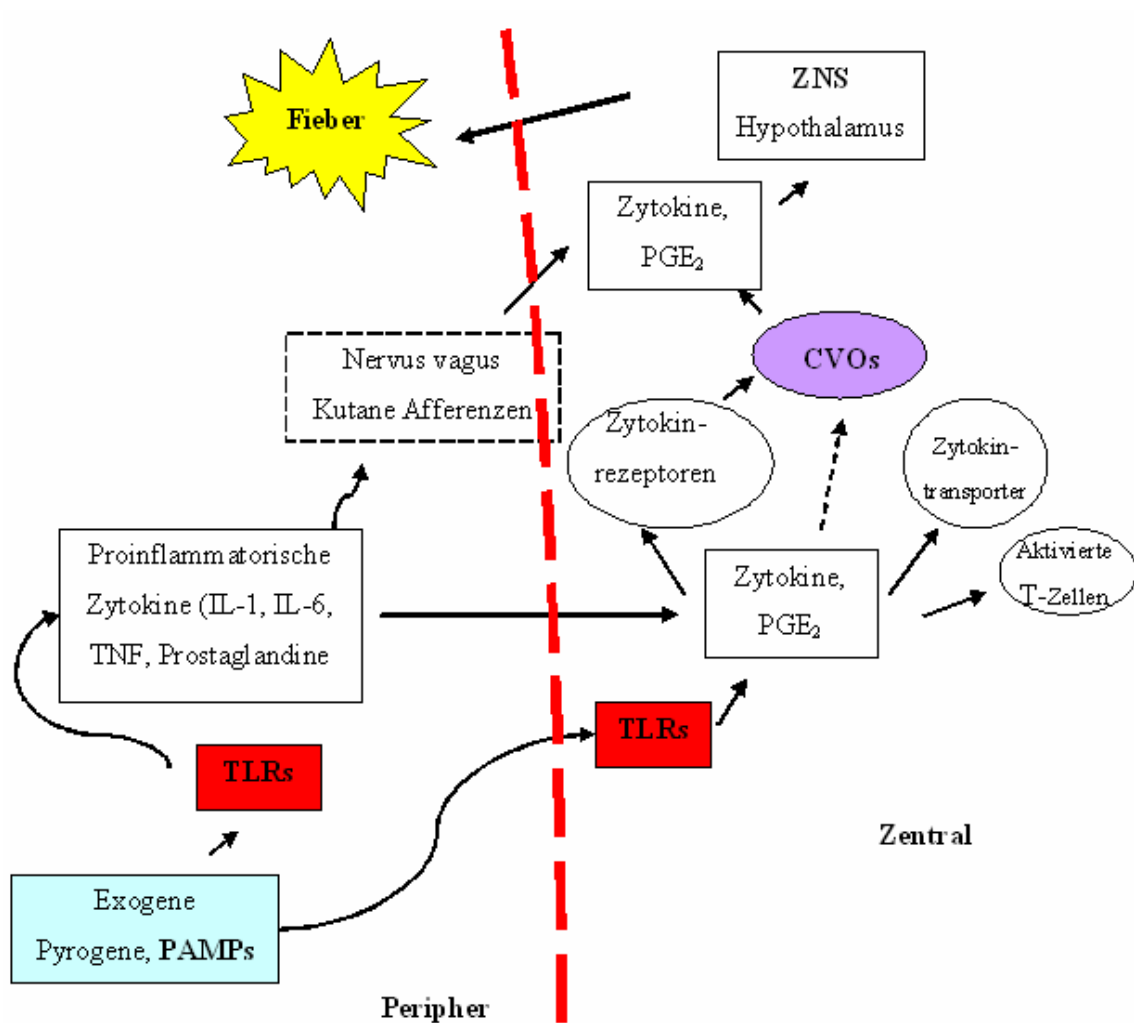
Gp130 wird ebenfalls konstitutiv in OVLT, SFO und AP exprimiert (Vallières & Rivest, 1997), während eine Expression des IL-6R erst nach Stimulation mit einem Pyrogen stattfindet. STAT3 wird als Indikator der IL-6 Aktivierung angesehen und kann mittels Immunhistochemie deutlich nachgewiesen werden. Die intraperitoneale Injektion von IL-6 oder LPS führt in allen sensorischen CVOs zu einer nukleären Translokation von STAT3 bei Ratten (Harré et al. 2002, 2003) und Meerschweinchen (Rummel et al. 2004, 2005). Bei den aktivierten Zellen handelte es sich um Astrozyten und Endothelzellen. Dabei scheint die Menge an zirkulierendem IL-6 mit der Stärke der STAT3 Signale zu korrelieren (Roth et al. 2004b).

Es spricht einiges dafür, dass Zytokine auch lokal im Hypothalamus gebildet werden. So unterscheidet sich beispielsweise die Kinetik systemisch und intrahypothalamisch gemessener TNF- und IL-6-Konzentrationen während eines LPS-induzierten Fiebers wie folgt: Der TNF Spiegel steigt im Blut schnell an und fällt auch relativ bald wieder ab, während sein Peak im Gehirn mit dem Peak des Fiebers korreliert. IL-6 hingegen korreliert im Blut mit der Fieberantwort, während sein intrahypothalamischer Peak schon in der ersten Phase des Fiebers liegt. Zudem können zentrale Injektionen von IL-1 $\beta$ -Antikörpern den Anstieg von IL-6 im Gehirn verhindern, während der Level an systemischem IL-6 unverändert bleibt (Roth et al. 1993, Roth 1998).

TNF- $\alpha$  und IL-6 nehmen direkten Einfluß auf die thermosensitiven Neurone im Hypothalamus, sie führen zu einer Abnahme der Aktivität warm-sensitiver und zu einer Zunahme der Impulsrate kalt-sensitiver Neurone (Xin & Blatteis 1992).

Das Wirkspektrum der Zytokine umfasst allerdings nicht nur pro-, sondern auch anti-inflammatorische Signale. IL-1 $\beta$  ist einer der wichtigsten Stimulatoren bei der Ausschüttung von CRF, welches die Produktion von ACTH bewirkt. Die daraufhin gebildeten Glucocorticoide wirken anti-inflammatorisch und zwar auf der Ebene der Transkription. Sie stimulieren die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ , dem Inhibitor des NF- $\kappa$ B (siehe 1.5.1.1.2). Auch IL-6 und TNF sind in der Lage, die HPA-Achse zu aktivieren (Sharp et al. 1989).

Da die CVOs, der Plexus chorioideus und die Leptomeningen CD14 (Lacroix et al. 1998) und die TLRs 2 und 4 exprimieren (Rivest 2003), ist es prinzipiell auch möglich, dass LPS direkt an den Rezeptoren im Gehirn bindet und dort eine Signalkaskade in Gang setzt (Aderem & Ulevitch 2000). Darüber kommt es dann wahrscheinlich zu einer lokalen Bildung von Zytokinen und Prostaglandinen in den CVOs, die dann zu der POA diffundieren bzw. über ihre Rezeptoren wirken können.



**Abbildung 7: Zusammenfassung der Fieberhypothesen: PAMPs werden in der Peripherie von TLRs erkannt, es kommt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen. Diese gelangen ins Gehirn und überwinden dort über verschiedene in 1.8.3 beschriebene Mechanismen die Blut-Hirn Schranke. Es kommt außerdem zu einer lokalen Produktion dieser Mediatoren. Sie können zudem über einen nervalen Weg Signale zum ZNS übermitteln. PAMPs können wahrscheinlich auch direkt an die TLRs im ZNS binden.**

#### 1.8.4 Die nervale Fieberhypothese

Neben den humoralen Signalwegen, die zur Entstehung von Fieber führen, gibt es noch einen nervalen. Hier spielt vor allen der *Nervus vagus* eine entscheidene Rolle. Die Aktivierung afferenter Nerven durch Zytokine oder andere Mediatoren stellt eine sehr schnelle Möglichkeit der Signalübertragung des peripheren Immunsystems ins Gehirn dar (Dantzer

2001). Schon vor dem Erscheinen von signifikant erhöhten Zytokinspiegeln im Blut, kommt es bei LPS Stimulation zu einem ersten Fieberanstieg. Dies spricht dafür, dass die erste Fieberphase von LPS eher neural als humoral gesteuert wird (Blatteis 2006). Es konnte gezeigt werden, dass vagale sensorische Neurone Rezeptoren für IL-1 $\beta$  und PGE<sub>2</sub> exprimieren (Ek et al. 1998). Viele Studien wurden an vagotomierten Tieren durchgeführt und konnten zeigen, dass diese Tiere nach Stimulation mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen eine Abschwächung oder gar Unterdrückung der unter normalen Umständen hervorgerufenen Symptome wie „sickness behavior“ (Konsman et al. 2000), Fieber (Sehic & Blatteis 1996) oder ein Ausbleiben der Aktivierung der HPA-Achse (Gaykema et al. 1995) zeigten. Dies ist allerdings abhängig von der Konzentration und dem Injektionsort. Vagale Afferenzen werden in erster Linie von dem entsprechenden Pyrogen in der Bauchhöhle stimuliert. Bei Injektion eines Pyrogens direkt in die Blutbahn kann eine Vagotomie Fieber nur dann verhindern, wenn die Konzentration so gering ist, dass das Pyrogen vollständig in der Leber gebunden bzw. aufgenommen wird, denn in hohen Konzentrationen wird zusätzlich der klassische humorale Weg eingeleitet. Bei der intramuskulären Injektion von LPS oder MDP entwickeln vagotomierte Tiere normales Fieber (Goldbach et al. 1997). Die Vagotomie verhindert die Fieberreaktion auf eine zentrale Stimulation mit PGE<sub>2</sub> ebenfalls nicht (Sugimoto et al. 1999). Eine Beteiligung kutaner afferenter Fasern an der Manifestation von Fieber und dem „sickness behavior“ wird diskutiert (Zeisberger 1999, Rummel et al. 2004). Die Injektion von LPS zusammen mit einem Lokalanästhetikum in eine subkutane Kammer konnte die Fieberreaktion deutlich abschwächen (Ross et al. 2000). Im *Nucleus tractus solitarius* (NTS) enden die afferenten vagalen Nervenfasern, von wo über den Botenstoff Noradrenalin das inflammatorische Signal an die Präoptische Region weitergeleitet wird, in der es dann zur Ausschüttung von PGE<sub>2</sub> und der Entstehung von Fieber kommt (Sehic & Blatteis 1996). Eine Hypothese von Blatteis (2006) beinhaltet die Aufnahme von LPS in Kupfferzellen der Leber, was zu einer sofortigen Aktivierung des Komplementsystems führt. Dessen Faktor C5a stimuliert dann wiederum die Kupfferzellen zur Ausschüttung von PGE<sub>2</sub>, welches vagale sensorische Fasern zum NTS direkt zu stimulieren scheint.



## **1.9 Das Phänomen der Toleranzentwicklung gegenüber Pyrogenen**

Die mehrmalige Applikation eines Pyrogens führt, je nach Pyrogen, zur Abschwächung verschiedener von ihm selbst hervorgerufener Reaktionen des Körpers, wie z.B. eine Abschwächung oder gar Unterdrückung des Fiebers, ein Ausbleiben des „sickness behavior“ oder auch die Unterdrückung der Bildung von Zytokinen. Diese so genannte Toleranzentwicklung soll hier im Hinblick auf exogene und endogene Pyrogene näher betrachtet werden.

### **1.9.1 Das Phänomen der Endotoxintoleranz**

Dieses Phänomen wurde schon 1947 von Beeson beschrieben. Es beschreibt ein durch Applikation subletaler Endotoxindosen refraktäres Stadium gegenüber dem Endotoxin.

Man unterscheidet zwei Phasen der Endotoxintoleranz (Greisman et al. 1966). Die erste Phase entwickelt sich rasch nach einer einzelnen LPS Injektion und führt dann zu einer Kreuztoleranz zwischen den LPS verschiedener bakterieller Spezies. Diese Toleranz ist transient und ist Lipid A unabhängig. Die zweite Phase der Endotoxintoleranz ist eine immunologische, d.h. sie beruht auf der Bildung spezifischer Antikörper gegen die O-spezifische Seitenkette. Deshalb gibt es in diesem Stadium auch keine Kreuztoleranz zwischen den antigenetisch unterschiedlichen LPS Formen verschiedener Bakterien. Im Weiteren soll allerdings nur die erste Phase betrachtet werden.

Die wiederholte Applikation von LPS gramnegativer Bakterien führt bei vielen Versuchstieren und beim Menschen zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 und somit auch zu einer Abschwächung der Pathomechanismen, die durch diese induzierte Zytokine ausgelöst werden (Zuckermann & Evans 1992, Roth et al. 1994, van der Poll et al. 1996). Nicht nur das Fieber wird bei wiederholter Exposition mit einem Pyrogen abgeschwächt, sondern auch verschiedene Merkmale des „sickness behavior“ wie Anorexie, Adipsie, Gewichtsverlust und Aktivitätsverlust. Neben der systemischen reduziert sich auch die intrahypothalamische Aktivität von IL-6 bei Endotoxin-toleranten Meerschweinchen, was wahrscheinlich auf das verminderte Signal aus der Körperperipherie zurückzuführen ist (Roth et al. 1994). Im Zuge der verminderten Bildung proinflammatorischer Zytokine im Laufe der LPS-Toleranz kommt es anscheinend auch zu

einer vermehrten Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine (Tripp et al. 1998). Die Entstehung der LPS-Toleranz ist ein Zusammenspiel mehrere Faktoren wie der Zytokin-Regulierung, einem negativen Feedback durch Kortikoide, inhibitorischer Zytokine oder einer vermehrten Aktivierung des RES (Mengozi und Ghezzi 1993).

Inwieweit sich die LPS-Toleranz ausprägt, hängt von mehreren Faktoren ab: der untersuchten Tierart, der LPS-Dosierung, der Art der LPS-Applikation und dem zeitlichen Abstand zwischen den Stimulationen. Wird ein bestimmter Zeitraum zwischen der LPS-Konfrontation überschritten, bleibt eine Toleranz entweder aus oder hebt sich wieder auf (Zeisberger & Roth 1998).

Zuckerman und Evans beschreiben 1992, dass peritoneale Makrophagen von LPS-toleranten Mäusen eine Abnahme der LPS induzierten mRNA von IL-1 $\beta$  und TNF zeigen. Freudenberg & Galanos (1988) schreiben den Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Toleranzentwicklung zu, was aufgrund deren Fähigkeit, eine Reihe proinflammatorischer Zytokine zu synthetisieren, einleuchtend erscheint.

Dass die Unterdrückung der Produktion endogener Pyrogene in der Endotoxin-Toleranz eine entscheidende Rolle spielt, konnte dadurch gezeigt werden, dass die zweite Phase der Fieberantwort bei LPS-toleranten Tieren (fünf LPS-Injektionen im Abstand von drei Tagen) nach einer systemischen Infusion mit TNF- $\alpha$  fast vollständig unterdrückt wurde (Roth & Zeisberger 1995). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Down-Regulierung der TNF-Rezeptoren, da eine längerfristige Konfrontation von Makrophagen und Monozyten nicht nur zu einer Abnahme an Rezeptoren für LPS selbst, sondern auch für TNF- $\alpha$  und andere Zytokine gezeigt werden konnte (Chaby & Girard 1993).

NF- $\kappa$ B, der als Transkriptionsfaktor durch LPS aktiviert wird, liegt normalerweise als Heterodimer aus einer 50 kDa und einer 65 kDa Untereinheit vor. In LPS toleranten Zellen allerdings liegt NF- $\kappa$ B als Homodimer aus zwei 50 kDa Untereinheiten vor (Ziegler-Heitbrock 1994). Dies führt zu einer Veränderung der in den Zellen aktivierten Gene, es kommt folglich zu einer verminderten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (TNF) und im Gegenzug zu einer vermehrten Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10) (Frankenberger et al. 1995). Die Toleranz gegenüber LPS scheint allerdings nicht mit einer verminderten Produktion von PGE<sub>2</sub> einherzugehen, sondern eher mit einer veränderten Antwort des PGE<sub>2</sub> Rezeptors EP3 auf PGE<sub>2</sub> (Chemo et al. 1997).

Studien belegen, dass es bei der wiederholten Konfrontation mit LPS zu einer kurzzeitigen verminderten Expressierung des für LPS spezifischen Rezeptorkomplexes TLR4-MD-2

Komplexes auf Makrophagen kommt (Sato et al. 2000, Nomura et al. 2000). Andere Studien zeigten jedoch, dass eine verminderte Antwort von Zellen auf LPS von der Expression der TLRs unabhängig ist (Medvedev et al. 2001).

Auch die in die Signalkaskade involvierten Proteine IRAK-1, IRAK-M (Kobayashi et al. 2002) und SOCS (Rakesh & Agrawal 2005) scheinen eine Rolle bei der Endotoxin-Toleranz zu spielen, indem sie - meist allerdings nur kurzzeitig - herunterreguliert werden. SOCS wird von Zytokinen selbst oder von TLR Liganden wie LPS induziert. SOCS-1 defiziente Mäuse sind hyporesponsiv auf einen Endotoxin-Schock und entwickeln nur eine unvollständige Toleranz (Nakagawa et al. 2002). Kürzlich publizierte Forschungsergebnisse schreiben ST2, einem hemmenden Protein in der TLR Signalkaskade, eine Bedeutung bei der Toleranzentwicklung zu (Brint et al. 2004), da ST2 defiziente Mäuse keine Endotoxin-Toleranz entwickeln konnten.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass keiner der genannten Mechanismen für sich alleine wirkt, sondern die Entstehung der Toleranz ein Zusammenspiel vieler einzelner Vorgänge ist.

### **1.9.2 Toleranzentwicklung gegenüber anderen exogenen Pyrogenen**

Die Toleranzentwicklung gegenüber anderen exogener Pyrogenen ist weit weniger gut untersucht als die LPS-Toleranz. Neben der Endotoxintoleranz gibt es auch noch das Phänomen der Kreuztoleranz zwischen Pyrogenen. Da die Injektion von LPS zum Schutz vor einem septischen Schock im Patienten mit vielen Risiken verbunden ist, hat man viele „harmlosere Stoffe“ eingesetzt um eine eventuelle Kreuztoleranz hervorzurufen.

Für das aus der Zellwand grampositiver Bakterien stammende Muramyldipeptid (MDP) beispielsweise wird eine Toleranz nur teilweise entwickelt. MDP ist in der Lage, eine Akut-Phase Reaktion und die Produktion von Zytokinen zu induzieren (Roth et al. 1997b) und entwickelt auf wiederholte Injektionen eine Toleranz bezüglich der zweiten Fieberphase (Soszynski et al. 1991), allerdings ist die Produktion von IL-6 und TNF davon offensichtlich kaum beeinflusst (Roth et al. 1997a).

Es stellte sich auch keine Kreuztoleranz zwischen LPS-toleranten Tieren und MDP bezüglich der Fieberentstehung und der Produktion von TNF und IL-6 heraus, weder im Kaninchen (Soszynski et al. 1991), noch im Meerschweinchen (Roth et al. 1997a). Im Fall von MDP scheinen also die Zytokine nur eine Nebenrolle in der Toleranzentwicklung zu spielen,

sondern eher andere in 1.9.1 beschriebene Mechanismen von Bedeutung zu sein. Zytokine werden auch nach Stimulation eines LPS-toleranten Tieres mit einem anderen Pyrogen trotzdem noch gebildet (Mengozi und Ghezzi 1993).

Das exogene Pyrogen PI:PC (Polyinosinic:Polycytidylic) als Modell viraler Infektionen zeigt die Eigenschaften eines exogenen Pyrogens in verschiedenen Spezies (Soszynski et al. 1991, Voss et al. 2006). Bei wiederholter Konfrontation mit dem Agens im Kaninchen (Soszynski et al. 1991) entwickelt sich keine Toleranz, und nur eine partielle im Meerschweinchen (Cooper et al. 1988, Voss et al. 2006).

Die fehlende oder transiente Toleranz gegenüber diesen genannten Pyrogenen spricht dafür, dass sie über unterschiedliche Rezeptoren und teilweise auch unterschiedliche Signalkaskaden gesteuert werden im Vergleich zu LPS.

Für MALP-2 gibt es erst zwei *in vivo*-Studien, die eine Toleranzentwicklung gegenüber dieser Substanz als möglich erscheinen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von Mäusen mit MALP-2 zwar protektiv auf eine letale Dosis TNF- $\alpha$  wirkt, allerdings nicht auf eine letale Dosis LPS (Deiters et al. 2003); dies bestätigt, dass es zwar zu einer Downregulierung der TNFRs kommt, MALP-2 und LPS aber verschiedenen TLRs und Signalwege regulieren. Die Vorbehandlung von Mäusen mit MALP-2 und anschließender Induktion einer Peritonitis führte zu einer abgeschwächten Bildung von IL-12, IL-10 und TNF sowohl systemisch als auch lokal, die allerdings nicht mit einer Downregulierung der TLRs 1,2,6 oder 4 zusammenhing, sondern mit der vermehrten Expression von ST2, einem hemmendem Protein der TLR-Kaskaden. (Feterowski et al. 2005). Die zweimalige Behandlung von Makrophagen mit MALP-2 führte bei der wiederholten Stimulation zu einer Hyporesponsibilität, wie bei LPS. Außerdem zeigten die vorbehandelten Zellen eine abgeschwächte Bildung an TNF- $\alpha$  (Sato et al. 2000). Mit MALP-2 vorbehandelte Zellen zeigten außerdem bei Gabe von LPS eine deutlich verminderte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der c-Jun Kinase, allerdings kommt es nicht zu einer Reduktion der Expression des TLR4-MD2 Komplexes oder CD14, im Gegenteil: TLR4 wird eher hochreguliert. Zumindest bei den Untersuchungen an isolierten Zellen scheint eine vorherige Stimulation mit MALP-2 die Reaktivität gegenüber LPS zu beeinflussen. Dieses Phänomen scheint über eine Modulation des Signalweges zu laufen, nicht über die vermindert Expression des Rezeptors und seiner Kofaktoren (Sato et al. 2000). Die Vorbehandlung mit MALP-2 scheint den MyD88 abhängigen Signalweg zu beeinflussen indem es die IRAK1-Aktivierung hemmt, allerdings beeinflusst es scheinbar nicht den MyD88 unabhängigen Signalweg (Sato et al. 2002).

Ob es gegenüber FSL-1 eine Toleranzentwicklung bzw. Kreuztoleranz mit LPS *in vivo* gibt, sollte in der vorliegenden Arbeit am Tiermodell Meerschweinchen untersucht werden.

### **1.9.3 Toleranzentwicklung gegenüber endogenen Pyrogenen**

Entsprechend der Toleranzentwicklung gegenüber LPS gibt es auch eine „TNF- $\alpha$ -Toleranz“, d.h. wiederholte intraarterielle Infusionen von TNF- $\alpha$  im Abstand von drei Tagen führten zu einer Abschwächung der Fieberantwort beim Meerschweinchen (Goldbach et al. 1996b).

Bei systemisch mit TNF vorstimulierten Tieren wurde lediglich die erste Fieberphase nach LPS Injektion etwas abgeschwächt, allerdings waren die zirkulierenden Level an TNF nicht verändert (Roth et al. 1996), bei TNF intrazerebral vorstimulierten Tieren führte eine LPS i.m. Injektion zu keiner Abschwächung (Goldbach et al. 1996a). Wird TNF mehrmals intrazerebral in den lateralen Ventrikel injiziert, entsteht keine Toleranz (Goldbach et al. 1996a), d.h. die entstehende Toleranz nach systemischer Applikation von TNF- $\alpha$  entwickelt sich nicht innerhalb der Blut-Hirnschranke.

Bei Endotoxin-toleranten Meerschweinchen führte eine Injektion mit TNF hingegen zu einer vollständigen Unterdrückung der zweiten Fieberphase (Roth & Zeisberger 1995), während der Spiegel an gemessenem TNF gleich blieb- dies spricht für eine verminderte Ansprechbarkeit der Rezeptoren auf TNF.

IL-1 $\beta$  wird als der wichtigste Mediator des LPS-Fiebers angesehen, was durch verschiedenen anti-IL-1 $\beta$  Studien gezeigt werden konnte (Kluger 1991). Die Stimulation mit humanem IL-1 $\beta$  führte im Kaninchen zu Toleranz (Yamashiro et al 1993), die wiederholte Stimulation mit speziesspezifischen IL-1 $\beta$  konnte in der Ratte allerdings keine Toleranz auslösen und führte zu gleich bleibenden IL-6 Plasmaspiegeln (Tripp et al. 1998).

### **1.10 Ziele und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die potenziell fiebererzeugenden Eigenschaften von FSL-1 zu charakterisieren und die Mechanismen, die einer pyrogenen Wirkung dieser Substanz zugrunde liegen, aufzuklären.

Hierzu sollte untersucht werden, ob intraarterielle oder intraperitoneale Behandlung mit FSL-1 *in vivo* am Tiermodell Meerschweinchen die klassischen zentralnervös kontrollierten

Krankheitssymptome der Akut-Phase-Reaktion wie Fieber, Anorexie und Apathie hervorruft. Dies sollte anhand von bestimmten messbaren Parametern bestimmt werden, nämlich einmal der Körperkerntemperatur sowie der Konzentration von Zytokinen im Blut, im speziellen handelt es sich um Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor (TNF). Des Weiteren sollte überprüft werden, ob diese Effekte über FSL-1 selbst oder über die Bildung körpereigener Botenstoffe des Immunsystems (Zytokine) vermittelt werden.

Eine mögliche zentrale Bedeutung von TNF bei der FSL-1 induzierten Fieberreaktion sollte durch vollständige Neutralisierung des durch FSL-1 induzierten endogenen TNFs mittels eines TNF-Bindungsproteins (löslicher TNFR I) untersucht werden.

Außerdem sollte ermittelt werden, inwieweit das durch FSL-1 erzeugte Fieber Prostaglandin abhängig ist, wie es für andere exogene Pyrogene nachgewiesen wurde. Hierzu wurde ein COX-Hemmstoff, in diesem Fall handelt es sich um Diclofenac, in Kombination mit FSL-1 injiziert und es wurde überprüft, wie sich diese Behandlung auf das induzierte Fieber und die zirkulierenden Zytokin-Werte auswirkt. Bei diesen Versuchen wurde zusätzlich PGE<sub>2</sub> im Blut gemessen werden, um den Einfluss der Diclofenac-Behandlung auf die Bildung dieses wichtigen Fiebermediators zu erfassen.

Mit Hilfe molekular-neuroanatomischer Ansätze sollten die indirekten über FSL-1 stimulierten Angriffspunkte (Zytokin Rezeptoren, in diese Arbeit IL-6) im Gehirn identifiziert werden. Hierzu wurde als Parameter die nukleäre Translokation Zytokin-spezifischer Transkriptionsfaktoren herangezogen. Es handelt sich hierbei um STAT3, der mit Hilfe der Immunhistochemie in den fieberrelevanten Strukturen im Gehirn nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe dieser Methode sollten auch die aktivierten Zelltypen im Gehirn charakterisiert werden. Hierfür wurden spezifische Zellmarker, nämlich GFAP für Astrozyten, NeuN für Neurone und vW-Faktor für Endothelzellen eingesetzt.

Schließlich sollte überprüft werden, ob es bei wiederholten Applikationen von FSL-1 – wie bei LPS – zur Ausbildung einer Toleranz kommt. Darüber hinaus galt es zu analysieren, ob sich *in vivo* eine Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS, dem „klassischen“ exogenen Pyrogen, manifestierte.

In erster Linie sollten in dieser Arbeit mögliche Mechanismen zur Krankheitsentstehung aufgeklärt werden, die durch die Infektion eines Organismus mit Mycoplasmen entstehen.

Die Charakterisierung des FSL-1 als Pyrogen und dessen induzierte Mechanismen dienen zum besseren Verständnis der Interaktion von Mycoplasmen mit Zellen des Immunsystems und somit ihrer Pathogenese und der klinischen Manifestation.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Glatthaar-Meerschweinchen der Gattung *Cavia aperea porcellus*. Sie entstammten ausschließlich der institutsinternen Zucht. Für die telemetrischen *in vivo* Versuche wurden Tiere mit einem Gewicht zwischen 380 und 460 g gewählt, für die Perfusion und anschließende Immunhistologie wogen die Tiere maximal 550 g. Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da man so eventuelle zyklusbedingte Temperaturschwankungen der weiblichen Tiere ausschließen konnte. Die Meerschweinchen wurden im Zuchtstall in Gruppen von bis zu vier erwachsenen Tieren bzw. bis zu sechs abgesetzten Jungtieren nach Geschlechtern getrennt gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug konstant  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Die Boxen waren ca. 157 x 57 x 20 cm (Länge x Breite x Höhe) groß. Die Tiere erhielten Heu und Kraftfutter (Fa. Altromin GmbH & Co.KG, D-Lage) und ihnen stand Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Für die Versuche wurden die Tiere einzeln in transparente 42 x 26,5 x 15 cm große Polycarbonat Standardkäfige (Fa. Ehret GmbH, D-Emmendingen) umgesetzt und unter gleichen Futter- und Wasserbedingungen wie die Zuchttiere gehalten, allerdings wurden sie am Tag des Versuchs erst abends mit Heu versorgt um so einen aktivitätsbedingten Temperaturanstieg zu vermeiden. Der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich adspektorisch überprüft. Als Einstreu der Käfige wurde Altromin Animal-Bedding (Altromin GmbH & Co.KG, D- Lage) verwendet. Sowohl im Stall als auch in den Versuchsanlagen wurde ein 12-Stunden-hell-dunkel- Rhythmus eingehalten. Die Tiere wurden 7-10 Tage vor Versuchsbeginn operiert und in diesem Zeitraum an die Haltungsbedingungen im Versuchsraum (Telemetrie) gewöhnt. Für jede Versuchsreihe wurden in der Regel  $n = 5-7$  Tiere verwendet, für die Immunhistologie lag die Zahl der Tiere bei  $n = 3-4$ .

Die Tierversuche wurden von der lokalen Tierschutzkommission (Projektnummer GI 18/2 – Nr. 59/2003) genehmigt.

### 2.1.2 Verwendete Geräte

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

Brutschrank Nuair<sup>TM</sup> US-Autoflow (Nuair, Plymouth, MN, USA)

Digitale schwarz-weiß Kamera (Spot Insight, Diagnostic Instruments–Visitron–Systems, D-Puchheim) und zugehörige Software (Spot Insight Software, Diagnostics Instruments, Michigan, USA)

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

Elisa-Reader Digiscan (Asys Hitech, A-Eugendorf)

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, D-Hamburg)

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

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

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

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

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

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

Pipettierhelfer Easypet (Eppendorf AG, D-Hamburg)

Telemetrieanlage zur stressfreien Aufzeichnung der Körperkerntemperatur bei Kleinsäugetieren  
(Respironics Inc–MiniMitter, Bend, OR, USA)

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

Tischzentrifuge MicroV (Fisher Scientific, D-Schwerte)

Schermaschine Typ GH 004 (Aesculap, D-Tuttlingen)

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

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

Waage zum Wiegen der Tiere: Sartorius universal (Sartorius AG, D-Göttingen)

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

Ultraschall-Wasserbad, Bandelin Sonorex RK100 (H.Kretschmer, D-Gießen)



### **2.1.3 Ge- und Verbrauchsmaterial**

#### **2.1.3.1 Medikamente**

Aluminiumspray (Albrecht, D-Aulendorf)

Atipamezolhydrochlorid (Antisedan<sup>®</sup>, Pfizer GmbH, D-Karlsruhe)

Heparin-Natrium 25000 ratiopharm<sup>®</sup> (ratiopharm GmbH, D-Ulm)

Meloxicam (Metacam<sup>®</sup> Suspension zum Eingeben, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, D-Ingelheim/Rhein)

Medetomidin (Cepetor<sup>®</sup> KH, cp-pharma GmbH, D-Burgdorf)

Ketaminhydrochlorid (Ketamin<sup>®</sup> 10%, ESSEX Pharma GmbH, D-München)

Lidocainhydrochlorid (Xylocain<sup>®</sup> 2%, AstraZeneca GmbH, D-Wedel)

Pentobarbital-Natrium (Narcoren<sup>®</sup>, Merial GmbH, D-Hallbergmoos)

Vidisic<sup>®</sup>-Augengel (Dr. Mann Pharma, D-Berlin)

#### **2.1.3.2 OP und OP Vorbereitung**

Cutasept<sup>®</sup> Händedesinfektionsmittel (Bode Chemie, D-Hamburg)

Instrumenten-Desinfektionsmittel Konsolex<sup>®</sup> AF (Bode Chemie, D-Hamburg)

Nahtmaterial, resorbierbar: Surgicryl, USP 3/0, EP 2 (SMI AG, Hünningen, Belgien)

Nahtmaterial, nicht resorbierbar: Dermafil, USP 2/0, EP 3 (SMI AG, Hünningen, Belgien)

Operationsbesteck (Aesculap AG & Co.KG, D-Tuttlingen)

Silkafix<sup>®</sup> 2,5 cm x 9,2 m (Lohmann Rauscher International GmbH & Co.KG, D-Rengsdorf)

Sterile Einmalspritzen, 1 ml, BD Plastipak<sup>®</sup> (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien)

Sterile Einmalkanülen ø 0,45 x 12 mm, 26G x ½" Sterican<sup>®</sup> (Braun Melsungen AG, D-Melsungen)

Sterile Schlinggazetupfer 6 x 9 cm (Weisweiler GmbH & Co.KG, D-Münster)

Skalpellsklingen (Rüttgers GmbH & Co.KG, D-Solingen)

Veet Enthaarungscreme (Reckitt Benckiser, D-Mannheim)

Visistat<sup>®</sup> Hautklammergerät (Teleflex Medical GmbH, D-Kernen)

Zellstoff ungebleicht 40 x 60 cm (ZVG Zellstoff Vertriebs GmbH, D-Troisdorf)

Zellstofftupfer Pur-Zellin<sup>®</sup> (Paul Hartmann, AG, D-Heidenheim)

### **2.1.3.3 Bioassays**

Gewebekulturflaschen, steril mit Filter: 50 ml, 75 ml, 250 ml, 550 ml (Greiner Bio-One GmbH, A-Kremsmünster)

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

PS-Röhrchen, steril: 3,5 ml, 12 ml, 15 ml, 50 ml (Greiner Bio-One GmbH, A-Kremsmünster)

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

### **2.1.3.4 Immunhistochemie**

Alufolie (Roth Laborbedarf, D-Karsruhe)

Deckgläschen 24 x 50 mm (Menzel GmbH & Co.KG, D-Braunschweig)

Einmalhandschuhe N-Dex<sup>®</sup> (Best Manufacturing Company, Menlo GA, USA)

Eppendorfgefäß, Reaktionsgefäße 3810, 1,5 ml (Fa Eppendorf-Natheler-Hinz-GmbH, D-Hamburg)

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

Färbegestell für 25 Objektträger (Brand GmbH & Co.KG, D-Wertheim)

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

Inkubationskästen mit Deckel 20 x 30 x 5 cm (Biochem Instrumente GmbH, D-Weilburg)

Labortücher Kimtech Science (Kimberley-Clark Europe Limited, Reigate, England)

Objektträger, 76 x 26 mm (Menzel GmbH & Co.KG, D-Braunschweig)

Objektträgermappen für 20 Objektträger (LAT-Labor- und Analysen-Technik GmbH, D-Garbsen)

Parafilm<sup>®</sup> (Roth Laborbedarf, D-Karlsruhe)

Perfusionskanüle ø 120 x 40 mm, 18G x 1½" Sterican<sup>®</sup> (Braun Melsungen AG, D-Melsungen)

pH Indikatorpapier (Merck, D-Darmstadt)

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

Plexiglasplatten 0,5 x 6,5 x 28,5 cm (W.G. Kerkhoff Institut, D-Bad Nauheim)

Reaktionsgefäßständer (Roth Laborbedarf, D-Karlsruhe)

Schraubdeckeldosen, unsteril, 40 ml (Roth GmbH, D-Karlsruhe)

Trockeneis (Balsler, D-Lich)

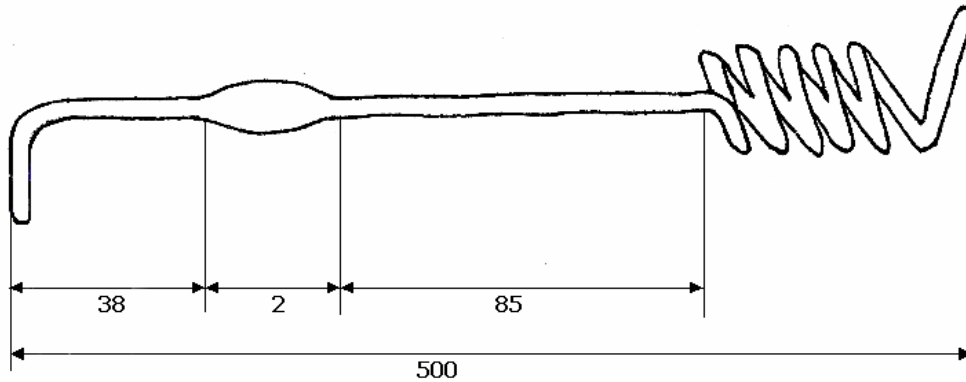
#### **2.1.4 Der intraperitoneale Sender**

Zur telemetrischen Erfassung der Körperkerntemperatur wurden den Tieren intraperitoneale Sender (Transmitter, PDT-4000 E-Mitter<sup>®</sup>, Respirationics Inc–MiniMitter, Bend, OR, USA) implantiert. Diese zylinderförmigen Sender hatten ein Gewicht von 1,6 g, ein Volumen von 1,33 cm<sup>3</sup> und waren 23 x 8 mm groß. An der Außenhülle war eine Silikonöse angebracht, durch die die Sender an der Bauchwand fixiert werden konnten. Die Sender erhielten ihre Energie über die Induktion einer eingebauten Kupferspirale, eine Batterie war also nicht von Nöten. Sie besaßen in ihrem Inneren einen wärmeempfindlichen Transistor, einen sogenannten Thermistor mit einem negativen Temperaturkoeffizienten (NTC). Proportional zur Temperaturänderung veränderte sich auch das Radiofrequenzsignal des Senders. Bei einem Anstieg der Temperatur erhöhte sich die Impulsrate und umgekehrt. Die abgegebenen Frequenzsignale (Frequenz in Herz (Hz)) wurden von einer Empfängerplatte (56 x 29 x 7 cm) (ER-4000 Receiver, Respirationics Inc–MiniMitter, Bend, OR, USA), auf der die Käfige der Versuchstiere platziert waren, aufgefangen und an ein Datenerfassungssystem (Vital View, Respirationics Inc–MiniMitter, Bend, OR, USA) weitergeleitet und aufgezeichnet.

#### **2.1.5 Der intraarterielle Katheter**

Zur Herstellung des intraarteriellen Katheters (Abbildung 8) wurde ein Mikro-Schlauch aus Polyethylen (PE-10, Ref. 800/140/100, Fa. Portex Ltd, Kent, England) verwendet. Dieser Schlauch hatte einen Innendurchmesser von 0,04 mm und einen Außendurchmesser von 0,08 mm. Er wurde an einer Stelle durch eine Drahtschleife gelegt, die durch eine angelegte Spannung glühte (Stromversorgungsgerät, Rohde & Schwarz International GmbH, D-München) und somit wurde der Schlauch kurzzeitig erhitzt. An dieser Stelle entstand eine Blase, die maximal 2 mm lang war. Von dieser Blase abgemessen betrug die Länge des Katheters in die eine Richtung 38 mm, in die andere 85 mm. Das kürzere Stück wurde auf ein gebogenes dünnes Drahtstück gesteckt und durch Erwärmen im Wasserbad und rasches Abkühlen in eine abgewinkelte Form gebracht. Die andere Seite wurde am Ende des geraden

Stücks auf eine 1 ml Spritze gewickelt, ebenfalls erwärmt und abgekühlt und erhielt so ein spiralförmiges Aussehen. Die Länge der auseinander gezogenen Spirale betrug zwischen ca. 30 bis 50 cm.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des intraarteriellen Katheters zur Blutentnahme beim Meerschweinchen (nicht maßstabsgetreu): Angabe der Maße in mm.**

## 2.1.6 Verwendete Substanzen für die *in vivo*-Versuche

### 2.1.6.1 NaCl

Es handelt sich hierbei um physiologische 0,9%ige Kochsalzlösung (Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9%, Braun Melsungen AG, D-Melsungen). Sie wurde als Kontrolle für die Injektionen von LPS und TNFbp eingesetzt, da sie als Lösungsmittel hierfür verwendet wurde. Sie wurde immer in derselben Menge (1 ml/kg) wie die zu testende Substanz injiziert.

### 2.1.6.2 PBS

Der Phosphatpuffer (PAA Laboratories GmbH, A-Pasching) wurde in Portionen von 10 ml und 1 ml aliquotiert und bei  $-40^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Er diente als Lösungsmittel für FSL-1 und wurde folglich als Kontrolle hierfür injiziert.

### **2.1.6.3 Solvent**

Bei dem Lösungsmittel für Diclofenac handelte es sich um ein Gemisch aus 95% NaCl und 5% siebzigprozentigem Ethanol.

### **2.1.6.4 Heparin**

Das in der gebrauchsfertigen Heparin-Natrium-25000-ratiopharm- Injektionslösung enthaltene Heparin gehört in die Stoffgruppe der Antikoagulantien. Seine gerinnungshemmende Wirkung beruht auf der Bindung an Antithrombin III, ein Enzym, das aktivierte Gerinnungsfaktoren hemmt. Um zu verhindern, dass Blut in den Kathetern gerinnt, wurden sie alle drei Tage mit 0,2 ml eines Heparin- NaCl- Gemischs im Verhältnis 1:6 gespült. Die Gerinnung der gewonnenen Blutproben wurde durch Zugabe von 5 µl Heparin auf 500 µl Blut verhindert.

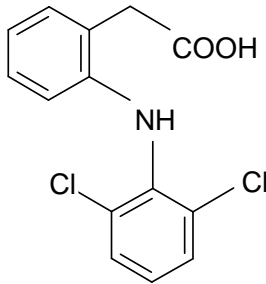
### **2.1.6.5 Ethanol**

Da reines Ethanol Restwasser enthält, wird dieses durch Trocknung entzogen und man erhält absolutes Ethanol (Ethanol absolut, Lösungsvermittler (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) RdH Laborchemikalien GmbH & Co.KG, D-Seelze). Durch die Hydroxylgruppe ist Ethanol polar, somit gut wasserlöslich und wird daher oft als Lösungsmittel für verschiedene Stoffe genutzt. Das Ethanol wurde mit Wasser verdünnt um eine Endkonzentration von 70% zu erreichen. Es wurde zum Lösen von Diclofenac und zur Desinfektion der unsterilen Katheter eingesetzt.

### **2.1.6.6 Diclofenac**

Diclofenac (Diclofenac Sodium, Lot B19360, Calbiochem-Novabiochem Cooperation, La Jolla, CA, USA) ist ein Arzneistoff aus der Wirkstoffgruppe der Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID). Diese besitzen antipyretische, analgetische und antiphlogistische Eigenschaften. Verantwortlich hierfür ist eine unspezifische Hemmung der Enzyme Cyclooxygenase 1, 2 und 3 (COX-1, COX-2 und COX-3) und damit einer Inhibition

der Synthese von Prostaglandinen und Thromboxan. Die Cyclooxygenasen unterscheiden sich darin, in welchen Zellen sie vorkommen und ob sie konstitutiv gebildet werden oder induzierbar sind (1.7.1).



**Abbildung 9: Strukturformel von Diclofenac**

Diclofenac (Abbildung 9) gehört zu den heteroaromatisch substituierten Essigsäuren und besitzt eine sehr hohe Bioverfügbarkeit von über 90%. Zudem weist es eine hohe Eiweißbindung an Serumproteine (99,7%), vor allem an Albumin (99,4%) auf.

Die Wasserlöslichkeit von Diclofenac ist eher begrenzt, daher wurde dem Lösungsmittel NaCl 5% Ethanol zugegeben. Den Tieren wurde sowohl intraperitoneal als auch intraarteriell eine Dosis von 500 µg/kg injiziert.

#### **2.1.6.7 FSL-1**

Das synthetisch hergestellte Lipopeptid FSL-1 (Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptide-1) repräsentiert die N-terminale Sequenz des 44 kDa Lipoproteins LP44 aus *Mycoplasma salivarium* (Nakamura et al. 2002). Mühlradt et al. beschrieben 1996 ein 2 kDa Lipopeptid aus *Mycoplasma fermentans* (MALP-2: Makrophagen aktivierendes Lipopeptide-2), das die Fähigkeit besitzt, Monozyten und Makrophagen zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zu stimulieren. 1997 gelang ihnen die Strukturaufklärung und synthetische Herstellung dieses Lipopeptids. FSL-1 (C<sub>84</sub>H<sub>140</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub>S) (Abbildung 10) und MALP-2 besitzen beide zwei durch Esterbindungen verbundene Fettsäuren und einen freien N-Terminus, differieren aber in der Aminosäuresequenz und der Länge des Peptidrests, wobei die letzte Aminosäure bei FSL-1 hydrophob (Phenylalanin), bei MALP-2 hydrophil (Lysin)

ist (Okusaka et al. 2004). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete FSL-1 (emc microcollections GmbH, D-Tübingen) ist ein Gemisch aus RR und RS Stereoisomeren. Das Pulver wurde in einer Stocklösung von 1 mg/ml mit PBS angesetzt und in Dosierungen von 100 µg/ml aliquotiert. In dieser Dosierung fanden auch die Injektionen statt. Um die Moleküle von der Oberfläche der Aufbewahrungsgefäße zu lösen, wurde auf mündliches Anraten des Herstellers die Lösung vor der Injektion immer fünf Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Gelagert wurde das gelöste und aliquotierte FSL-1 bei -20°C. Laut Hersteller zeigten Proben des synthetischen Produktes nie Kontaminationen mit Endotoxinen, was mit Hilfe eines sensitiven LAL Assays (Limulus amoebocyte lysate) überprüft wurde.

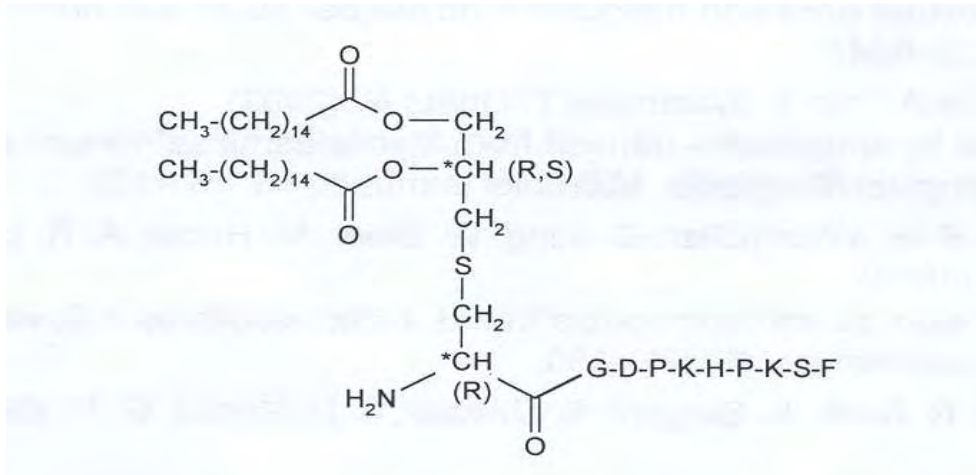
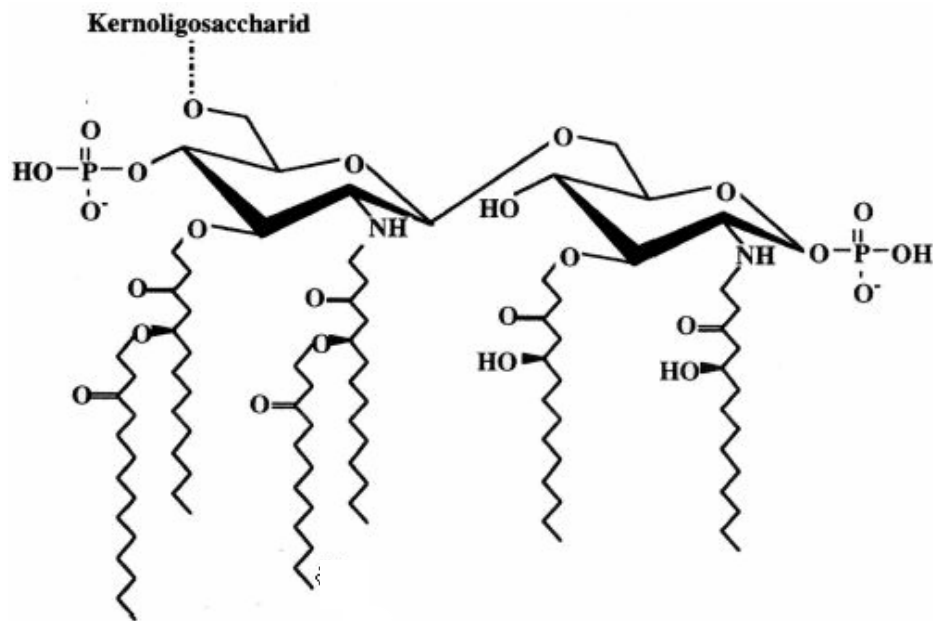


Abbildung 10: Strukturformel von FSL-1. Die Abkürzungen G-D-P-K-H-P-K-S-F bei FSL-1 stehen für die Aminosäuresequenz Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe.

#### 2.1.6.8 LPS

Lipopolysaccharide sind Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien. Es sind relativ thermostabile Verbindungen aus mehreren Teilbereichen: dem Polysaccharidanteil mit der inneren und äußeren Kernregion und der O-spezifischen Seitenkette und schließlich dem als Endotoxin wirkenden Lipid A (Abbildung 11), das die Verankerung mit der äußeren Membran darstellt. Das Lipid A des in den Versuchen verwendeten LPS stammte von *E.coli* Serotyp O111:4B (Sigma, St. Louis, Mo., USA) und bestand aus einem zweifach phosphorylierten Glucoseaminyll-1,6-glucosamin-disaccharid, sechs ungesättigten Fettsäuren und drei Alkyloxyalkylgruppen bestimmter Länge und Position.



**Abbildung 11: Chemische Struktur des Lipid A, das als Bestandteil des Lipopolysaccharids hauptverantwortlich ist für die immunstimulatorische Wirkung von *E.coli*.**

Das pulverförmige LPS wurde in 0,9%igem NaCl in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst, dann weiter verdünnt auf 10 µg/ml und bis zum Versuchsbeginn bei -40°C gelagert. Sowohl die intraperitoneale als auch die intraarterielle Injektion fanden in der Dosierung 10 µg/kg statt. Diese Dosierung wurde anhand von Vorversuchen im Rahmen dieser Studie ermittelt.

#### **2.1.6.9 Tumor Nekrose Faktor-Bindungsprotein (TNFbp)**

Bei dem in den Versuchen verwendeten TNFbp handelt es sich um die synthetische Form des löslichen TNF Typ1 Rezeptors [PEG-(rsTNF-RI)<sub>2</sub>], eine dimerische Polyethylen-Glycol Verbindung des 55 kDa TNF Rezeptors, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* freies TNF sehr effektiv neutralisieren kann (Roth et al. 1998, Töllner et al. 2000) (1.5.1.2). Das TNFbp wurde in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung in der Konzentration von 5 mg/ml gelöst. Den Tieren wurde dann sowohl intraarteriell als auch intraperitoneal eine Dosis von 100 µg/200 µl pro Tier injiziert. Das verwendete TNFbp wurde von AMGEN Boulder, Boulder, CO., USA zur Verfügung gestellt.



### 2.1.7 Verwendete Substanzen für den IL-6 Bioassay und das Passagieren der B9-Zelllinie

**Tabelle 4: Auflistung der Reagenzien für den IL-6 Bioassay**

Reagenzien	Zusammensetzung	Hersteller
Assay Medium	45 ml RPMI Medium 4 ml FCS (Fetales Kälberserum) 0,5 ml Glutamin 125 µl Mercaptoethanol 65 µl Gentamycin	Rothwell Park Memorial Institute Medium 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland
IL-6 Standard	500µl IL-6 [50 IU/ml]	Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Großbritannien
Qualitätskontrollen	QK 1: 500 µl IL-6 [10 IU/ml] QK 2: 500 µl IL-6 [30 IU/ml]	
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Lösung	0,1 g MTT in 20 ml PBS	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
Isopropanol/HCL-Lösung	4 ml 2N HCl 196 ml Isopropanol	Merck, D-Darmstadt

## 2.1.8 Verwendete Substanzen für den TNF Bioassay und das Passagieren der WEHI-Zelllinie

**Tabelle 5: Auflistung der Reagenzien für den TNF Bioassay**

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

### **2.1.9 B9-Zelllinie**

Entwickelt wurde diese Zelllinie 1986 von Lansdorp et al., in dem in die Bauchhöhle von Balb/c Mäusen Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentacane) injiziert wurde. Die entnommenen Milzzellen der so behandelten Tiere wurden mit Hybridplastozytomzellen (Sp2/0Ag14) fusioniert und daraus entstand dann die Hybridioma-Zelllinie B 13.29. Bei der in den Assays verwendeten B9-Zelllinie handelt es sich um einen Subklon dieser Zelllinie. Sie besitzt eine so hohe Sensitivität gegenüber IL-6, dass sogar der Nachweis der Bioaktivität von IL-6 eines einzelnen menschlichen Monozyten möglich ist (Aarden et al. 1987).

### **2.1.10 WEHI-Zellen**

Bei der zur Bestimmung von TNF verwendeten Zelllinie handelt es sich um WEHI-Zellen, diese Abkürzung steht für: **W**alter and **E**lizabeth **H**all **I**nstitute. Es handelt sich um die murine Fibrosarkom-Zelllinie 164 Subklon 13. Diese Zelllinie wird in der „American Tissue Culture Collection“ (ATCC) unter der Bezeichnung CRL 1751 geführt. Die Zellen stammen aus einem Fibrosarkom, das durch die subkutane Injektion von Methylcholanthren in Balb/c Mäusen induziert wurde. Daraus wurde ein Subklon isoliert, der äußerst empfindlich gegenüber TNF reagiert (Espevic & Nissen-Meyer 1986).

Studien haben gezeigt, dass auch das mehrmalige Einfrieren und Wiederauftauen der Plasmaprobe keine negative Wirkung auf die zytologische Aktivität haben, somit ist das WEHI- Assay sicher reproduzierbar. Desweiteren wird mit ihm nicht nur TNF $\alpha$  nachgewiesen, sondern auch Zytokine mit einer ähnlichen Aktivität, dazu zählt beispielsweise TNF $\beta$ .

### 2.1.11 Verwendete Substanzen für den PGE<sub>2</sub>-ELISA

**Tabelle 6: In der Tabelle sind die in dem ELISA-Kit mitgelieferten Substanzen aufgeführt.**

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

### 2.1.12 Verwendete Substanzen und Antikörper für die Immunhistochemie

#### 2.1.12.1 Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)

Zur Herstellung der physiologischen Kochsalzlösung zur Perfusion wurden 9 g NaCl Trockensubstanz (Merck, D-Darmstadt) in einem Liter *Aqua bidest.* durch Rühren mit einem Magnetrührer gelöst und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### **2.1.12.2 Phosphatpuffer (0,1M PB)**

Der verwendete Phosphatpuffer wurde aus zwei Stocklösungen angesetzt. Stocklösung A bestand aus einer 0,2M Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )- Lösung (Merck, D-Darmstadt). Es wurden 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (177,99 g/Mol) abgewogen und in einem Liter *Aqua bidest.* gelöst. Stocklösung B bestand aus 0,2M di-Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )- Lösung (Merck, D-Darmstadt). Hierfür wurden 27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (137,99 g/Mol) in einem Liter *Aqua bidest.* gelöst. Es wurden immer 5 l gebrauchsfertiger Puffer hergestellt, indem 700 ml Stock A mit 1200 ml Stock B gemischt wurden und mit *Aqua bidest.* auf 5 l aufgefüllt wurde. Nach gutem Durchmischen wurde mit Hilfe von Indikatorpapier der pH-Wert kontrolliert, der zwischen 7,2 und 7,4 liegen musste.

### **2.1.12.3 Paraformaldehyd (PFA)**

Die für die Immunhistologie verwendeten Tiere wurden nur mit NaCl perfundiert um die sich in den Endothelien befindlichen Signale zu erhalten, daher mussten die Gehirnschnitte nach dem Aufziehen auf die Objektträger nachfixiert werden. Dies geschah mit Paraformaldehyd-Lösung, die vor jeder Immunhistologie frisch angesetzt werden musste. PFA vernetzt reaktive Gruppen in Polypeptidketten von Proteinen und fixiert somit das Gewebe, so dass die Antigene vor der weiteren Prozedur der Immunhistochemie geschützt waren. Die PFA-Lösung wurde aus 20 g PFA in Pulverform (Merck, D-Darmstadt) auf einen Liter Puffer hergestellt, um eine Endkonzentration von 2% zu erreichen. Da das PFA schlecht löslich ist, musste es auf einer Heizplatte bei ca. 120°C unter kontinuierlichem Rühren erhitzt werden, bis die Flüssigkeit klar wurde. Anschließend wurde die Lösung durch einen Filter in einen Erlenmeyerkolben, der in Eis gebettet stand, geschüttet und so auf 4°C abgekühlt.

### **2.1.12.4 Primäre Antikörper**

Zur Detektion von STAT3-Signalen und der Identifikation von assoziierten Zelltypen wurden in der Immunhistochemie verschiedene in Tabelle 7 aufgeführte mono- bzw. polyklonale Antikörper eingesetzt, die in unterschiedlichen Wirtstieren hergestellt wurden.

**Tabelle 7: Übersicht über die in der Immunhistochemie eingesetzten Primärantikörper**

Primärantikörper	Bezeichnung/Spezifität	Hersteller
Anti-STAT3 (sc-482) <i>(polyklonal, made in rabbit)</i>	<b>Signal Transducer and Activator of Transcription</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc., D-Heidelberg
Anti-NeuN (MAB377) <i>(monoklonal, made in mouse)</i>	<b>Neuronal Nuclei</b> Marker für neuronale Zellen	MoBiTech GmbH, D-Göttingen
Anti-vW (SARTW-IG) <i>(polyklonal, made in sheep)</i>	<b>Von-Willebrand-Faktor</b> Marker für Endothelzellen	Affinity Biologicals Inc., Kanada
Anti- GFAP (MAB3402) <i>(monoklonal, made in mouse)</i>	<b>Glial Fibrillary Acidic Protein</b> Marker für Astrozyten	Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA

#### 2.1.12.5 Sekundäre Antikörper

Zur Detektion von STAT3 diente ein biotinylierter Sekundärantikörper. In einem weiteren Schritt wurde das Cy<sup>3</sup> gekoppelte Streptavidin an das Biotin gebunden und so konnte STAT3 über die Fluoreszenz dieses rot fluoreszierenden Carbocyanins erkannt werden. Die Zweitantikörper zur Differenzierung der Zelltypen waren direkt an ein Fluorochrom (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) gekoppelt. Ihre Auswahl richtet sich nach dem Wirt des Primärantikörpers (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Übersicht über die in der Immunhistochemie eingesetzten Sekundärantikörper**

Sekundär-Antikörper	Detektion von	Hersteller
Biotin-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG	STAT 3	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgG	NeuN/ GFAP	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 donkey anti-sheep IgG	vW	
Cy <sup>™</sup> 3 konjugiertes Streptavidin	STAT 3	Jackson Immuno Research Laboratories, West-Grove, USA

#### **2.1.12.6 Avidin/Biotin Blocking Kit**

Da manche Gewebe Avidin oder biotinylierte Antikörper binden können, was aufgrund von endogenem Biotin, Biotin-bindenden- Proteinen oder unspezifisch bindenden Substanzen stattfindet, musste dies mit Hilfe eines Avidin/Biotin Blocking Kits (Linaris Biologische Produkte GmbH, D-Wertheim) verhindert werden. Beide Substanzen wurden jeweils in einer Menge von 50 µl/ml 0,1M PB angesetzt.

#### **2.1.12.7 NHS-Blocking Lösung**

Um die unspezifischen Bindungsstellen vor dem Einsatz der Antikörper abzublocken, wurde eine Blocking-Lösung hergestellt. Sie bestand aus Phosphatpuffer, in dem 10% NHS (Normal Horse Serum) und 0,3% Triton X unter leichtem Rühren gelöst wurden. Durch Vorinkubation der Schnitte mit diesem Puffer ließ sich die unspezifische Hintergrundfärbung bei der Immunhistochemie vermeiden.

#### **2.1.12.8 Fluoreszenzfarbstoff**

Zur Anfärbung der Zellkerne wurde ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Es handelt sich dabei um DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol-dilaktat) Nucleic Acid Stain 300Nm (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA). DAPI interagiert mit doppelsträngiger DNA und ist somit in Zellkernen nachweisbar. DAPI wurde in 0,1M PB gelöst und in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

#### **2.1.12.9 Gebrauchsfertige Substanzen**

Citifluor<sup>®</sup> (Citifluor LTD, London, Groß-Britannien)

Normal Horse Serum (NHS) (PAA Laboratories GmbH, A-Linz)

Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich, D-Steinheim)

Tissue Freezing Medium<sup>™</sup> (Leica Instruments GmbH, D-Nussloch)

Titon-X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)(Sigma Aldrich, D-Steinheim)



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Narkose und Operationstechniken

#### 2.2.1.1 Narkose

Als Prämedikation zur Analgesie erhielten die Tiere Meloxicam in einer Dosierung von 200 µg/kg oral. Danach erfolgte eine Injektion von 250 µg/kg Medetomidin i.m. Wenn die Tiere leicht sediert wirkten, bekamen sie eine langsame intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Ketaminhydrochlorid. Medetomidin bewirkt in Kombination mit Ketaminhydrochlorid eine kurzzeitige Anästhesie und Analgesie. Zur lokalen Anästhesie des Operationsfeldes wurde Lidocainhydrochlorid verwendet, je nach Größe der zu betäubenden Fläche zwischen 0,2-0,4 ml subkutan. Um die Sedation mit Medetomidin post operationem aufzuheben, wurde den Tieren Atipamezolhydrochlorid in einer Dosierung von 1250 µg/kg i.m. injiziert. Sie erwachten dann innerhalb einer Viertelstunde.

Zur tiefen Anästhesie der Tiere vor den Perfusionen wurde den Tieren Pentobarbital-Natrium 100 mg/kg i.p. injiziert.

#### 2.2.1.2 Implantation des Verweilkatheters in die Arteria carotis

Vor der Operation wurde zunächst das OP-Feld vorbereitet. Die Tiere wurden vorher mit der unter 2.2.1.1 beschriebenen Narkose anästhesiert und schließlich in Rückenlage auf einer Wärmematte positioniert. Die Augen wurden mit Augengel vor dem Austrocknen geschützt. Die Halsregion wurde in der *Regio thyreoidea* geschoren, anschließend wurden mit der Enthaarungscreme die restlichen feinen Haare entfernt. Die Desinfektion erfolgte dann mit Cutasept<sup>®</sup>, das etwa drei Minuten zum Einwirken auf der Haut verblieb. Es wurde dann mit dem Skalpell eine Schnittinzision von ca. 1,5 cm im mittleren Bereich des OP-Feldes etwas links der Medianen vorgenommen. Der *Musculus cutaneus colli* wurde dann ebenfalls in Längsrichtung durchtrennt und zusammen mit der Haut mit zwei Wundhaken auseinander gezogen um die Sicht auf die *Arteria carotis sinister* zu verbessern. Diese wurde dann stumpf vom umliegenden Gewebe und dem parallel verlaufenden *Nervus vagus* freipräpariert, um

anschließend isoliert auf eine gebogene Pinzette gelegt zu werden. Cranial wurde die Arterie nun mit einem nicht resorbierbaren Faden ligiert. Caudal wurde eine Ligation vorbereitet, die bei Bedarf, z.B. bei einer Ruptur der Arterie, schnell von einer OP-Assistenz ligiert werden konnte. Dann erfolgte möglichst dicht an der *cranialen* Ligatur eine Querinzision der Arterie mit einer Augenschere. Durch die gespannte Lage der Arterie auf der Pinzette kam es zu keinem nennenswerten Blutaustritt. Die Öffnung der Arterie wurde nun mit einer Pinzette gespreizt, so dass der mit NaCl gefüllte Katheter mit dem abgebogenen Ende voran in die Arterie vorgeschoben werden konnte. Mit einer Pinzette wurden dabei Arterie und Katheter gemeinsam fixiert. Der Katheter wurde bis in den linken Herzventrikel vorgeschoben, so dass die Blase in dem freipräparierten Bereich der Arterie zu liegen kam. Der Katheter wurde dann *cranial* und *caudal* dieser Blase an der Arterie mit einem nicht resorbierbaren Faden festgebunden. Schließlich wurde noch der freiliegende Teil der Arterie mit dem Katheter ligiert.

Um die Durchgängigkeit des Katheters zu prüfen wurde die Klemme am freien Ende des Katheters gelöst, um zu sehen, ob er sich mit Blut füllte, und anschließend wurde er mit etwa 0,2 ml NaCl und ca. 0,2 ml des vorher angesetzten NaCl-Heparin- Gemischs gespült. Die Klemme wurde wieder geschlossen um zu verhindern, dass Blut in dem Katheter zurücklief. Dann wurde das Ende mit einem LötKolben zugelötet. Der Hautmuskel wurde dann mit resorbierbarem Faden fortlaufend genäht. Damit das Ende des Katheters im Nacken der Meerschweinchen zu liegen kam, wurde er subkutan auf der linken Seite zur *Regio cervicalis dorsalis* durchgeführt und durch eine kleine Schnittinzision in der Haut nach außen gezogen. Dort wurde er mit resorbierbarem Nahtmaterial angenäht und das freie spiralförmige Ende mit Silkafix eingewickelt um zu verhindern, dass die Tiere an den Katheter gelangten und ihn durchbissen. Die Hautwunde wurde dann mit resorbierbarem Faden mit zwei *Sultan'schen Diagonalheften* verschlossen.

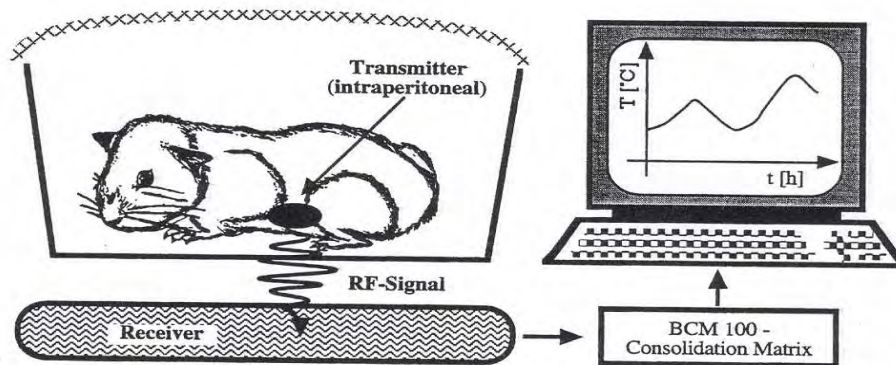
### **2.2.1.3 Implantation des Senders in die Bauchhöhle**

Diese Operation erfolgte direkt anschließend an die Implantation des Katheters. Das OP-Feld wurde *cranial* vom Nabel geschoren und die restlichen Haare wieder mit Enthaarungscreme entfernt. Die Desinfektion erfolgte mit Cutasept<sup>®</sup>, die Einwirkzeit betrug auch hier etwa drei Minuten. In der *Linea alba* erfolgte mit einem Skalpell eine etwa 1 cm lange Schnittinzision der Haut, die darunterliegende Bauchmuskulatur mitsamt des *Peritoneums* wurde mit Hilfe

einer chirurgischen Pinzette nach oben gezogen und dann mit dem Skalpell vorsichtig die Bauchhöhle eröffnet. Unter Schutz einer anatomischen Pinzette wurde mit Hilfe einer Schere die Öffnung vergrößert. Der vorher desinfizierte Sender wurde nun in die Bauchhöhle platziert und während des Verschlusses des *Peritoneums* und der Muskulatur über die angebrachte Öse mit einem resorbierbaren Faden an der Bauchwand fixiert. Der Verschluss erfolgte mit zwei *Sultan'schen Diagonalheften*. Die Haut wurde dann mit Hilfe eines Skin Staplers verschlossen. Beide OP-Wunden und die Austrittsstelle des Katheters im Nacken wurden mit einem Aluspray besprüht. Bis zum vollständigen Erwachen wurden die Tiere unter eine Rotlichtlampe gelegt. Die Klammern wurden nach ca. 5-6 Tagen, in jedem Fall vor Versuchsbeginn, entfernt.

## 2.2.2 Telemetrische Aufzeichnung der Körperkerntemperatur

Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe einer telemetrischen Anlage, die in Abbildung 12 bildlich dargestellt ist. Die Tiere konnten sich während den Versuchen in den Käfigen frei bewegen.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der telemetrischen Anlage zur Aufzeichnung der Körperkerntemperatur. Die Käfige der Versuchstiere mit den implantierten abdominalen Transmittern standen auf Empfängerplatten, die die Daten im Abstand von fünf Minuten an einen Computer weiterleiteten und dort aufgezeichnet wurden.

Um zu vermeiden, dass es zu Datenausfällen kam, waren die Größe der verwendeten Käfige und die der Receiverplatte annähernd identisch. Im Abstand von fünf Minuten wurden die abdominalen Temperaturen mit Hilfe der in 2.1.4 beschriebenen Senders aufgezeichnet und an das Datenerfassungssystem weitergeleitet.

## 2.2.3 Versuchsdurchführung

### 2.2.3.1 Zeitschema der in vivo Versuche

Die in vivo Versuche liefen nach dem folgenden bildlich dargestellten Schema ab:

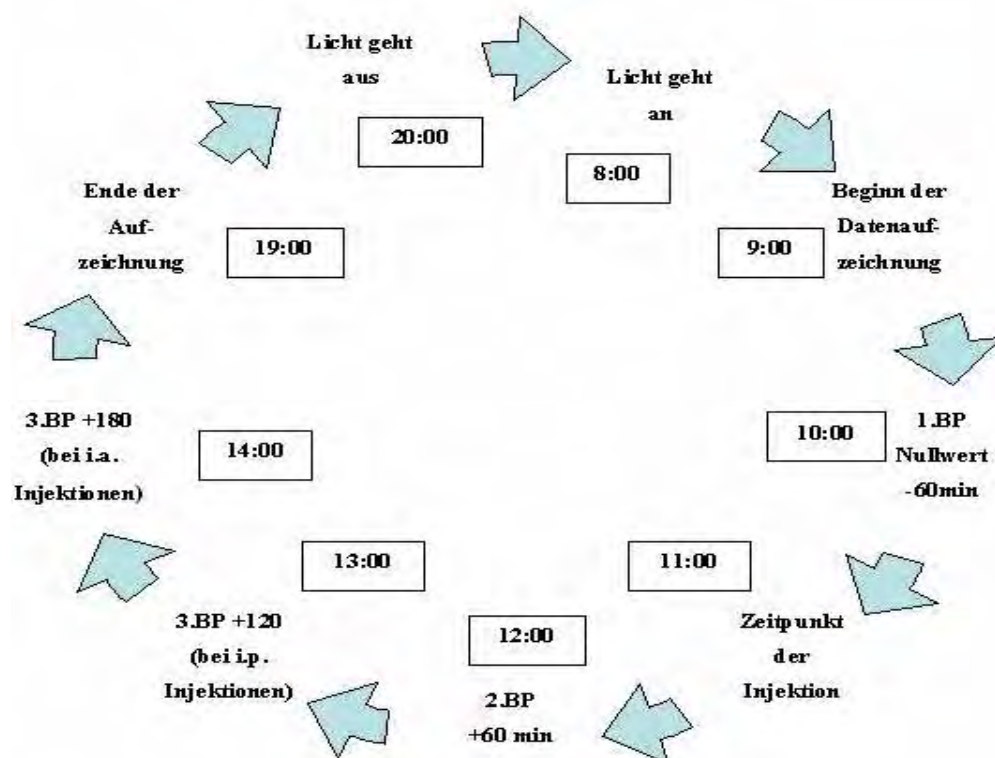


Abbildung 13: Zeitschema der in vivo Versuche. Die Blutprobenentnahme (BP) erfolgte jeweils zu den Zeitpunkten -60, +60 und +180 min bei den intraarteriellen bzw. +120 min bei den intraperitonealen Injektionen.

Da um 8:00 Uhr das Licht anging, wurde den Tieren vor der Injektion drei Stunden Zeit gegeben, sich diesem Tag-Nacht-Wechsel anzupassen.

Die Zeitpunkte der Blutabnahmen wurden so gewählt, wie sie entsprechend der Zytokinspiegel beim Meerschweinchen sinnvoll waren. Dies war in früheren Studien bereits ermittelt worden (Roth et al. 1993). Zur immunhistologischen Untersuchung der Gehirne wurden die Tiere zum Zeitpunkt 120 min nach der i.a. Injektion von FSL-1 perfundiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da bei der Stimulation mit anderen Pyrogenen (LPS, Poly I:Poly C) zum Zeitpunkt 90-120 min ein Maximum an nukleären STAT3 Signalen nachgewiesen werden konnte (Rummel et al. 2004, Voss et al. 2007). Des Weiteren wurde dieser Zeitpunkt durch Vorversuche in der Arbeitsgruppe ermittelt. Bei den Toleranzversuchen wurde ein Abstand von drei Tagen zwischen den fünf aufeinander folgenden Injektionen eingehalten. Dieser zeitliche Abstand hatte sich in Studien mit dem klassischen Endotoxin LPS beim Meerschweinchen bewährt (Roth et al. 1994a).

### **2.2.3.2 Applikation der Substanzen**

Vor Versuchsdurchführung wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert. Einen Tag zuvor wurden die Katheter gespült und somit ihre Durchgängigkeit getestet. Die Tiere wurden zur intaarteriellen Injektion und der Blutprobenentnahme in die Wägeschüssel gesetzt. Nach der Injektion wurde der Katheter mit 0,2 ml NaCl nachgespült und verlötet. Die intraperitoneale Injektion erfolgte in der *Regio umbilicalis* jeweils rechts und links der Medianen. Vor der Applikation wurde aspiriert um ein direktes Injizieren in Darm, Blase oder Blutgefäßsystem zu vermeiden. Da die zu injizierenden Volumina sehr klein waren, wurde bei den intraperitonealen Injektionen das Volumen der Substanzen immer auf 1 ml mit NaCl aufgefüllt und um eine bessere Verteilung zu erreichen, je 0,5 ml rechts und 0,5 ml links der Medianen injiziert.

### **2.2.3.3 Blutprobengewinnung aus dem Katheter**

Um zu verhindern, dass es zum Ausbleiben von Messwerten kam, wurde versucht, den Tieren immer innerhalb der fünfminütigen Sendepause Blut zu entnehmen. Die Blutabnahme erfolgte für die Tiere völlig stressfrei, da der Katheter es erlaubte, die Tiere bei dieser

Prozedur nicht fixieren zu müssen. Der Katheter wurde mit einer Klemme abgeklemmt und das obere Ende abgeschnitten. Im günstigsten Fall kam das Blut sofort von selbst, ansonsten musste mit einer aufgesetzten Spülspritze aspiriert werden. Die aufgesetzte 1 ml Spritze enthielt 0,05 ml Heparin und den Tieren wurden langsam 0,5–0,6 ml Blut entnommen und gleich in ein Eppendorfgefäß umgefüllt. Der Katheter wurde daraufhin wieder mit 0,2-0,4 ml NaCl, bzw. bei der letzten Blutabnahme 0,2 ml NaCl-Heparin - Gemisch gespült und anschließend wieder zugelötet.

#### **2.2.3.4 Aufbereitung der Proben**

Die Blutproben wurden in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert, das Plasma abpipettiert, in ein Eppendorfgefäß abgefüllt und die so gewonnene Probe bei -40°C bis zur Durchführung der Assays gelagert. Man erhielt pro 500-600 µl Blut etwa 300 µl Plasma.

#### **2.2.4 Analyse der Blutproben**

Um die in den Plasmaproben enthaltenen Zytokine IL-6 und TNF zu bestimmen, wurden Bioassays verwendet.

##### **2.2.4.1 Bioassays**

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

Die verfügbaren ELISAs für Zytokine sind in der Handhabung sehr einfach und schnell. Bei ihnen werden speziesspezifische Antikörper eingesetzt. Allerdings hat diese Methode auch einige Nachteile, sie detektiert zum Beispiel nicht nur biologisch aktive Zytokine, sondern auch inaktive Anteile. Zudem sind Zytokine und somit auch die verwendeten Antikörper speziesspezifisch und aufgrund fehlender oder sehr geringer Kreuzreaktivität limitiert. Für das Meerschweinchen sind Zytokin-Antikörper noch nicht kommerziell erhältlich. Eine andere

Möglichkeit der Quantifizierung von Zytokinen ist ihrer Eigenschaft zu verdanken, bei bestimmten Zellen biologische Reaktionen auszulösen. Mittels zytokin-spezifischer Zellkultur-abhängiger Bioassays kann dieses biologisch aktive Material nachgewiesen werden, und zwar mit einer hohen Sensitivität. Sie ermöglichen die Messung eines gegebenen Zytokins bei unterschiedlichen Spezies.

Aufgrund der fehlenden Antikörper für Zytokine des Meerschweinchens und der langjährigen erfolgreichen institutseigenen Erprobung wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellkultur-abhängigen Bioassays zur Analyse der Blutproben eingesetzt.

#### **2.2.4.2 Passagieren der B9-Zelllinie**

Unter einer zuvor mit Ethanol desinfizierten Sterilbank wurden neue Kulturflaschen beschriftet und mit je 9 ml Medium befüllt. Anschließend wurden die aus dem Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, relative Luftfeuchte 95%) entnommenen Kulturflaschen der letzten Passagen geöffnet und aus ihnen jeweils 1ml in eine neue Kulturflasche überführt. Die Flaschen wurden verschlossen, in den Brutschrank gestellt und die Verschlusskappen wieder aufgedreht. Die Zellen wurden im Abstand von 3-4 Tagen passagiert.

#### **2.2.4.3 Passagieren der WEHI-Zelllinie**

Es wurde ebenfalls unter einer desinfizierten Sterilbank gearbeitet. Die Flüssigkeit aus den Kulturflaschen der letzten Passage wurde dekantiert und in diese Flaschen jeweils 12 ml PBS gegeben und waagrecht ca. drei Minuten ruhen gelassen. Dies diente dazu, die vorhandenen Kalziumionen auszuwaschen, die zu einer Inaktivierung von Trypsin führen würden. Danach wurde das PBS wieder dekantiert und jeweils 3 ml Trypsin zugegeben. Die Flaschen wurden wieder waagrecht gelegt und zwischendurch leicht geschwenkt, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Die Ablösung der Zellen war makroskopisch durch eine Trübung des Mediums erkennbar. Die neuen Kulturflaschen wurden dann mit 20 ml Medium befüllt und 1,5 ml der Zellsuspension überführt. Die Kulturflaschen wurden verschlossen und im Brutschrank dann wieder geöffnet. Die spindelförmigen Fibroblasten hefteten sich innerhalb von drei Tagen zu mindestens 80% an den Boden der Kulturflasche.

#### **2.2.4.4 Der IL-6-Bioassay**

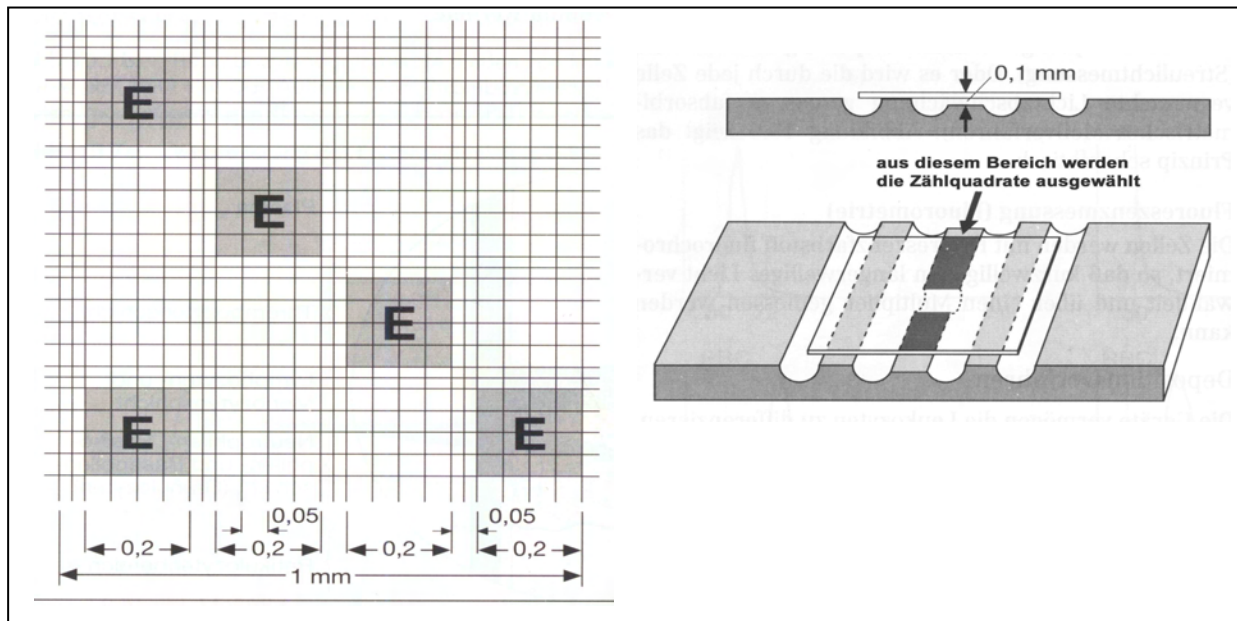
IL-6 besitzt einen wachstumsfördernden und proliferativen Einfluß auf die B9 Hybridoma Zellen (Aarden et al. 1987). Dieser Einfluß ist dosisabhängig, d.h. je mehr IL-6 in der Probe vorhanden ist, desto höher ist auch die resultierende Zellzahl. Die Nachweisgrenze für diesen Assay liegt bei 3 IU IL-6/ml (Ross et al. 2003).

Die Durchführung des Assays erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen. Diese Platten wurden nach einem bestimmten Schema beschickt (Abbildung 15). Bei jedem Assay wurden pro Platte zwei Standards und zwei Qualitätskontrollen erstellt. Durch den Einsatz von Verdünnungsreihen ergab sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die durch die Verwendung internationaler Standardreihen quantifiziert werden konnte und einen internationalen Vergleich zwischen verschiedenen Labors erlaubt (Meager & Gaines-Das 1994).

Die B9-Zellen wurden zuerst passagiert und die übrige Zellsuspension für 10 Minuten bei 2300 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und die Zellen mit Assay-Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um das im Wachstumsmedium vorhandene IL-6 vollständig auszuwaschen. Die lebenden Zellen wurden auszugsweise unter dem Mikroskop in einer Zählkammer nach Thoma ausgezählt (Abbildung 14).

Die Zellsuspension sollte auf etwa 5000 Zellen/100 µl eingestellt sein, daher musste sie anhand der ermittelten Zellzahl verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor wurde anhand einer Formel ermittelt ( $\text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/Kammerfaktor} \times \text{ausgezählte Zellen}$ ).





**Abbildung 14: Zählkammer nach Thoma:** In den grau unterlegten Kästchen der Kammer wurden insgesamt 80 Kleinstquadrate ausgezählt. (5x (E)Gruppenquadrate mit je 16 Kleinstquadraten) Zellen, die die untere und rechte Kante berührten, wurden nicht mitgezählt.

Bei jedem Assay wurden mehrere Standards und zwei Qualitätskontrollen erstellt. Dazu wurden in die Vertiefung B1 (Abbildung 15) 200  $\mu\text{l}$  IL-6 Standard und in A2 und 3 und B2 und 3 je 200  $\mu\text{l}$  der Qualitätskontrollen I und II pipettiert. Die restlichen Tubes der Spalten wurden mit je 200  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Probe beschickt. Die Standard Verdünnungsreihe wurde erstellt, indem in der ersten Spalte 100  $\mu\text{l}$  aus B1 abpipettiert und mit dem Medium in C1 vermischt wurden. Aus C1 wurden dann wiederum 100  $\mu\text{l}$  mit dem Medium in D1 vermischt. Dieses Schema vollzog sich dann durch die komplette Reihe. Die letzten 100  $\mu\text{l}$  aus K1 wurden verworfen, so dass sich in L1 nur noch Medium befand. Eine ebensolche Verdünnung fand für die Qualitätskontrollen und die Proben statt, allerdings erfolgte hier eine Doppelbestimmung (Abbildung 15).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Blank	50 IU	1:1 25 IU	1:2 12.5 IU	1:4 6.25 IU	1:8 3.13 IU	1:16 1.56 IU	1:32 0.78 IU	1:64 0.39 IU	1:128 0.19 IU	1:256 0.1 IU	nur Medium
2	QK 1	QK1	1:1 A2	1:1 B2	1:2 C2	1:2 D2	1:4 E2	1:4 F2	1:8 G2	1:8 H2	1:16 I2	1:16 J2
3	QK2	QK2	1:1 A3	1:1 B3	1:2 C3	1:2 D3	1:4 E3	1:4 F3	1:8 G3	1:8 H3	1:16 I3	1:16 J3
4	Proben	Proben	1:1 A4	1:1 B4	1:2 C4	1:2 D4	1:4 E4	1:4 F4	1:8 G4	1:8 H4	1:16 I4	1:16 J4
5	Proben	Proben	1:1 A5	1:1 B5	1:2 C5	1:2 D5	1:4 E5	1:4 F5	1:8 G5	1:8 H5	1:16 I5	1:16 J5
6	Proben	Proben	1:1 A6	1:1 B6	1:2 C6	1:2 D6	1:4 E6	1:4 F6	1:8 G6	1:8 H6	1:16 I6	1:16 J6
7	Proben	Proben	1:1 A7	1:1 B7	1:2 C7	1:2 D7	1:4 E7	1:4 F7	1:8 G7	1:8 H7	1:16 I7	1:16 J7
8	Proben	Proben	1:1 A8	1:1 B8	1:2 C8	1:2 D8	1:4 E8	1:4 F8	1:8 G8	1:8 H8	1:16 I8	1:16 J8

Abbildung 15: Schematische Darstellung einer für einen IL-6 Assay beschickten Mikrotiterplatte und der zur Analyse verwendeten Verdünnungsreihe.

Nachdem die Zellsuspension entsprechend verdünnt war, wurden in alle Tubes außer in A1 100 µl davon suspendiert und die Mikrotiterplatten 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in jeder Vertiefung außer in A1 25 µl MTT (Methylthiazoltetrazolium) pipettiert. Dieses gelbe Reagenz wird in den Mitochondrien der Zellen von einem Enzym, der Succinyl-Dehydrogenase, zu dunkelblauen Formazankristallen verstoffwechselt (Abbildung 16).

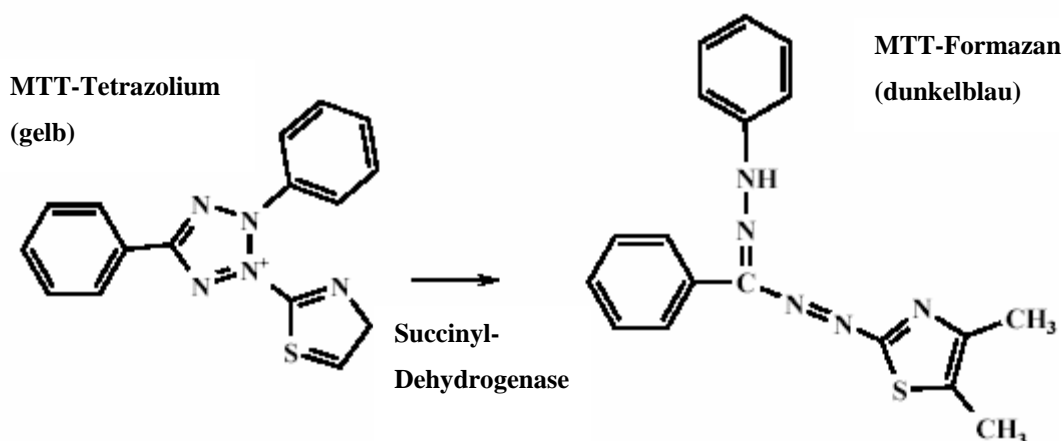


Abbildung 16: Strukturformeln von MTT-Tetrazolium und dem nach Umsetzung durch die Succinyl-Dehydrogenase (aus Mitochondrien) entstandenen Reaktionsprodukt MTT Formazan.

Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 4 Stunden. Aus allen Tubes wurden dann 125 µl Flüssigkeit abpipettiert. Es musste darauf geachtet werden, dabei nicht die Zellen vom Boden der Tubes abzupipettieren. Anschließend wurden in alle Tubes 100 µl des Isopropanol-HCl-Gemisches pipettiert, das die Zellwände zerstört und so die Formazankristalle freisetzt und auflöst. Danach erfolgte noch einmal eine lichtgeschützte Inkubation von 12 Stunden bei Raumtemperatur. Zur Auswertung wurden die Mikrotiterplatten in einen ELISA-Reader eingelegt und die optische Dichte der einzelnen Tubes bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

#### **2.2.4.5 Der TNF-Bioassay**

Das dem TNF-Bioassay zugrunde liegende Prinzip beruht auf dem zytotoxischem Effekt von TNF auf bestimmte Zellen. Die Nachweisgrenze für diesen Assay liegt bei 6 pg TNF/ml (Ross et al. 2003). Das in der Plasmaprobe enthaltene TNF tötet konzentrationsabhängig eine bestimmte Menge an Zellen, was sich quantitativ durch die Zugabe von MTT messen lässt. Dieser Farbstoff (Abbildung 16) wird in den Mitochondrien der nicht getöteten Zellen in Formazankristalle umgewandelt, die sich dunkelblau darstellen. Anhand der optischen Dichte konnte diese Verfärbung mit Hilfe eines ELISA-Readers quantitativ bestimmt werden.

Die WEHI-Zellen wurden passagiert und die Zellsuspension 10 Minuten bei 2300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen anschließend mit Assay-Medium wieder resuspendiert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Zellsuspension zum Befüllen der Mikrotiterplatten wurde nach demselben Schema hergestellt wie die des IL-6 Assays, d.h., die Zellen wurden ausgezählt und entsprechend verdünnt. Allerdings wurde für diesen Assay eine Zelldichte von 50000 Zellen/100 µl eingestellt. Nach der Verdünnung wurde noch 4 µl/ml Actinomycin D hinzu gegeben, einerseits um das weitere Zellwachstum zu stoppen und andererseits um die Sensibilität der Zellen zu erhöhen. Die Befüllung der Mikrotiterplatte erfolgte wie bei dem IL-6-Assay, die erste Inkubationszeit betrug hier allerdings nur 24 Stunden. Das weitere Protokoll ist dem des IL-6-Assays gleich.

Nach der letzten Inkubation wurden die Mikrotiterplatten zur Auswertung ebenfalls in den ELISA-Reader eingelegt und die optische Dichte der einzelnen Tubes bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

#### 2.2.4.6 Der Prostaglandin E<sub>2</sub> ELISA

Da Prostaglandine im Gegensatz zu den Zytokinen nicht speziesspezifisch sind, konnte zur Detektion von PGE<sub>2</sub> ein Immunassay eingesetzt werden

Der Assay diente zur quantitativen Bestimmung von PGE<sub>2</sub> bei den Versuchen mit dem unselektiven Zyklooxygenasehemmer Diclofenac. Der ELISA beruht auf der Basis eines kompetitiven Immunoassays. In dem verwendeten Kit war ein monoklonaler Antikörper gegen PGE<sub>2</sub> an eine feste Phase in den Wells gebunden, um dessen Bindungsstelle das in den Plasmaproben und das im Konjugat enthaltene PGE<sub>2</sub> konkurrieren und kovalent binden. Nach der Inkubation bei 4°C wurden die Reagenzien ausgewaschen und das Substrat zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C wurde die Enzymreaktion gestoppt und der entstandene gelbe Farbstoff konnte von einem ELISA-Reader bei 405 nm gemessen werden. Die Intensität der Farbe war umgekehrt proportional zu der PGE<sub>2</sub> Konzentration in der Probe. Die Nachweisgrenze des Assays lag bei 8.26 pg/ml. Die Kreuzreaktivitäten waren bis auf PGE<sub>1</sub> (70 %) und PGE<sub>3</sub> (16,3%) zu vernachlässigen.

Die im Lieferumfang enthaltene Assaypufferkonzentration wurde 1:10 mit *Aqua bidest.* verdünnt. Für die Standardverdünnungsreihe wurden 8 Eppendorfgefäße mit je 500 µl Assaypuffer vorgelegt, außer in Tube 1, dort wurden 980 µl und 20 µl des PGE<sub>2</sub> Standards pipettiert. Davon wurden je 500 µl in das jeweils nächste Tube gegeben und vermischt. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration betrug dann in den Tubes 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 und 7.81 pg/ml. Die Standardreihe und die Proben wurden in doppelter Ausführung angefertigt. Die Plasmaproben wurden 1:5 mit dem Assaypuffer vorverdünnt. Die Mikrotiterplatte wurde nach dem in Tabelle 9 abgebildeten Schema beschickt. Zunächst wurden 100 µl Standardverdünung in die NSB und die Bo Wells gegeben, in die NSB Well zusätzlich noch 50 µl Assay Puffer. Dann wurden jeweils 100 µl Standard-PGE<sub>2</sub> in die Wells A2-H3 und jeweils 100 µl der Proben in die Wells A4-H12 pipettiert. In alle Wells wurden dann 50 µl des blauen Konjugates gegeben, außer in A1, B1, C1, D1, E1 und F1. Die benutzen Vertiefungen zeigten jetzt eine grüne Färbung außer den NSB Wells, die blau waren. A1-D1 zeigten keine Verfärbung. Die Platte wurde nun mit einer mitgelieferten Folie verschlossen und bei 4°C 18-24 Stunden inkubiert. Danach wurde der jeweilige Überstand aus den Wells abpipettiert und mit jeweils 400 µl Waschlösung dreimal gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte umgedreht auf ein Labortuch geklopft um alle Reste des Waschpuffers zu entfernen. In die Vertiefungen C1 und D1 wurden dann 5 µl Konjugat gegeben und danach in

alle Wells 200 µl pNpp Substrat. Die Platte wurde wiederum mit der Folie abgedeckt und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Danach wurde in alle Wells eine Stopp-Lösung gegeben, die die Enzym-Reaktion dann abstoppte. Die Platte konnte nun in den ELISA Reader eingelegt werden und die Extinktion bei 405 nm gemessen werden.

Als Negativkontrolle dienten A1 und B1, sie enthielten nur nNpp. TA (C1 und D1) bezeichnen die „Totale Aktivität“, d.h. sie enthielten Konjugat und pNpp. B0 bezeichnet die maximale Bindung und dient als Positivkontrolle. Konjugat und Antikörper reagierten ohne Proben PGE<sub>2</sub> miteinander. In den NSB Wells wurden „nicht spezifische Bindungen“ überprüft, indem der PGE<sub>2</sub>-Antikörper weggelassen wurde. Es kam zu unspezifischen Bindungen des Konjugates mit dem Antikörper auf der Platte, so dass dieser Wert später von den Probenergebnissen und Standards abgezogen werden musste um das eigentliche Ergebnis nicht zu überschätzen.

**Tabelle 9: Protokoll des PGE<sub>2</sub>-Assays:**

	Blank A1, B1	TA C1, D1	NSB E1, F1	Bo G1, H1	Stds. A2-H3	Samples A4-H12
Standard			100 µl	100 µl		
Assay Puffer			50 µl			
Standard oder Probe					100 µl	100 µl
Konjugat			50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Antikörper				50 µl	50 µl	50 µl
Abgedichtet 18-24 h inkubieren bei 4°C						
Waschen, 3x 400 µl						
Konjugat		5 µl				
Substrat	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Abgedichtet 1 h inkubieren bei 37°C						
Stopp-Lösung	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

## **2.2.5 Immunhistochemische Analyse der Gehirnschnitte**

### **2.2.5.1 Perfusion**

Alle Tiere, deren Gehirne für die Immunhistochemie genutzt wurden, wurden 120 Minuten nach Injektion perfundiert. Sie wurden mit einer Überdosis Pentobarbital i.p. in eine tiefe Narkose versetzt und nach Aussetzen des Zwischenzehenreflexes auf einer Perfusionswanne fixiert. Dazu wurde den Tieren in Rückenlage der Kopf zusammen mit den Vordergliedmaßen und die Hintergliedmaßen auf dem Gitter mit Silkafix befestigt.

Mit Schere und Pinzette wurde *präumbilical* die Bauchhöhle eröffnet und der Schnitt nach *cranial* bis zum *Diaphragma* verlängert. Das Zwerchfell wurde dann mit einer kleineren Schere rechts und links nach *lateral* entlang des Rippenbogens durchtrennt. Dabei war es wichtig, keine Organe wie etwa die Lunge zu verletzen, um einen vorzeitigen Blutaustritt aus dem Gefäßsystem zu vermeiden. Mittels einer großen Schere wurden dann die Rippen beidseits durchtrennt und so der Brustkorb eröffnet. Das *Sternum* wurde mit einem großen Nadelhalter fixiert und nach *cranial* geklappt, so dass Herz und große Gefäße freilagen. Das *Pericard* wurde stumpf eröffnet und vor Beginn der Perfusion noch eine Blutprobe zur Analyse der IL-6- und TNF-Werte aus dem linken *Ventrikel* entnommen. Danach wurde in dieselbe Injektionsstelle eine Kanüle eingeführt, die mit dem Schlauch der Perfusionsanlage verbunden war. Damit man nicht zu weit in die Herzkammer eindrang, war sie mit einer abgeschnittenen Kanüle sozusagen als „Stopper“ versehen. Zeitgleich mit dem Eröffnen des rechten Herzohres wurde die Anlage eingeschaltet und das Blutgefäßsystem mit einem konstanten Druck von ca. 120 mmHg mit ca. 400-450 ml zimmerwarmer NaCl-Lösung gespült. Wenn die Farbe der Lunge und der Leber eine ausreichende Blässe aufwies, wurde dies als ein Zeichen einer guten Ausblutung gewertet und die Perfusionsanlage gestoppt. Der Kopf der Tiere wurde hierauf mit einer Zange abgetrennt und im Folgenden das Gehirn entnommen. Die Aufbereitung der Blutprobe erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

### **2.2.5.2 Entnahme der Gehirne für die Immunfluoreszenz**

Der abgetrennte Schädel des perfundierten Tieres wurde zunächst im Bereich der Schädelkalotte bis zum *Os nasale* von Haut und Fell freipräpariert. Mit einer Knochenzange

nach Luer wurde dann von der *Medulla oblongata* aus die Schädeldecke abpräpariert. Die Hirnhäute wurden entfernt und nach Durchtrennung der Hirnnerven und vorsichtiger Abtrennung der Hypophyse konnte das Gehirn mit einem Spatel vorsichtig von den *Filae olfactoriae* und dann aus seiner knöchernen Umhüllung gelöst werden. Es wurde dann am Übergang von *Cerebrum* zu *Cerebellum* (*Fissura transversa cerebelli*) durchtrennt und anschließend beide Teile in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren. Nach etwa zwei Minuten in dem Eis wurden die beiden Gehirnteile jeweils in Parafilm und danach in Alufolie eingewickelt, in Plastiksraubgefäße verpackt und anschließend in diesen Gefäßen in einer Polystyrolbox mit Trockeneis bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung der Immunhistochemie gelagert.

### **2.2.5.3 Herstellen der Gehirnschnitte am Gefriermikrotom**

Die Gehirne der perfundierten Tiere wurden am Kryostaten geschnitten. Dieser wurde auf eine Innentemperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  eingestellt und einer Temperatur von  $-8^{\circ}\text{C}$  für den Objekthalter. Die Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger wurden vor Beginn des Schneidens im Innenbereich vorgekühlt. Das Großhirn wurde dann aus dem Schraubgefäß entnommen und mit der *caudalen* Fläche mit Hilfe von Tissue Einbettmedium auf einen Objektblock geklebt und durch die Funktion „Freeze object“ des Kryostaten schnell auf ca.  $-20^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt, so dass das Gehirn fest auf dem Block aufsaß und im angewinkelten Zustand geschnitten werden konnte. Das Großhirn wurde von rostral geschnitten, die Schnittdicke betrug  $20\ \mu\text{m}$ . Die Schnitte der interessanten Regionen des vorderen bis *caudalen Hypothalamus* (SFO, OVLT, ME und ARC) wurden dann auf die Objektträger aufgezogen. Das Poly-L-Lysin verbesserte hierbei durch Veränderung der Ladungsverhältnisse die Adhäsion der dünnen Schnitte, damit diese sich bei den folgenden Inkubationsschritten nicht ablösten. Die fertigen Objektträger wurden dann bis zu den folgende Arbeitsschritten in einem Färbegestell auf Eis gelagert. Das Kleinhirn wurde in derselben Weise auf dem Objektblock angefroren, allerdings wurde es mit der *rostralen* Fläche aufgeblokt und dann von *caudal* geschnitten, um die interessante Region (AP) zu erreichen. Die fertigen Schnitte wurden dann entweder am selben Tag mit dem ersten Antikörper inkubiert, oder über Nacht im Kühlschrank gelagert.

#### 2.2.5.4 Grundlagen der Immunhistochemie

Die Grundlage der Immunhistochemie bildet die Interaktion von spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörpern mit dem nachzuweisenden Antigen. Antikörper sind von Plasmazellen gebildete Immunglobuline, biochemisch betrachtet Glycoproteine, die aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten bestehen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Antikörper besitzen ein konstantes  $F_c$  Fragment (*fragment crystallizable*) und zwei  $F_{ab}$  Fragmente (*fragment antigen binding*), die für die Antigenbindung verantwortlich sind. Innerhalb dieser  $F_{ab}$  Region gibt es hypervariable Bereiche, in denen sich das sogenannte Paratop befindet, das die tatsächliche Bindungsstelle darstellt.

Antigene sind hochmolekulare Trägermoleküle wie Proteine oder Peptide. Ihre antigene Determinante ist das so genannte Epitop, das mit dem Paratop der  $F_{ab}$  Region des Antikörpers in Wechselwirkung treten kann und so den reversiblen Antigen-Antikörper Komplex bildet. Der Nachweis dieser Antigen-Antikörper Komplexe kann durch verschiedene Methoden wie beispielsweise der Avidin-Biotin-Methode (Hsu et al. 1981) mit anschließender Diaminobezidin-Färbung oder durch indirekte Immunfluoreszenz (Coons 1958) nachgewiesen werden. Bei letzterer ist der erste Antikörper nicht markiert, d.h., er muss von einem sekundären markierten Antikörper detektiert werden. Der Vorteil gegenüber der direkten Immunfluoreszenzmethode ist eine höhere Sensitivität und eine geringere Hintergrundfärbung. Mit dieser in der vorliegenden Arbeit verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmethode waren Mehrfachmarkierungen möglich, d.h., es konnten gleichzeitig mehrere Antigene detektiert werden. Nachteil der Fluoreszenzmethode ist allerdings das schnelle Ausbleichen der Fluorophore bei Anregung im UV-Bereich und somit eine begrenzte Aufbewahrungszeit der Gehirnschnitte.

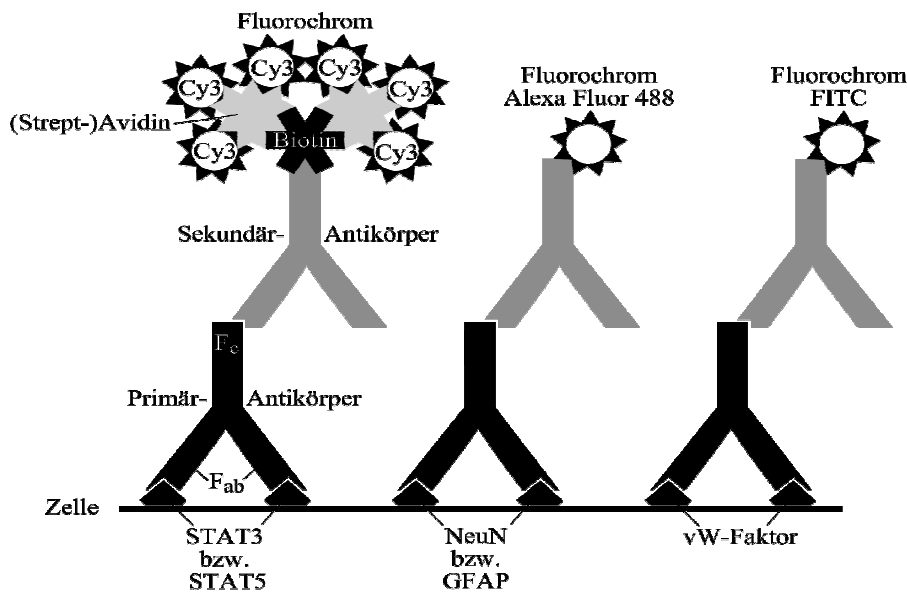
#### 2.2.5.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Fluoreszenzmethode wird ein spezifisches Antigen bzw. sein Epitop von einem unmarkierten spezifischen Primärantikörper erkannt und gebunden. In einem zweiten Schritt wird seine  $F_c$  Region von einem Sekundärantikörper erkannt, der an einen fluoreszierenden Farbstoff wie z.B. Fluoreszein oder Rhodamin gekoppelt ist (Abbildung 17). Die Lokalisation dieses Komplexes erfolgt dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes mit geeignetem Filter. Dazu wird das Fluorophor mit Licht einer



geeigneten Wellenlänge angeregt, worauf durch den Filter längerwellige Strahlung emittiert wird. Sind, wie in dem folgenden Protokoll, mehrere Primärantikörper aus unterschiedlichen Wirtstieren verwendet worden, können sie gleichzeitig detektiert werden, wenn die Sekundärantikörper an verschiedene Fluorophore gekoppelt sind (Abbildung 17).

In der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dreifachmarkierung (Hübschle et al. 2001, Harré et al. 2003, Rummel et al. 2005) sollte der Nachweis der durch FSL-1 induzierten und IL-6 vermittelten nukleären STAT3-Signale erfolgen und parallel dazu der aktivierte Zelltyp, also Astrozyt, Neuron oder Endothelzelle, charakterisiert werden. STAT3 wurde dabei mit dem Cy3 gekoppelten Streptavidin (rot), das astrozytäre Markerprotein GFAP, das neuronale Markerprotein NeuN und das endotheliale Protein vW mit Alexa Fluor 488 (grün) nachgewiesen. Die „dritte“ Markierung erfolge durch die Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau).



**Abbildung 17:** Darstellung der indirekten Fluoreszenzmethode mittels Doppelmarkierung: Die unmarkierten Primärantikörper binden mit ihrer  $F_{ab}$  Region an das jeweilige Antigen. Die Sekundärantikörper binden in einem weiteren Schritt an deren  $F_c$  Region. Sie sind entweder direkt Fluorochrom-gekoppelt oder werden im Fall von STAT3 über das Cy3 gekoppelte Streptavidin markiert.

### **2.2.5.6 Der STAT3 Antikörper**

In der zytoplasmatischen Form liegen STAT3 Proteine als unphosphorylierte Monomere oder phosphorylierte Dimere vor, nach der nukleären Translokation nur in dimerer Form (1.5.1.4). Der polyklonale im Kaninchen hergestellte STAT3 Antikörper erkennt am Carboxy-terminalen Ende des STAT3 Proteins eine bestimmte Peptidsequenz (AS 750-769) und kann somit beide Formen detektieren. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde durch eigene Vorversuche in der Arbeitsgruppe bestätigt (Rummel et al. 2004).

### **2.2.5.7 Immunhistochemisches Protokoll**

Die auf Eis gelagerten und inzwischen angetrockneten Schnitte wurden nach dem Schneiden sofort mit der 2%igen PFA- Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur nachfixiert. Wurden die Schnitte über Nacht im Kühlschrank gelagert und das Protokoll erst am nächsten Tag ausgeführt, mussten die Schnitte zuerst 15 Minuten in Phosphatpuffer rehydriert und dann 10 Minuten fixiert werden. Nach dem Fixieren wurde das PFA ausgewaschen (3 x 5 Minuten mit PB). Danach wurden mit Hilfe der hergestellten Blocking-Lösung die unspezifischen Bindungsstellen abgeblockt. Diese Blockung erfolgte für mindestens eine Stunde. Danach erfolgte eine Ko-Inkubation des STAT3 Antikörpers in einer Verdünnung 1:4000 mit dem NeuN-Antikörper (1:200) bei einem Drittel der Schnitte (aus verschiedenen Regionen) und dem STAT3 Antikörper mit dem GFAP-Antikörper (1:2000) bei dem zweiten Drittel. Das letzte Drittel wurde nur mit dem STAT3 Antikörper inkubiert. Die jeweiligen Antikörper Lösungen wurden in PB mit 2% NHS und 0,1% Triton X angesetzt.

Die Objektträger wurden mit den Schnitten nach unten auf spezielle Plexiglasschienen, die an den Längsseiten durch einen aufgeklebten ca. 0,5 cm breiten Steifen etwas erhöht waren, gelegt (maximal 8 pro Platte). Unter jeden einzelnen Objektträger wurden dann ca. 200 µl der jeweiligen Antikörper- Verdünnung pipettiert, sodass sich die Flüssigkeit durch kapilläre Kräfte unter ihnen verteilen konnte. Durch vorsichtiges Schieben der Objektträger auf den Platten konnten eventuelle Luftblasen an den Rand geschoben werden. Die Schienen wurden nach jedem Inkubationsschritt mit Spülmittel und *Aqua dest.* gereinigt und abgetrocknet. Die Inkubation fand dann in Metallkästen im Dunkeln statt, und zwar entweder bei Raumtemperatur über Nacht oder bei 4°C für zwei Nächte. Nach diesem Zeitraum wurden die Schnitte wieder 3 x 5 Minuten in PB gewaschen. Dann erfolgte die Blockung der

Avidin/Biotin- Bindungsstellen mit Hilfe des Avidin/Biotin-Blocking Kits. Es wurden 50 µl Avidin pro 1 ml PB angesetzt und die Schnitte für 15 Minuten auf den Platten im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen wurde auf die gleiche Weise mit dem Biotin verfahren. Die Inkubation des zweiten Antikörpers für STAT3 mit dem biotinylierten anti-rabbit IgG (1:200) erfolgte dann nach einem weiteren Waschschrift. Gleichzeitig wurde das letzte Drittel der Schnitte mit dem ersten vW Antikörper (anti-vW *made in sheep*, 1:3000) inkubiert. Dies dauerte 90 Minuten und danach wurde wieder gewaschen. Zur endgültigen Detektion von STAT3 fand dann eine Inkubation mit dem Cy3-gekoppelten Streptavidin (1:800) statt. Gleichzeitig erfolgte eine Detektion von NeuN und GFAP mittels Alexa 488<sup>®</sup> anti mouse IgG (1:800 und 1:500), bzw. von vW mit Alexa 488<sup>®</sup> anti sheep (1:400). Nach weiteren 90 Minuten wurden die Schnitte gewaschen und anschließend 10 Minuten mit DAPI (1:1000) die Zellkerne gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift und einer kurzen Trockenzeit konnte dann gedeckelt werden. Dazu wurden auf jeden Objektträger 2-3 Tropfen Citifluor aufgetropft und anschließend ein Deckglas aufgebracht. Eventuelle Blasen wurden mit Hilfe einer Pinzette an den Rand gedrückt. Die Schnitte konnten nun angesehen und ausgewertet werden oder bei 4°C über mehrere Wochen gelagert werden.

**Tabelle 10: Arbeitsprotokoll der Fluoreszenz-Immunhistochemie mittels Dreifachmarkierung**

Arbeitsschritt	Reagenz/Antikörperansatz	Temperatur	Inkubationszeit
Fixation	PFA-Lösung (2%ig)	RT	10 min
Waschen	PB	RT	3 x 5 min
Blockung der unspezifischen Bindungsstellen	NHS-Blocking Solution	RT	60 min
Erste Antikörper	<b>a)</b> anti-STAT3 ( <i>made in rabbit</i> ) + anti-NeuN ( <i>made in mouse</i> ) <b>b)</b> anti-STAT3 + GFAP ( <i>made in mouse</i> ) <b>c)</b> Nur anti-STAT3	4°C	2 Nächte
Waschen	PB	RT	3 x 5 min
Blocken	Avidin	RT	15 min
Waschen	PB	RT	3 x 5 min

-Material und Methoden-

Blocken	Biotin	RT	15 min
Waschen	PB	RT	3 x 5 min
Zweite Antikörper, bzw. erster für vW	<b>a)+b)</b> biotinylierter <i>anti rabbit</i> IgG (STAT3) <b>c)</b> biotinylierter <i>anti rabbit</i> IgG (STAT3) + anti-vW ( <i>made in sheep</i> )	RT	90 min
Waschen	PB	RT	3 x 5 min
Endgültige Detektion	<b>a) + b)</b> Alexa 488 <sup>®</sup> IgG <i>anti-mouse</i> ) <b>c)</b> Alexa 488 <sup>®</sup> IgG ( <i>anti-sheep</i> ) <b>a)+b)+c)</b> Cy <sup>™</sup> 3 konjugiertes Streptavidin	RT	90 min
Waschen	PB	RT	3 x 5 min
Kernfärbung	Fluoreszenzkernfarbstoff DAPI	RT	10 min
Waschen	PB	RT	3 x 5 min
Deckeln	2-3 Tropfen Citifluor	RT	
Lagerung	Kühlraum, dunkel	4°C	Mehrere Wochen

## 2.2.6 Auswertung der Daten und Statistik

### 2.2.6.1 Computerprogramme

Die Datenaufbereitung, Auswertung, graphische Darstellung und Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe folgender Computerprogramme:

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

EndNote Program, Version 6.0.2 (Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA)

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

MDL ISIS<sup>™</sup>/Draw, Version 2.5 (Elsevier MDL, San Ramon, CA, USA)

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

Stat View<sup>®</sup> for Macintosh (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA)

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

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

Vital View Version 3.1 (Respironics Inc–MiniMitter, Bend, OR, USA)

### **2.2.6.2 Telemetrische Daten**

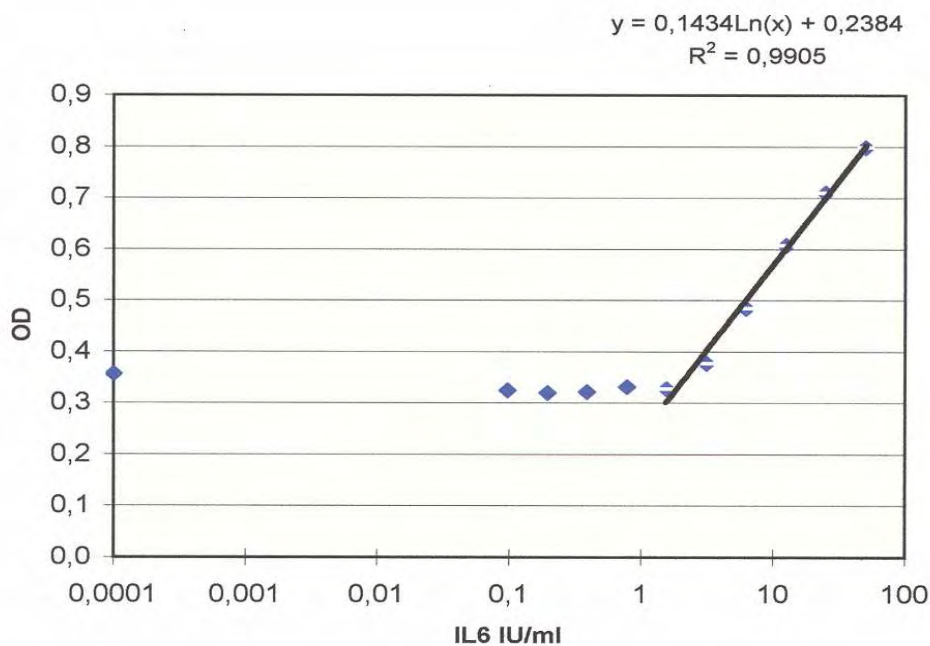
Zur Darstellung der Fieberkurven wurden jeweils die Mittelwerte der Temperaturen gegen die Zeit aufgetragen. Es handelte sich hierbei immer um Mittelwerte mit Standarderror. Die Werte wurden in Intervallen von 15 Minuten angegeben, in einem Fall (hohe FSL-1-Dosis i.p.) in Intervallen von 30 Minuten. Die Zeitachse begann immer zwei Stunden vor der jeweiligen Injektion und dauert bis 6 bzw. 8 Stunden nach der Injektion, in einem Fall (hohe FSL-1-Dosis i.p.) 24 Stunden nach der Injektion. Da in manchen Versuchen die Ausgangstemperaturen der Tiere unterschiedlich waren (die physiologische Temperatur eines Meerschweinchens liegt zwischen 38,5 und 39,5 °C), wurden zur Ermittlung der Nulllinie die absolut gemessenen Abdominaltemperaturen der Versuchstiere innerhalb der zwei Stunden vor der Injektion gemittelt und im Zeitraum nach der Injektion die Differenzen zwischen den gemessenen Werten und eben dieser Nulllinie im Diagramm aufgetragen ( $\Delta T_{\text{abd}}^{\circ\text{C}}$ ). Die Auswertung der Temperaturdaten erfolgte mit dem Programm VitalView, die anschließende graphische Darstellung mit SigmaPlot. Für jede Versuchsreihe wurden in der Regel zwischen 3 und 7 Tiere eingesetzt.

Im Fall der FSL-1 i.p. Toleranzversuche wurde zudem ein Fieberindex (F.I.) errechnet, um zu belegen, dass die Toleranz transient ist. Hierzu fand eine Integration der Flächen unter den jeweiligen Kurven statt, um die Stärke der Fieberreaktionen besser beurteilen zu können.

Um die Fieberkurven der injizierten Tiere mit den jeweiligen Kontrollgruppen oder die Fieberkurven der Toleranzversuche miteinander zu vergleichen, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gewählt. Im Anschluss an die durchgeführte Varianzanalyse wurde der Scheffé- Tests als post-hoc-Test auf dem 5% Niveau durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen statistisch signifikanten Unterschied lag bei  $P < 0.05$ .

### 2.2.6.3 IL-6-Bioassay

Um die Daten der Assays auszuwerten musste zunächst eine Eichkurve erstellt werden. Hierfür wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 6.0 die Standardwerte der optischen Dichte auf der y-Achse gegen die IL-6 Konzentrationen auf der x-Achse aufgetragen (Abbildung 18). Der lineare Teil der Kurve stellt das Wachstum der Zellen dar, das konzentrationsabhängig ist. Gleichzeitig ist dieses Wachstum auch direkt proportional zu der Menge an umgesetzten Formazankristallen, so dass die optische Dichte zunimmt. Es wurden nur diejenigen Verdünnungen der Proben ausgewählt, die sich im Bereich der Regressionsgeraden befanden. Die IL-6 Konzentration konnte dann anhand einer Regressionsgleichung der Eichkurve und des Verdünnungsfaktors der Probe errechnet werden.

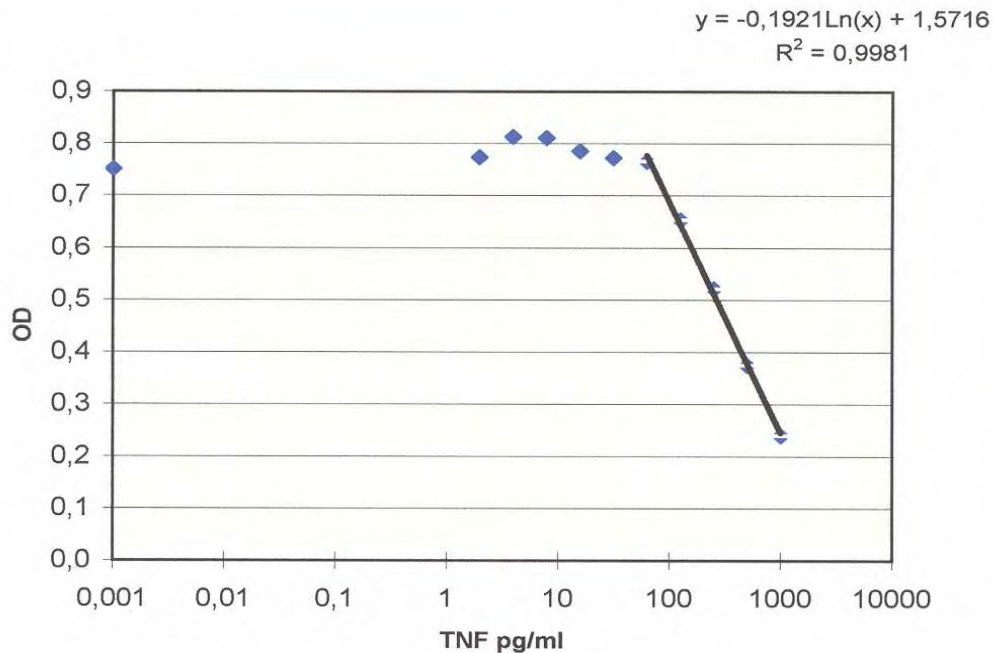


**Abbildung 18:** Exemplarische Darstellung einer Eichkurve aus einem IL-6-Assay. Die Regression im linearen Teil der Kurve liegt annähernd bei 1.

### 2.2.6.4 TNF-Bioassay

Die Auswertung des TNF-Bioassays erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer Eichkurve und der daraus ermittelten Regressionsgeraden. Der Unterschied zum IL-6-Assay war allerdings, dass

mit steigender Aktivität von TNF die Zahl der überlebenden Zellen absank (Abbildung 19) und somit auch die Menge an verstoffwechselten Formazankristallen. Die optische Dichte nahm dementsprechend ab. Es wurden ebenfalls nur diejenigen Verdünnungen ausgewählt, die im Bereich der Regressionsgeraden lagen. Anhand der Regressionsformel und des Verdünnungsfaktors wurde schließlich die TNF-Konzentration ermittelt.

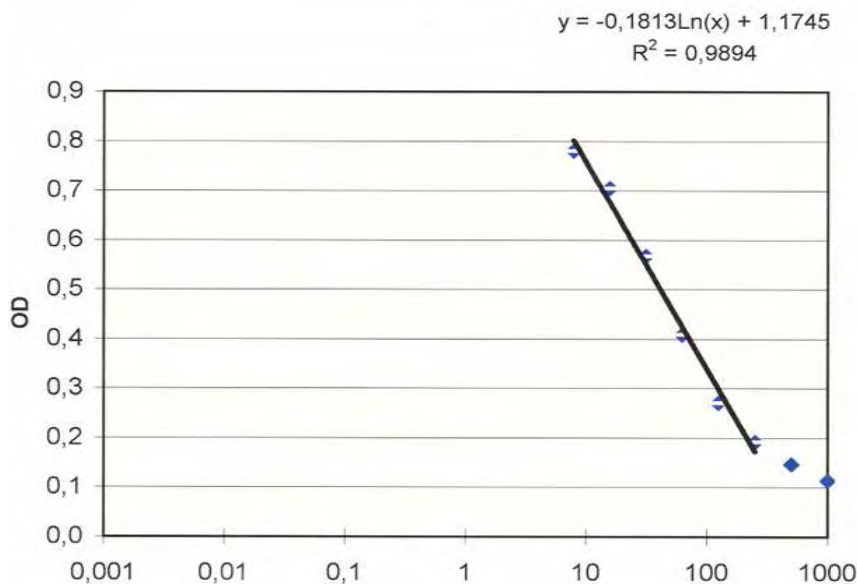


**Abbildung 19: Exemplarische Eichkurve aus einem TNF-Bioassay. Auch hier liegt die Regression im linearen Teil der Kurve bei annähernd 1. Im Unterschied zur Eichkve des IL-6-Assays fällt die Kurve ab, da die Zellen mit steigender Konzentration absterben und somit auch die Menge an Formazankristallen, was eine sinkende optische Dichte bedingt.**

Um die Konzentrationen von TNF und IL-6 im Plasma verschiedener Tiergruppen miteinander zu vergleichen, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) genutzt. Im Anschluß an jede durchgeführte Varianzanalyse wurde der Scheffé- Test als post-hoc-Test auf dem 5% Niveau durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen statistisch signifikanten Unterschied lag bei  $P < 0.05$ . Da Zytokinwerte häufig nicht normalverteilt sind, wurden sie vor ihrer statistischen Behandlung logarithmiert.

### 2.2.6.5 PGE<sub>2</sub>-Immunoassay

Zunächst wurde wie bei den anderen Assays mit Hilfe der Standardreihe eine Eichkurve erstellt (Abbildung 20). Anhand der optischen Dichte konnte dann die Menge des in der jeweiligen Probe enthaltenen PGE<sub>2</sub> ermittelt werden. Dabei war zu beachten, dass sie sich umgekehrt proportional verhält, d.h. war die optische Dichte hoch, war nur wenig PGE<sub>2</sub> in der Probe enthalten. Die statistische Auswertung erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den anderen Assays, jedoch mussten die ermittelten PGE<sub>2</sub>-Werte vorher nicht logarithmiert werden.



**Abbildung 20:** Dargestellt ist eine exemplarische Eichkurve eines PGE<sub>2</sub>-Assays. Die Regression der Kurve hat eine negative Steigung.

### 2.2.6.6 Mikroskopie

Nach der Immunhistochemie wurden die Schnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop angesehen und ausgewertet. Mit Hilfe eines FITC-Filters (ARW 450-490 nm) wurden die Alexa 488<sup>®</sup>-markierten Antigen-Antikörper Komplexe detektiert und mit Hilfe eines Rhodamin-Filters (ARW 510-530 nm) die Cy3<sup>™</sup>-gekoppelten Komplexe. Alexa 488<sup>®</sup> emittiert grünes Licht im Wellenlängenbereich von 510-540 nm, Cy3<sup>™</sup> rotes Licht im



Bereich 630-660 nm. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurde mit einer Wellenlänge von 358 nm angeregt. Er emittierte daraufhin blaues Licht einer Wellenlänge von 461 nm.

Die Bilder wurden in den verschiedenen Wellenlängenbereichen mit einer Schwarz-weiß-Kamera angefertigt und dann mit Hilfe des Programms Metamorph „eingefärbt“ und übereinander gelegt. So konnten in einem Bild gleichzeitig das STAT3 Signal, die Kollokalisierung mit einem bestimmten Zelltyp (Astrozyt, Neuron oder Endothelzelle) und die nukleäre Translokation bzw. Lokalisation dargestellt werden. Die Gewebeschnitte wurden in den Vergrößerungen 10, 20, 40 und 100fach angesehen. Für die Versuchsreihe mit intraarteriellen FSL-1 Injektionen wurden die Gehirne von fünf Tieren verwendet, für die Kontrollen mit PBS die Gehirne von drei Tieren.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Pyrogene Eigenschaften von FSL-1

Exogene Pyrogene haben die Eigenschaft, bestimmte Mechanismen im Körper zu aktivieren, die dann zu den Symptomen des „sickness behavior“ wie Anorexie, Apathie, Fieber etc. führen (1.3). In vielen wissenschaftlichen Arbeiten wurden bereits die pyrogenen und fiebererzeugenden Eigenschaften verschiedener Stoffe erforscht. Als prominentestes Beispiel gilt nach wie vor das LPS, das Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien. Auch Zellwandbestandteilen von Mycoplasmen (diacylierte Lipopeptide) werden potenziell pyrogene Eigenschaften zugeschrieben. Die Versuche mit FSL-1 als der N-terminalen Sequenz des LP44 aus *Mycoplasma salivarium* wurden in zwei systemischen Applikationsarten, nämlich intraarteriell und intraperitoneal, durchgeführt, um die pyrogenen Eigenschaften dieser Substanz zu charakterisieren.

#### 3.1.1 Intraarterielle Injektionen

##### 3.1.1.1 Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraarterieller Injektion verschiedener FSL-1 - Dosierungen im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppen

###### 3.1.1.1.1 Niedrige Dosis

Die intraarteriellen Injektionen mit FSL-1 erfolgten zunächst in einer Dosierung von 100 µg/kg KGW (n=7) (Abbildung 21). Die Aufzeichnung der Temperatur begann bei -120 Minuten und endete bei +480 min. Es kam bereits kurz nach der Injektion (+15 bis +30 min) zu einem moderaten und monophasischen Fieber, dessen Peak nach 60 Minuten erreicht war und im Mittel bei  $40,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$  lag. Nach etwa 180 weiteren Minuten wurde der Basalwert wieder erreicht. Im Vergleich dazu wies die Kontrollgruppe (n=7), denen das Lösungsmittel für FSL-1 injiziert wurde (PBS, 1 ml/kg), keine Veränderung der Basaltemperatur auf, die

beim Meerschweinchen physiologisch bei  $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$  liegt. Eine signifikante Erhöhung der Temperatur der mit FSL-1 stimulierten Tiere fand also im Zeitraum zwischen +60 und +180 Minuten statt ( $P=0,0277$ ).

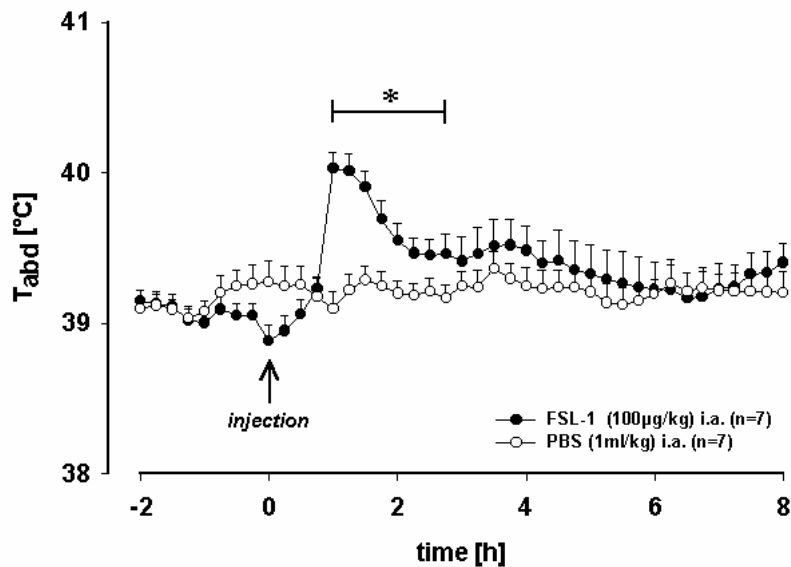


Abbildung 21: Fieberkurve der FSL-1 (100 µg/kg) i.a. stimulierten Tiere (n=7) im Zeitraum von zwei Stunden vor Applikation bis 8 Stunden danach im Vergleich zu der Temperaturkurve der PBS (1 ml/kg) injizierten Tiere. Die Injektionen erfolgten immer zum Zeitpunkt t=0 und sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

### 3.1.1.1.2 Hohe Dosis

Die intraarteriellen Injektionen fanden dann in einer 10fach höheren Dosierung statt, also 1000 µg/kg (n=3) (Abbildung 22). Die Temperatur der Tiere stieg etwa im selben Zeitraum an wie bei der niedrigen Dosierung, stieg dann aber auf eine Maximaltemperatur von durchschnittlich  $40,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$  nach 165 Minuten an und war 480 Minuten nach der Injektion noch immer nicht vollständig auf die Ausgangstemperatur zurückgekehrt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=4), der PBS (1 ml/kg) injiziert wurde, fand eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur der mit FSL-1 1000 µg/kg i.a. stimulierten Tiere im Zeitraum von +120 bis +480 Minuten statt ( $P=0,0049$ ).

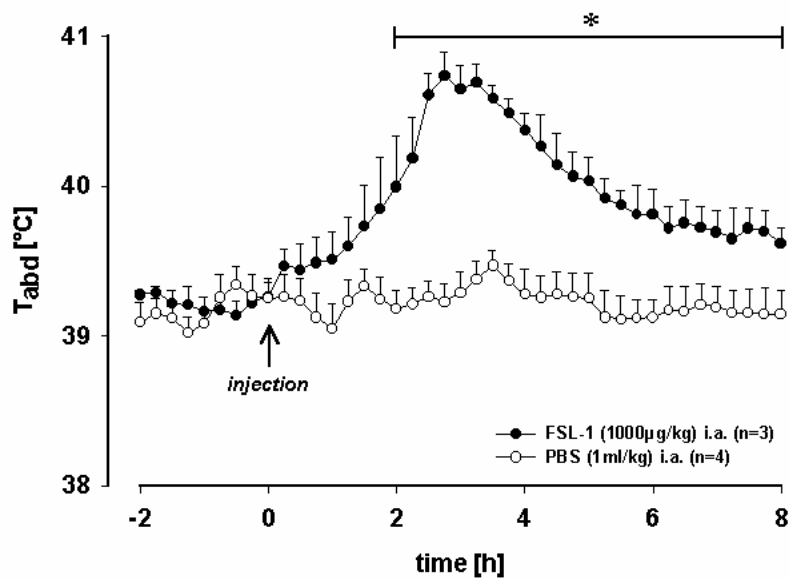


Abbildung 22: Fieberkurve nach Applikation von 1000 µg/kg FSL-1 i.a. im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Temperaturunterschiede der beiden Versuchsgruppen waren im Zeitraum von +120 bis +480 Minuten signifikant ( $P=0,0049$ ).

### 3.1.1.2 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraarterieller Injektion verschiedener FSL-1-Dosierungen

#### 3.1.1.2.1 Plasmawerte von TNF

Plasmawerte von TNF waren trotz des sensitiven Messverfahrens bei unstimulierten Tieren nicht messbar, d.h. sie lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 6 pg/ml. Zum Zeitpunkt +60 Minuten nach Stimulation mit FSL-1 i.a. kam es zu einem deutlichen Anstieg des mittleren TNF-Wertes auf  $10620 \pm 2390$  pg/ml, wobei 180 Minuten nach der Injektion kein TNF mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 23).

Vergleich man die TNF Werte nach Applikation der niedrigen und hohen Dosis, gab es nach +60 Minuten einen signifikanten Unterschied der beiden Mittelwerte. Bei der hohen Dosis lag der durchschnittlich gemessene Wert bei  $31344 \pm 6881$  pg/ml, also signifikant über dem nach Gabe der niedrigen Dosis ( $P<0,003$ ) (Abbildung 23). Bei einem von vier Tieren waren nach Gabe der hohen Dosis nach 180 Minuten noch 128 pg/ml TNF nachweisbar.

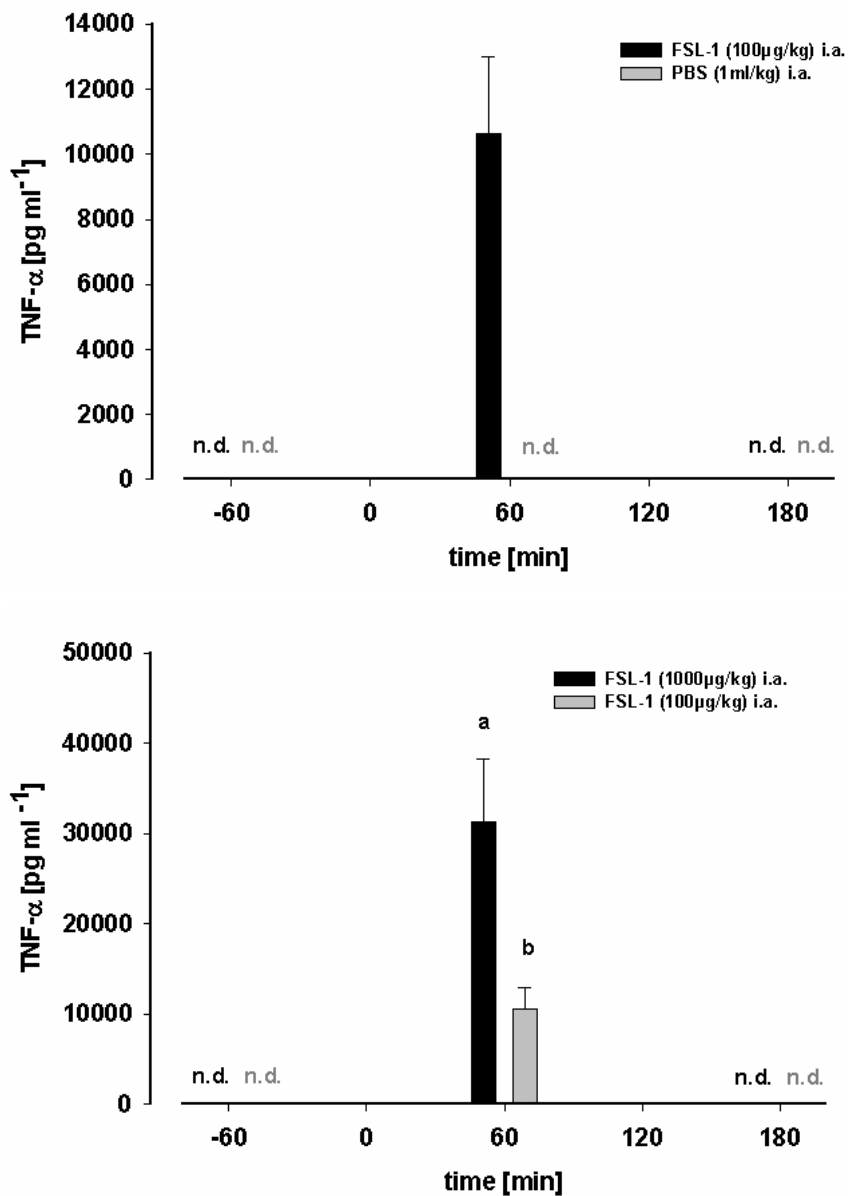


Abbildung 23: Die obere Abbildung zeigt die Plasmawerte von TNF nach Injektionen mit FSL-1 (100 µg/kg) i.a. Hier war nur nach 60 Minuten TNF messbar. Die untere Abbildung zeigt gemessenen TNF einmal nach der niedrigen und einmal nach der hohen FSL-1 Dosierung. Bei einem von vier Tieren waren 180 Minuten nach Gabe der hohen Dosis noch 128 pg/ml TNF messbar. Die Abkürzung n.d. steht für „nicht detektierbar“. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zu den untersuchten Zeitpunkten.

### 3.1.1.2.2 Plasmawerte von IL-6

Die Plasmawerte von IL-6 nach der Injektion von FSL-1 i.a. im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten deutlich, dass es zu den gemessenen Zeitpunkten +60 und +180 Minuten einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gab (Abbildung 24). Zum Zeitpunkt -60 Minuten hingegen war bei beiden Gruppen nur der basale IL-6 Spiegel zu messen, der im Durchschnitt immer zwischen etwa 30-80 IU/ml lag. Parallel zu der Fieberentstehung kam es zu einem deutlichen Anstieg des mittleren IL-6-Wertes nach 60 Minuten, der dann bei  $1504 \pm 344$  IU/ml ( $P < 0,0001$ ) lag und nach 180 Minuten immerhin noch bei  $367 \pm 70$  IU/ml, also noch immer deutlich signifikant über dem Basalwert der Kontrolltiere ( $P < 0,0001$ ).

Nach Injektion der hohen Dosis FSL-1 i.a. lag der durchschnittliche IL-6-Wert nach 60 Minuten bei  $22982 \pm 7469$  IU/ml, also signifikant über dem Wert, der nach Gabe der niedrigen Dosis zu diesem Zeitpunkt gemessen wurde ( $P < 0,0004$ ). Dasselbe galt für den Zeitpunkt +180 Minuten, zu dem sogar ein noch höherer Wert von  $322587 \pm 141501$  IU/ml gemessen werden konnte ( $P < 0,0001$ ) (Abbildung 24). Die gemessenen Werte korrelierten mit der Stärke der Fieberreaktion der Tiere. Bei der Injektion von  $100 \mu\text{g/kg}$  FSL-1 i.a. war das Fieber nach 180 Minuten schon wieder fast vorbei, während es bei der Injektion von  $1000 \mu\text{g/kg}$  nach 165 Minuten erst seinen Peak erreichte. Die IL-6 Werte stiegen nach 180 Minuten bei Gabe der hohen Dosis nochmals weiter an, während sie nach Injektion der niedrigen Dosis zu diesem Zeitpunkt bereits wieder absanken.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Bildung von TNF und IL-6 mit der Höhe der applizierten FSL-1 Dosis korrespondierte, d.h. bei der Stimulation der Tiere mit der 10fachen Dosis wurde nicht nur ein höheres Fieber aufgezeichnet, sondern auch deutlich mehr TNF und IL-6 gemessen.

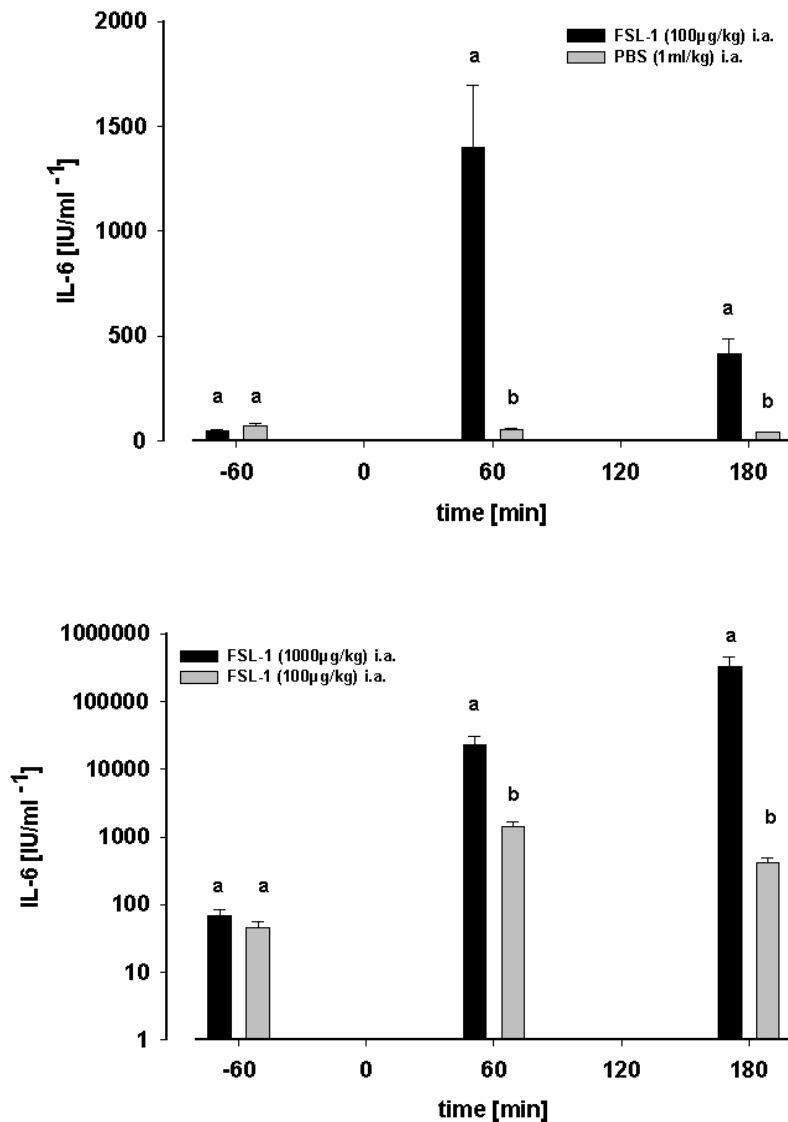


Abbildung 24: Die obere Abbildung zeigt die Plasmawerte von IL-6 nach Injektion von 100 µg/kg FSL-1 oder PBS i.a., gemessen 60 Minuten vor Injektion und 60 und 180 Minuten nach Injektion. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zu den untersuchten Zeitpunkten. Die untere Abbildung zeigt die mittleren IL-6-Werte vergleichend nach Gabe der hohen oder der niedrigen FSL-1 Dosis. Hierbei erfolgte aufgrund der hohen Streuung der jeweils verglichenen Werte eine logarithmische Darstellung.

### **3.1.2 Intraperitoneale Injektionen**

#### **3.1.2.1 Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraperitonealer Injektion verschiedener FSL-1 - Dosierungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe**

##### **3.1.2.1.1 Niedrige Dosis**

Bei den intraperitonealen Injektionen mit FSL-1 in der Dosierung 100 µg/kg (n=7) setzte die erwartete Fieberantwort später ein als bei der intraarteriellen Applikation (Abbildung 25). Die Temperatur der Tiere stieg etwa nach einer Stunde auf  $40 \pm 0,2$  °C an, verblieb dann kurzzeitig auf einem Plateau, stieg erneut und erreichte nach 3 ½ Stunden einen Peak von  $40,7 \pm 0,2$  °C. Danach fiel die Temperatur wieder ab und erreichte nach weiteren sechs Stunden fast wieder das basale Niveau. Bei der Kontrollgruppe (n=7) hingegen kam es zu keiner Reaktion auf die intraperitoneale Injektion von 1 ml/kg PBS. Die biphasische Fieberreaktion war im Zeitraum +105 bis +360 Minuten signifikant höher als die mittleren gemessenen Temperaturen der Kontrolltiere ( $P < 0,0023$ ). Die Reaktion auf die intraarterielle Injektion war monophasisch und deutlich moderater als auf die lokale intraperitoneale Injektion, die biphasisch war und deren maximale Temperatur  $0,6 \pm 0,2$  °C höher lag als nach der intraarteriellen Injektion.



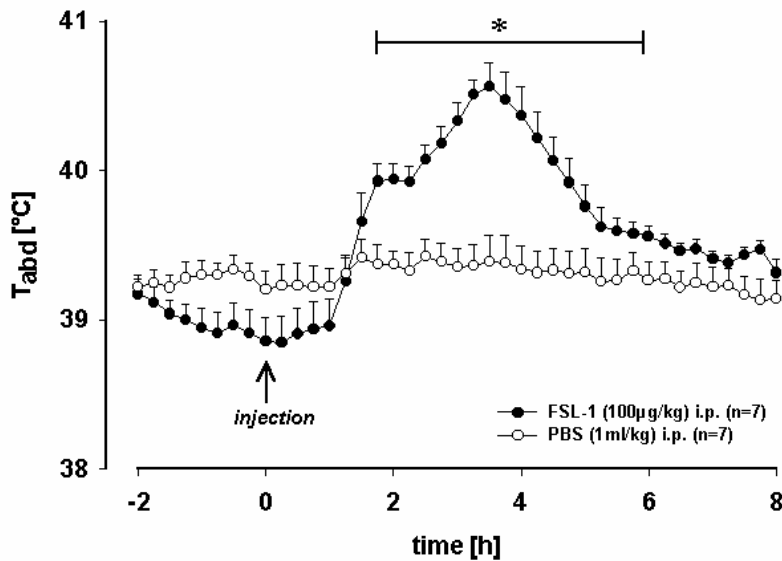


Abbildung 25: Dargestellt ist die Fieberkurve nach der Injektion von 100 µg/kg FSL-1 i.p. bei sieben Tieren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (n=7) (PBS 1 ml/kg i.p.). Im Zeitraum von +105 bis +360 Minuten war der Temperaturunterschied beider Gruppen signifikant.

### 3.1.2.1.2 Hohe Dosis

Bei der Injektion von 1000 µg/kg FSL-1 (n=3) i.p. kam es zunächst zu einer biphasischen Fieberreaktion, die der bei Gabe der niedrigen Dosis ähnelte (Abbildung 26), allerdings war diese Erhöhung wegen der starken Streuung und der kleinen Gruppengröße nicht signifikant zu den Kontrolltemperaturen ( $P=0,1640$ ). Die Temperatur der Tiere stieg zunächst nach einer Stunde an und erreichte nach 1 ½ Stunden den ersten Peak, der bei  $39,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$  lag. Nach einem kurzen Abfall der Temperatur kam es nach weiteren 2 Stunden zu einem erneuten Peak von ebenfalls  $39,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Darauf fiel die Temperatur wieder ab und erreichte fast den Ausgangswert, stieg dann aber nach 5 ½ Stunden wiederum stetig an. Dieser Anstieg dauerte mehrere Stunden und erreichte seinen dritten Peak 10 ½ Stunden nach der Injektion ( $40,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ). Danach fiel das Fieber wieder und näherte sich erst nach weiteren 13 Stunden der physiologischen Ausgangstemperatur. Im Zeitraum zwischen 7 und 22 Stunden war die Erhöhung der Temperatur deutlich signifikant ( $P=0,0126$ ) gegenüber der Temperaturkurve der Kontrolltiere (n=4). Die Fieberreaktion auf die hohe Dosis fiel also wesentlich stärker aus als auf die niedrige Dosierung.

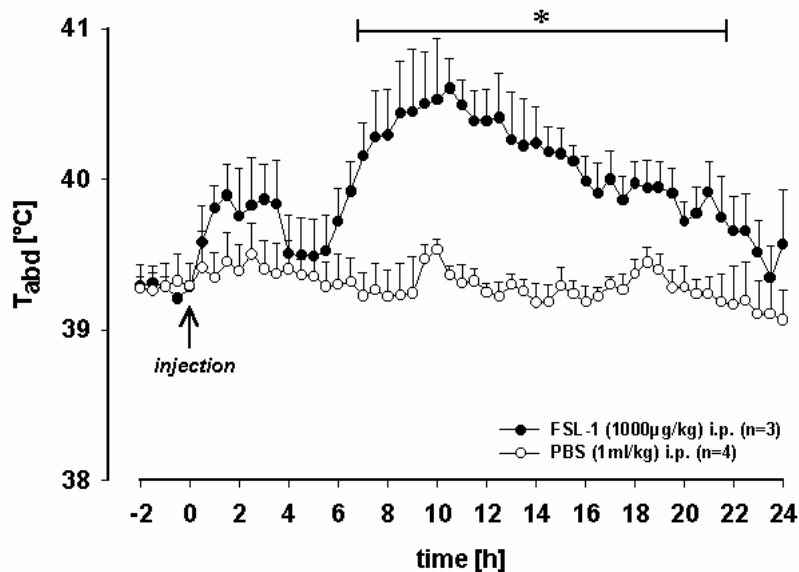


Abbildung 26: Dargestellt ist die Fieberkurve nach Injektion von 1000 µg/kg FSL-1 i.p. im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (PBS 1 ml/kg i.p.). Im Zeitraum zwischen 7 und 22 Stunden nach der Injektion von FSL-1 war die Temperaturerhöhung signifikant zu der Kontrollgruppe. Aufgrund der langen Dauer der Reaktion erfolgte die Datenaufzeichnung in halbstündlichen Abständen über 26 Stunden.

### 3.1.2.2 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Injektion verschiedener FSL-1-Dosierungen

#### 3.1.2.2.1 Plasmawerte von TNF

Bei der intraperitonealen Injektion von 100 µg/kg FSL-1 i.p. konnte, wie auch nach der intraarteriellen Injektion, trotz des unterschiedlichen Temperaturverlaufs nur nach 60 Minuten TNF gemessen werden und zwar in einer Höhe von  $1937 \pm 740$  pg/ml (Abbildung 27). Nach 120 Minuten waren nur bei 3 von 8 Tieren im Mittel noch  $1299 \pm 431$  pg/ml TNF nachweisbar. Im Gegensatz zu IL-6 zirkulierten 60 Minuten nach der intraperitonealen Stimulation mehr als 8000 pg/ml weniger TNF als nach der intraarteriellen Stimulation mit FSL-1.

Vergleicht man die Plasmawerte von TNF nach Injektion der niedrigen und der hohen Dosis FSL-1 i.p. (Abbildung 27) gab es nach 60 Minuten einen signifikanten Unterschied der Werte

( $P < 0,0001$ ). Diese lagen bei der hohen Dosis bei  $48054 \pm 11676$  pg/ml, bei der niedrigen Dosis wie erwähnt nur bei  $1937 \pm 740$  pg/ml. Bei der Injektion der äquivalenten Dosis i.a. zirkulierten im Vergleich hierzu mehr als 16600 pg/ml TNF weniger. Die Bildung von TNF fiel in die erste Anstiegsphase des Fiebers.

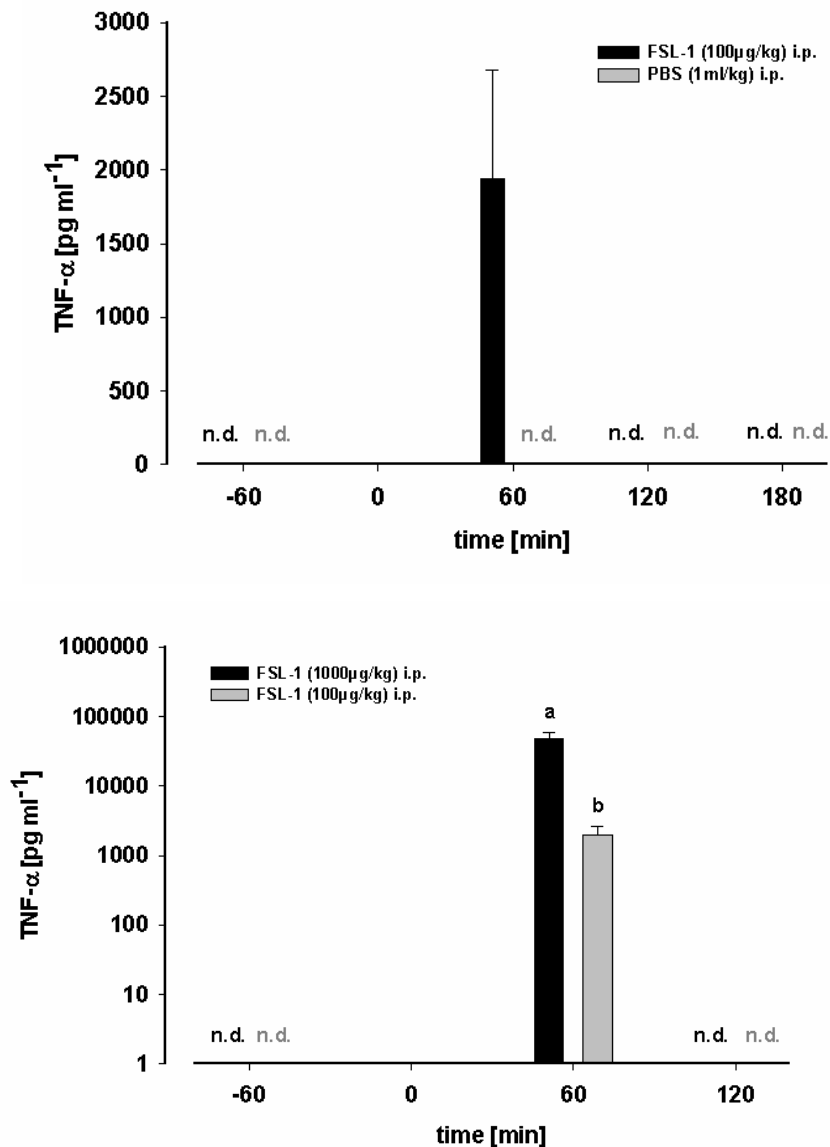
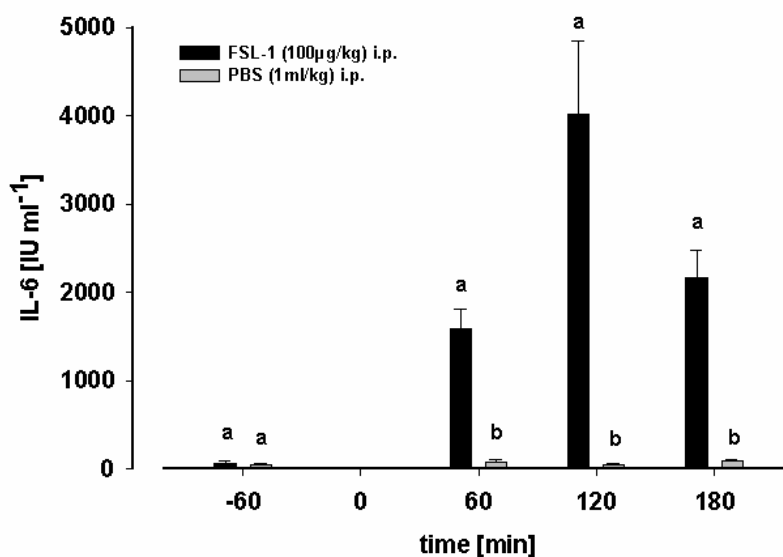


Abbildung 27: Plasmawerte von TNF nach Injektion von FSL-1 (100 μg/kg) bzw. PBS (1ml/kg) i.p. Darunter der Vergleich nach der Injektion der niedrigen und der hohen Dosierung. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen geben Aufschluß über die signifikanten Unterschiede zu den verschiedenen gemessenen Zeitpunkten. Aufgrund der nicht linearen Verteilung der Werte der Einzeltiere erfolgte bei dem Vergleich mit der hohen Dosis eine logarithmische Darstellung. Bei der hohen Dosis i.p. waren nur bei einem von 4 Tieren nach 120 Minuten noch 518 pg/ml TNF messbar.

### 3.1.2.2.2 Plasmawerte von IL-6

Bei der Injektion von FSL-1 (100 µg/kg) i.p. bzw. PBS (1 ml/kg) i.p. konnte zum Zeitpunkt -60 Minuten, wie zu erwarten, nur wenig IL-6 nachgewiesen werden (Abbildung 28). Zum Zeitpunkt +60 Minuten kam es dann aber bei den mit FSL-1 stimulierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg an IL-6 im Plasma ( $1296 \pm 202$  IU/ml) im Vergleich zu der Kontrollgruppe, der zu den Zeiten +120 ( $2513 \pm 338$  IU/ml) und +180 Minuten ( $2163 \pm 318$  IU/ml) sogar noch höher lag. Zu allen drei Zeitpunkten nach Injektion waren die Unterschiede an zirkulierendem IL-6 zwischen FSL-1- und PBS-behandelten Tieren hochsignifikant ( $P < 0,0001$ ). Zum Zeitpunkt +60 Minuten konnte schon ein erhöhter IL-6-Wert gemessen werden, obwohl noch kein Temperaturanstieg stattfand. Die höchsten gemessenen IL-6-Werte lagen bei 120 Minuten und fielen somit in die 1.Phase des Fiebers. Obwohl das Fieber danach in einer zweiten Phase weiter stieg, sanken die IL-6-Werte bereits wieder leicht ab. Der durchschnittlich gemessene IL-6 Wert nach der intraperitonealen Injektion war im Vergleich zu der Injektion der äquivalenten Dosis intraarteriell nach 60 und 180 Minuten deutlich höher, d.h. es wurde mehr IL-6 nach der intraperitonealen als nach der intraarteriellen Applikation gebildet. Dies gilt auch für die +60 Minuten Werte bei Gabe der hohen Dosis.

Bei der hohen Dosis konnte im Vergleich mit der niedrigen Dosis zum Zeitpunkt +60 Minuten ein signifikant höherer IL-6-Spiegel von  $10898 \pm 4089$  ( $P = 0,0004$ ) und zum Zeitpunkt +120 von  $447032 \pm 232090$  ( $P = 0,0001$ ) gemessen werden (Abbildung 28).



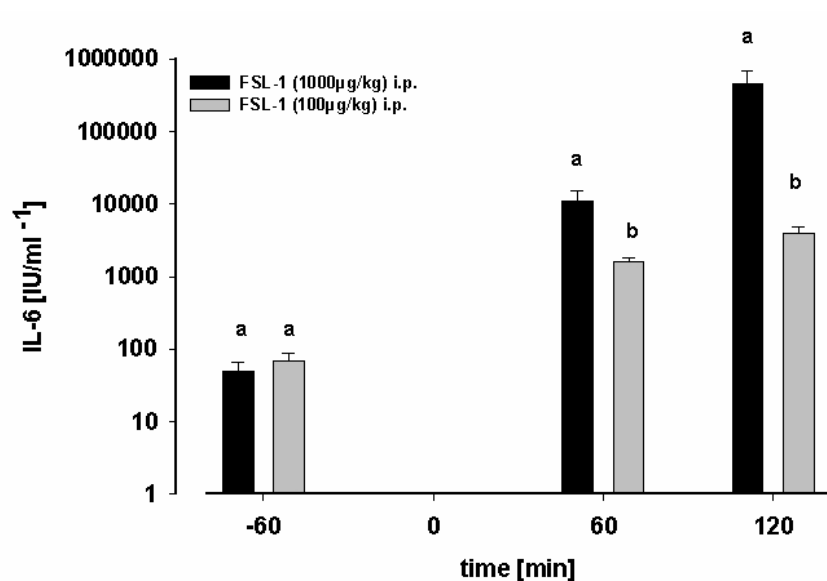


Abbildung 28: Plasmawerte von IL-6 nach Injektion mit FSL-1 (100µg/kg) bzw. PBS i.p. (obere Abbildung). In der unteren Abbildung sind die IL-6 Werte nach Applikation der niedrigen Dosis im Vergleich mit der hohen Dosis dargestellt. Hierfür wurde aufgrund der großen Unterschiede der Werte die logarithmische Darstellung gewählt. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zu den untersuchten Zeitpunkten.

### 3.2 Die Rolle von TNF bei der FSL-1 induzierten Fieberreaktion

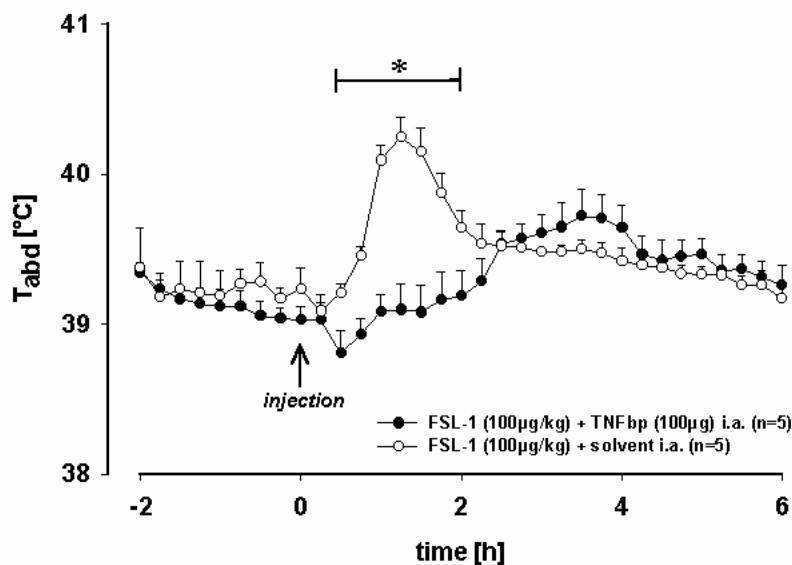
#### 3.2.1 Das TNF-Bindungsprotein (TNFbp, „TNF binding protein“)

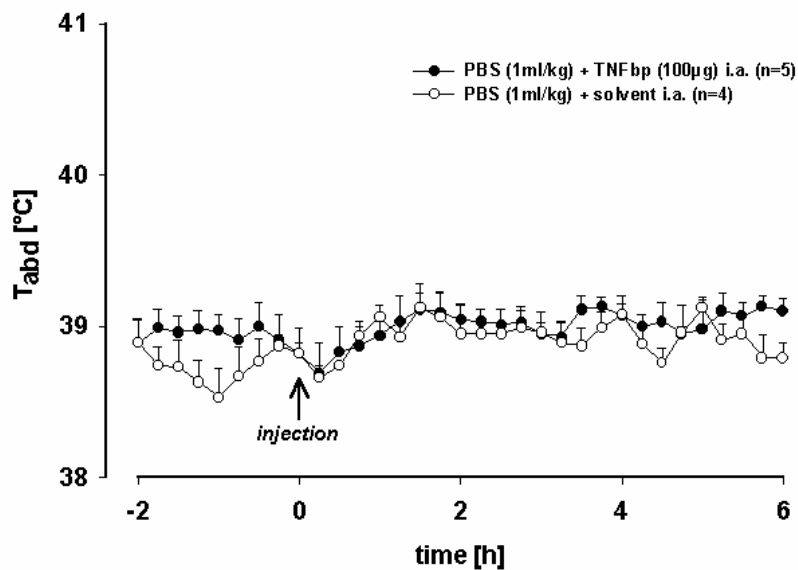
Um zu überprüfen, welche Rolle der Tumor Nekrose Faktor bei der Entstehung des Fiebers nach Stimulation mit FSL-1 und der Induktion anderer Zytokine, im speziellen von IL-6, spielt, wurden Versuche mit dem TNFbp (1.5.1.2) durchgeführt. Die Stimulation der Tiere erfolgte per Injektion von FSL-1 i.a. bzw. i.p. oder dem entsprechenden Lösungsmittel in Kombination mit dem TNFbp in einer einheitlichen Dosierung in einer Mischspritze.

### 3.2.1.1 Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp

Nach der Injektion von 100 µg/kg FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp (100 µg pro Tier) kam es bei den Tieren (n=5) zunächst nach 15 Minuten zu einem leichten Abfall der Temperatur um 0,2 °C, der aber nach einer weiteren Viertelstunde wieder ausgeglichen war. 120 Minuten nach der Injektion stieg die Temperatur leicht an auf einen Maximalwert von  $39,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$  zum Zeitpunkt 210 Minuten. Dieser Wert lag allerdings nur ca.  $0,5^\circ\text{C}$  über der physiologischen Normaltemperatur der Versuchstiere und fiel schon eine halbe Stunde später wieder ab. Diese Erhöhung war im Zeitraum von +165 bis +240 Minuten nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (n=5) ( $P=0,2756$ ), denen FSL-1 in Kombination mit dem Lösungsmittel für das TNFbp (0,9% NaCl, 1 ml/kg) injiziert wurde. Die Kontrolltiere zeigten die zu erwartende Fieberreaktion auf das FSL-1, d.h. es kam zu einem moderaten monophasischen Fieber, wie es in 3.1.1.1.1 bereits beschrieben wurde. Signifikant unterschiedlich war im Vergleich der beiden Gruppen der Zeitraum +30 bis +120 Minuten ( $P=0,0017$ ).

Auf die jeweiligen Kontrollinjektion von TNFbp + PBS (1 ml/kg) (n=5) bzw. solvent + PBS (n=4) zeigten die Tiere keine Veränderungen im physiologischen Temperaturverlauf (Abbildung 29).





**Abbildung 29:** Die in der oberen Abbildung dargestellte Kurve zeigt die Injektion von FSL-1 (100 µg/kg) in Kombination mit dem TNFbp (100 µg/Tier) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (FSL-1 + solvent). Signifikant unterschiedlich war die Temperaturkurve dieser beiden Gruppen im Zeitraum zwischen +30 und +120 Minuten. Das untere Bild zeigt die jeweiligen Kontrollen, denen PBS statt FSL-1 injiziert wurde.

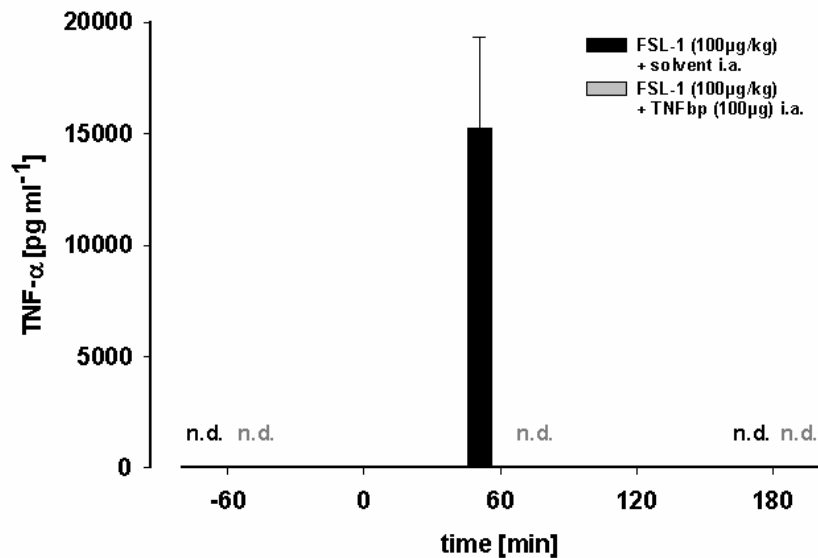
### 3.2.1.2 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp

#### 3.2.1.2.1 Plasmawerte von TNF

Während nach Injektion von FSL-1 (100 µg/kg) + solvent i.a. zu erwartende TNF-Werte in Höhe von durchschnittlich  $15264 \pm 4064$  pg/ml gemessen wurden, konnte nach Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp (100 µg/Tier) zum Zeitpunkt +60 Minuten kein TNF nachgewiesen werden (Abbildung 30). Das TNFbp vermochte es also, den gebildeten TNF vollständig (zumindest oberhalb der Nachweisgrenze) zu neutralisieren. Nach 180 Minuten war bei beiden Gruppen kein TNF mehr im Blutplasma nachweisbar. Bei den jeweiligen Kontrollinjektionen von PBS + TNFbp bzw. PBS + solvent konnte zu keinem Zeitpunkt TNF gemessen werden (nicht dargestellt).

### 3.2.1.2.2 Plasmawerte von IL-6

Nach der Injektion von FSL-1 (100 µg/kg) zusammen mit dem TNFbp (100 µg /Tier) i.a. kam es zum Zeitpunkt +60 Minuten zu einem signifikanten Unterschied der gemessenen durchschnittlichen IL-6-Werte im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe (Abbildung 30). Zum diesem Messzeitpunkt wurden durchschnittlich  $947 \pm 170$  IU/ml IL-6 gebildet, während es bei den mit FSL-1 + solvent (1 ml/kg NaCl) injizierten Tieren  $1928 \pm 249$  IU/ml waren ( $P=0,0100$ ). TNFbp konnte also offensichtlich auch die Produktion von IL-6 beeinflussen. Nach +180 Minuten lagen die Werte bei  $456 \pm 160$  bzw.  $686 \pm 167$  IU/ml, sie waren nicht signifikant unterschiedlich ( $P=0,2613$ ). Nach der Injektion von TNFbp in Kombination mit PBS bzw. von PBS + solvent i.a. konnte IL-6 nur im basalen Bereich zwischen 31 und 59 IU/ml gemessen werden (nicht dargestellt).





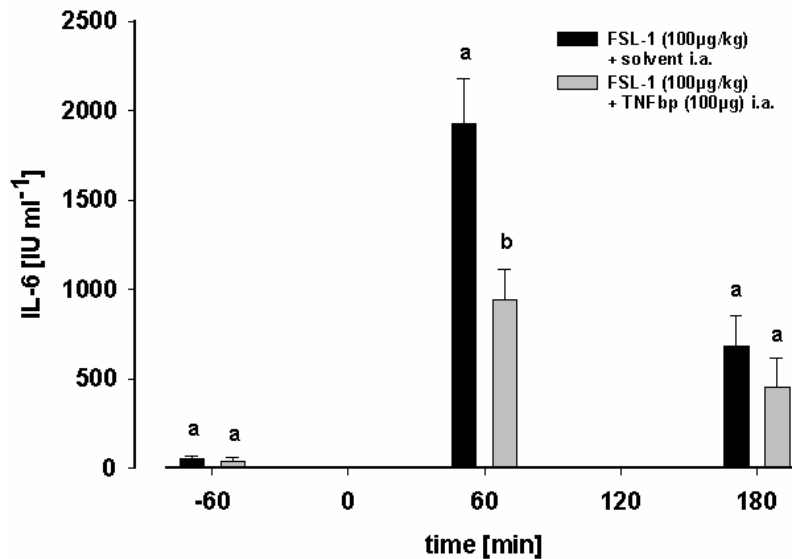


Abbildung 30: Die obere Abbildung zeigt die mittleren TNF-Werte zu den Zeitpunkten -60, +60 und +180 Minuten nach Injektion von FSL-1 (100 µg/kg) in Kombination mit TNFbp (100 µg/Tier) im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die FSL-1 und solvent erhielt. Hier war nur bei einem von fünf Tieren der Kontrollgruppe nach 180 Minuten noch ein TNF-Wert von 276 pg/ml messbar (nicht dargestellt). Die untere Abbildung zeigt die entsprechenden IL-6-Werte. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zu den untersuchten Zeitpunkten.

### 3.2.1.3 Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp

Während es bei der Kontrollgruppe (n=7), die FSL-1 (100 µg/kg) + solvent i.p. erhielt, zu einer erwartenden biphasische Reaktion auf diese Injektion kam (siehe 3.1.2.1.1), zeigten die Tiere, die FSL-1 in Kombination mit TNFbp (100 µg/Tier) i.p. erhielten (n=5), nur eine kurzzeitige moderate Erhöhung der Temperatur (Abbildung 31). Sie stieg leicht auf einen Höchstwert von  $39,7 \pm 0,4^\circ\text{C}$  nach 120 Minuten (1.Phase) an. Eine zweite Phase des Fiebers unterblieb fast völlig. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war die Temperatur im Zeitraum 135 bis 300 Minuten signifikant niedriger ( $P=0,0061$ ). Die Kontrolltiere, die PBS (1 ml/kg) und solvent erhielten (n=5), zeigten keine Temperaturänderung; diejenigen, die PBS und TNFbp (n=4) erhielten, hatten unmittelbar nach der Injektion einen kurzen Abfall der Körperkerntemperatur um  $0,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , der allerdings nach einer weiteren Viertelstunde wieder ausgeglichen war (Abbildung 31).

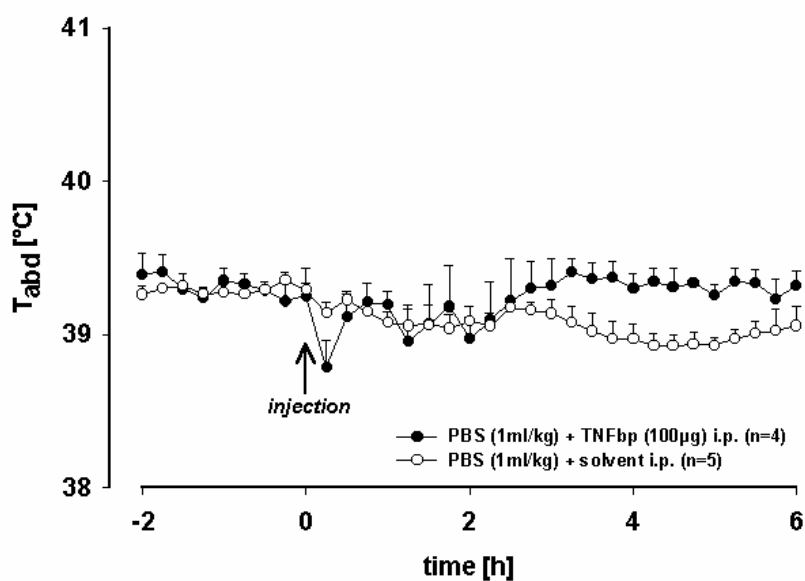
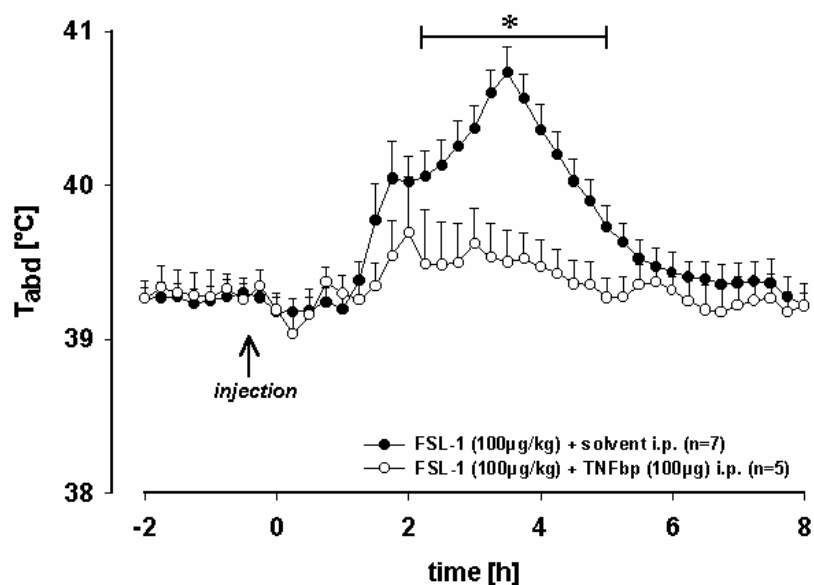


Abbildung 31: Die obere Abbildung zeigt die Fieberreaktion auf die Injektion von FSL-1 (100µg/kg) in Kombination mit TNFbp i.p. im Vergleich zu der Temperatur der Kontrolltiere, die FSL-1 + solvent erhielten. Die untere Abbildung zeigt die Temperaturkurven der Tiere nach den jeweiligen Kontrollinjektionen über sechs Stunden. Bei der Abweichung der Kurven im Zeitraum nach 165 Minuten handelte es sich um Schwankungen im Bereich der physiologischen Körpertemperaturen der Versuchstiere.

### **3.2.1.4 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit TNFbp**

#### **3.2.1.4.1 Plasmawerte von TNF**

TNF konnte nach Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass das gebildete TNF wie auch bei der intraarteriellen Stimulation komplett gebunden und dadurch neutralisiert wurde, zumindest oberhalb der Nachweisgrenze von 6 pg/ml. Bei der Kontrollgruppe, die FSL-1 + solvent erhielt, kam es hingegen zu einem erwarteten Anstieg nach 60 Minuten auf einen durchschnittlichen Wert von  $4213 \pm 2011$  pg/ml. Bei einem von vier Tieren dieser Gruppe war auch nach 120 Minuten noch ein erhöhter TNF-Wert von 1331 pg/ml messbar (Abbildung 32).

#### **3.2.1.4.2 Plasmawerte von IL-6**

Während bei den Tieren, die FSL-1 und solvent i.p. erhielten, IL-6 nach 60 Minuten in Höhe von  $2184 \pm 387$  IU/ml und nach 120 Minuten in Höhe von  $5517 \pm 1285$  IU/ml gemessen wurde, waren die Werte bei den Tieren, die FSL-1 in Kombination mit TNFbp erhielten, zu beiden Zeitpunkten signifikant niedriger (Abbildung 32). Sie lagen nach 60 Minuten durchschnittlich bei  $837 \pm 138$  IU/ml ( $P=0,0168$ ) und nach 120 Minuten im Mittel bei  $1261 \pm 166$  IU/ml ( $P=0,0021$ ). Diese Ergebnisse korrespondieren mit der abgeschwächten Fieberreaktion der Tiere.

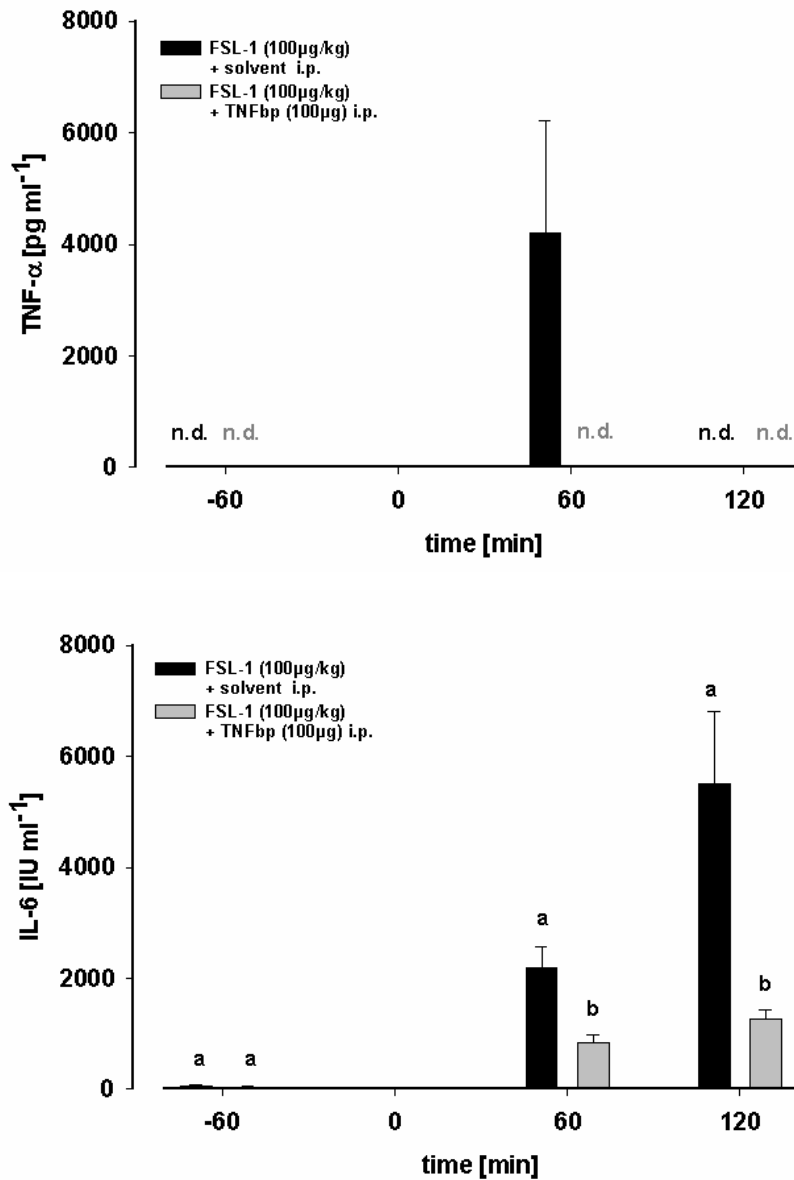


Abbildung 32: Dargestellt sind die gemessenen TNF- bzw. IL-6-Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem TNFbp oder solvent i.p. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zu den jeweiligen Messzeitpunkten zeigen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen an.

### **3.3 Die Rolle der Zyklooxygenasen bei der FSL-1-induzierten Fieberreaktion**

#### **3.3.1 Der unselektive Zyklooxygenase Hemmer Diclofenac**

Um den Einfluß der Zyklooxygenasen im Fiebergeschehen und bei der Induktion proinflammatorischer Zytokine nach Applikation des exogenen Pyrogens FSL-1 zu überprüfen, wurde der unselektive Zyklooxygenasehemmer (1.7.1) Diclofenac eingesetzt. Diclofenac wurde in einer Konzentration von 500 µg/kg eingesetzt und zusammen mit FSL-1 oder dem entsprechenden Lösungsmittel in einer Mischspritze aufgezogen und injiziert.

##### **3.3.1.1 Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem COX-Inhibitor Diclofenac**

Nach Stimulation der Tiere mit FSL-1 (100 µg/kg) in Kombination mit Diclofenac (500 µg/kg) i.a. (n=7) kam es zu keiner Veränderung der Temperatur (Abbildung 33). Das Fieber wurde somit vollständig unterdrückt, da die Kontrollgruppe (n=5), die FSL-1 + solvent (1 ml/kg 95% NaCl+ 5% Ethanol) i.a. erhielt, eine zu erwartende Fieberreaktion wie in 3.1.1.1.1 beschrieben zeigte. Die Temperaturunterschiede der beiden Gruppen waren im Zeitraum von +60 bis +240 Minuten signifikant (P=0,002). Sowohl die Injektion von PBS (1 ml/kg) zusammen mit Diclofenac (n=5) als auch die Injektion von PBS + solvent (n=5), hatten keinerlei Auswirkungen auf die Körpertemperatur der Tiere (Abbildung 33).

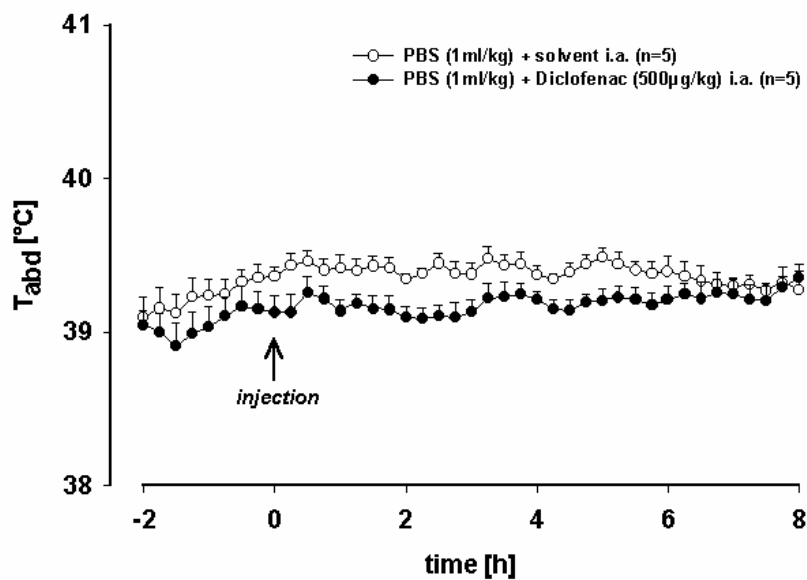
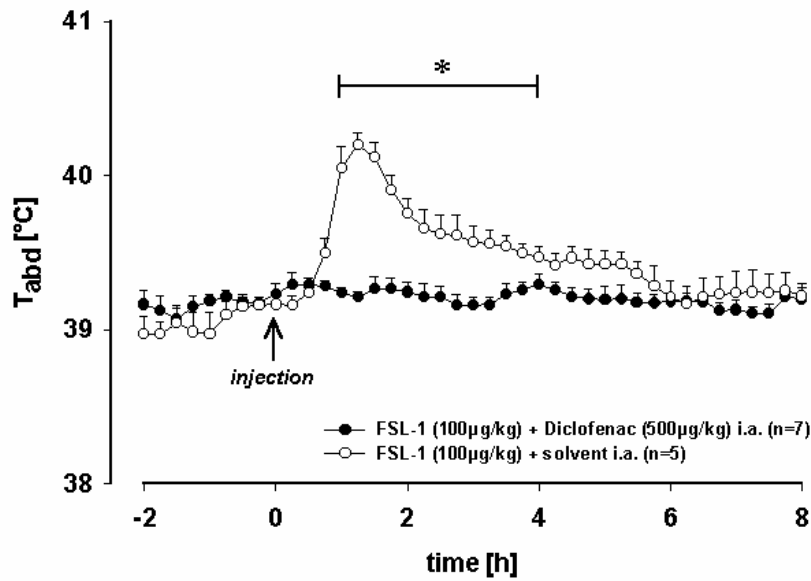


Abbildung 33: Darstellung der Fieberverläufe nach Injektion von FSL-1 (100 µg/kg) in Kombination mit dem unselektiven COX- Inhibitor Diclofenac (500 µg/kg) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (obere Abbildung), die auf die Injektion von FSL-1 (100µg/kg) + solvent eine erwartete Fieberantwort zeigte. Die Temperaturverläufe waren im Zeitraum von +60 bis +240 Minuten signifikant unterschiedlich. Die untere Abbildung zeigt die jeweiligen Kontrollen, bei denen es keine Veränderung der Temperatur gab.

### **3.3.1.2 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraarterieller Injektion von FSL-1 in Kombination mit Diclofenac**

#### **3.3.1.2.1 Plasmawerte von TNF**

TNF konnte nur 60 Minuten nach der Applikation von FSL-1 i.a. in Kombination mit Diclofenac bzw. FSL-1 in Kombination mit dem Lösungsmittel gemessen werden (Abbildung 34). Die Werte lagen hier bei  $6429 \pm 1999$  bzw. bei  $5056 \pm 1338$  pg/ml. Der Unterschied war nicht signifikant ( $P=0,9281$ ). Obwohl Diclofenac offensichtlich in der Lage war, die Fieberentstehung zu unterdrücken, wurde sogar etwas mehr TNF bei den Tieren gebildet, die den COX-Inhibitor erhielten als bei den Tieren, die mit FSL-1 und solvent behandelt wurden. Nach 180 Minuten konnte in keiner der Plasmaproben der Tiere beider Gruppen TNF nachgewiesen werden. Dasselbe galt für die Proben der Tiere der Kontrollgruppen zu allen überprüften Zeitpunkten (nicht dargestellt).

#### **3.3.1.2.2 Plasmawerte von IL-6**

Zu beiden gemessenen Zeitpunkten, nämlich +60 als auch +180 Minuten nach Injektion, gab es zwar einen leichten Unterschied der Durchschnittswerte zwischen den beiden Gruppen, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 34). So lag der durchschnittlich gemessenen Wert nach +60 Minuten bei  $1902 \pm 316$  bzw. bei  $1345 \pm 310$  IU/ml ( $P=0,3732$ ), und nach +180 Minuten bei  $1032 \pm 198$  bzw. bei  $769 \pm 249$  IU/ml ( $P=0,4249$ ). Obwohl Diclofenac offensichtlich das Fieber zu unterdrücken vermochte, wurde durchschnittlich bei den Tieren, die FSL-1 und Diclofenac erhielten, sogar etwas mehr IL-6 gebildet als nach der Kontrollinjektion. Bei den jeweiligen Kontrollgruppen, die PBS + Diclofenac bzw. PBS + solvent erhielten, wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten nur basale IL-6-Spiegel gemessen (nicht dargestellt).

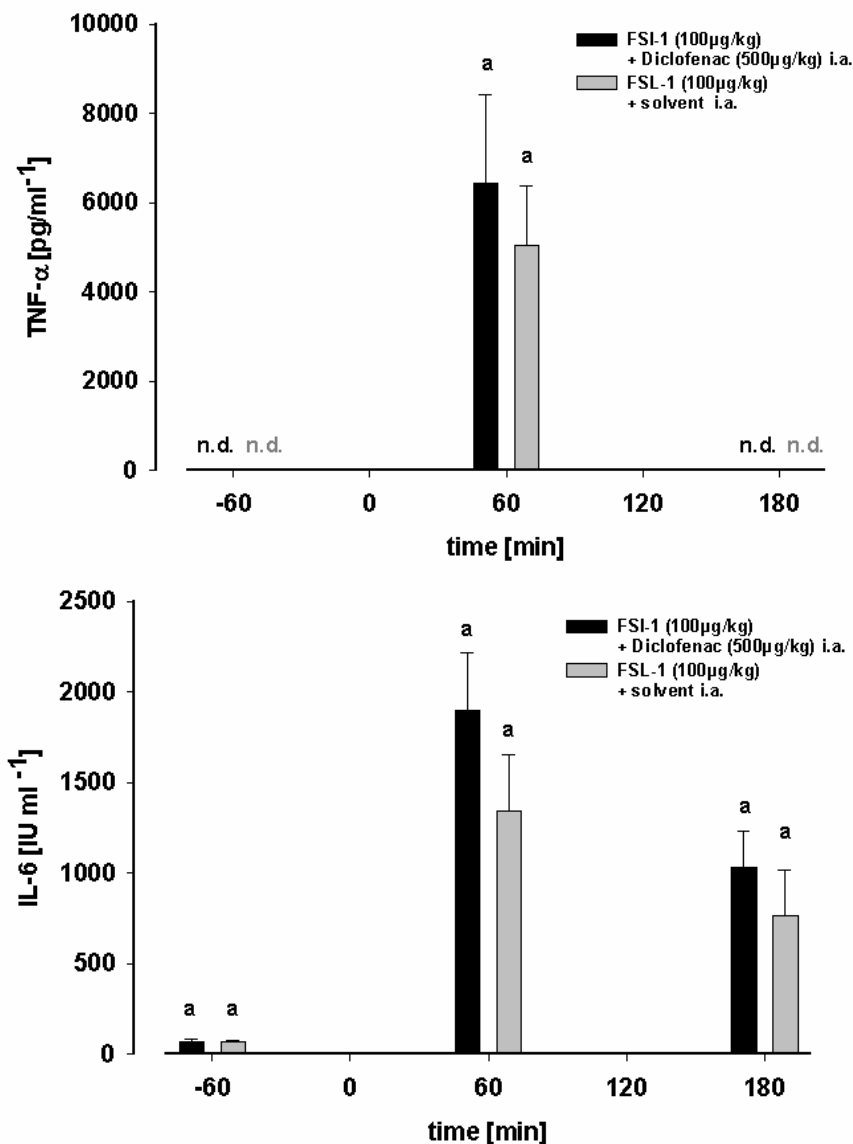


Abbildung 34: Die Abbildung zeigt die gemessenen TNF- bzw. IL-6- Werte zu den Zeitpunkten -60, +60 und +180 Minuten vor bzw. nach der i.a. Injektion von 100 μg/kg FSL-1 in Kombination mit 500 μg/kg Diclofenac bzw. FSL-1 + solvent. Zu keinem Zeitpunkt lagen signifikante Unterschiede bezüglich der Zytokin-Werte zwischen den beiden Gruppen vor.

### 3.3.1.3 Verlauf der Körperkerntemperatur nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem COX-Inhibitor Diclofenac

Wie auch bei der intraarteriellen Injektion von FSL-1 (100 μg/kg) in Kombination mit Diclofenac (500 μg/kg) (n=5) kam es nach der intraperitonealen Injektion zu keiner Veränderung der Körpertemperatur, während die Kontrolltiere (n=5), die FSL-1 in



Kombination mit solvent (1 ml/kg 95% NaCl + 5% Ethanol) erhielten, ein wie bereits in 3.1.2.1.1 beschriebenes Fieber ausbildeten. Die Temperaturverläufe der beiden Gruppen war im Zeitraum zwischen +90 und +360 Minuten signifikant unterschiedlich ( $P=0,0028$ ). Diclofenac war offensichtlich also auch bei der intraperitonealen Applikation in der Lage, die Entstehung des Fiebers vollständig zu unterdrücken. Sowohl die Injektion von PBS (1 ml/kg) zusammen mit Diclofenac ( $n=5$ ) als auch die Injektion von PBS + solvent ( $n=5$ ) als Kontrolle, hatten wie auch bei der intrarteriellen Injektion keinerlei Auswirkungen auf die Körpertemperatur der Tiere (Abbildung 35).

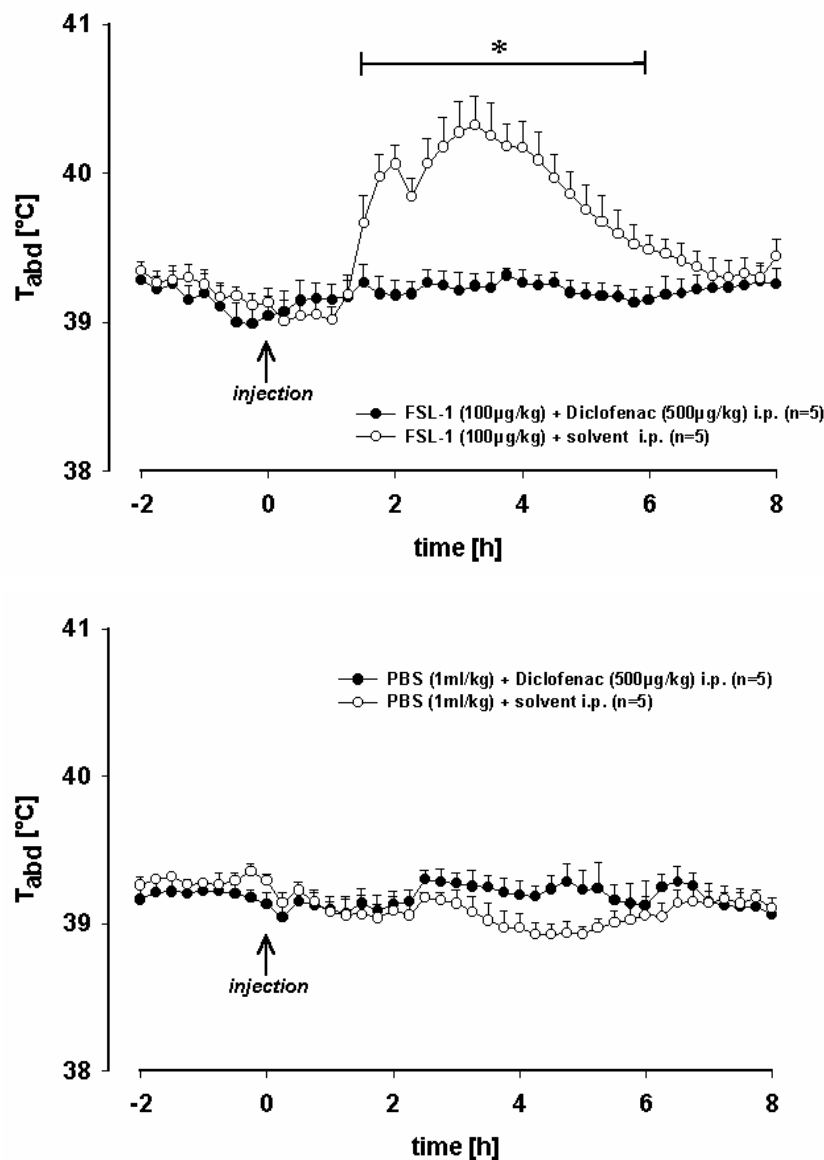


Abbildung 35: Die obere Abbildung zeigt den Temperaturverlauf nach Injektion von 100 µg/kg FSL-1 in Kombination mit 500 µg/kg Diclofenac i.p. im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die FSL-1 in Kombination mit solvent erhielt. Der unterschiedliche Temperaturverlauf bei den

beiden Gruppen war im Zeitraum von +90 bis +360 Minuten signifikant. Die untere Abbildung zeigt die jeweiligen Kontrollen, denen PBS anstelle von FSL-1 injiziert wurde.

### **3.3.1.4 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit Diclofenac**

#### **3.3.1.4.1 Plasmawerte von TNF**

60 Minuten nach der Injektion von FSL-1 mit Diclofenac i.p. lag der gemessene TNF Spiegel bei durchschnittlich  $726 \pm 426$  pg/ml. Zum selben Zeitpunkt lag er nach Injektion von FSL-1 in Kombination mit solvent bei  $1077 \pm 170$  pg/ml (Abbildung 36). Der Unterschied zwischen beiden Werten war nicht signifikant ( $P=0,3417$ ). Nach 120 Minuten war in beiden Gruppen nur noch bei wenigen einzelnen Tieren TNF im Plasma messbar. Bei den Kontrollgruppen (PBS + Diclofenac und PBS + solvent) konnte zu keinem Zeitpunkt TNF nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

#### **3.3.1.4.2 Plasmawerte von IL-6**

Vor der Injektion von FSL-1 in Kombination mit oder ohne Diclofenac lagen die IL-6-Werte im basalen Bereich. 60 Minuten nach der Injektion kam es dann in beiden Gruppen, also sowohl bei den Tieren, die FSL-1 und Diclofenac erhielten als auch bei denen, die FSL-1 + solvent injiziert bekamen, zu einem Anstieg von IL-6 im Blut. Erstere Gruppe erreichte einen Mittelwert von  $1127 \pm 216$  IU/ml, letztere von  $1313 \pm 376$  IU/ml. Nach 120 Minuten waren die Werte sogar noch weiter angestiegen, nämlich im Durchschnitt auf  $2087 \pm 651$  bzw.  $2333 \pm 333$  IU/ml (Abbildung 36). Sowohl nach 60 als auch nach 120 Minuten waren die Plasmaspiegel der Einzeltiere weder nach Gabe von FSL-1 ohne COX-2 Hemmer noch nach FSL-1 in Kombination mit Diclofenac signifikant erhöht oder erniedrigt ( $P=0,9736$ , bzw.  $P=0,4529$ ). Bei den Kontrolltieren, die PBS + Diclofenac bzw. PBS + solvent erhielten, wurde IL-6 nur im basalen Bereich zwischen 50 und 80 IU/ml gemessen (nicht dargestellt).

Zusammenfassend kann man sagen, dass wie auch bei der entsprechenden intraarteriellen Injektion trotz der Unterdrückung des Fiebers die Bildung der Zytokine IL-6 und TNF nicht beeinträchtigt wurde.

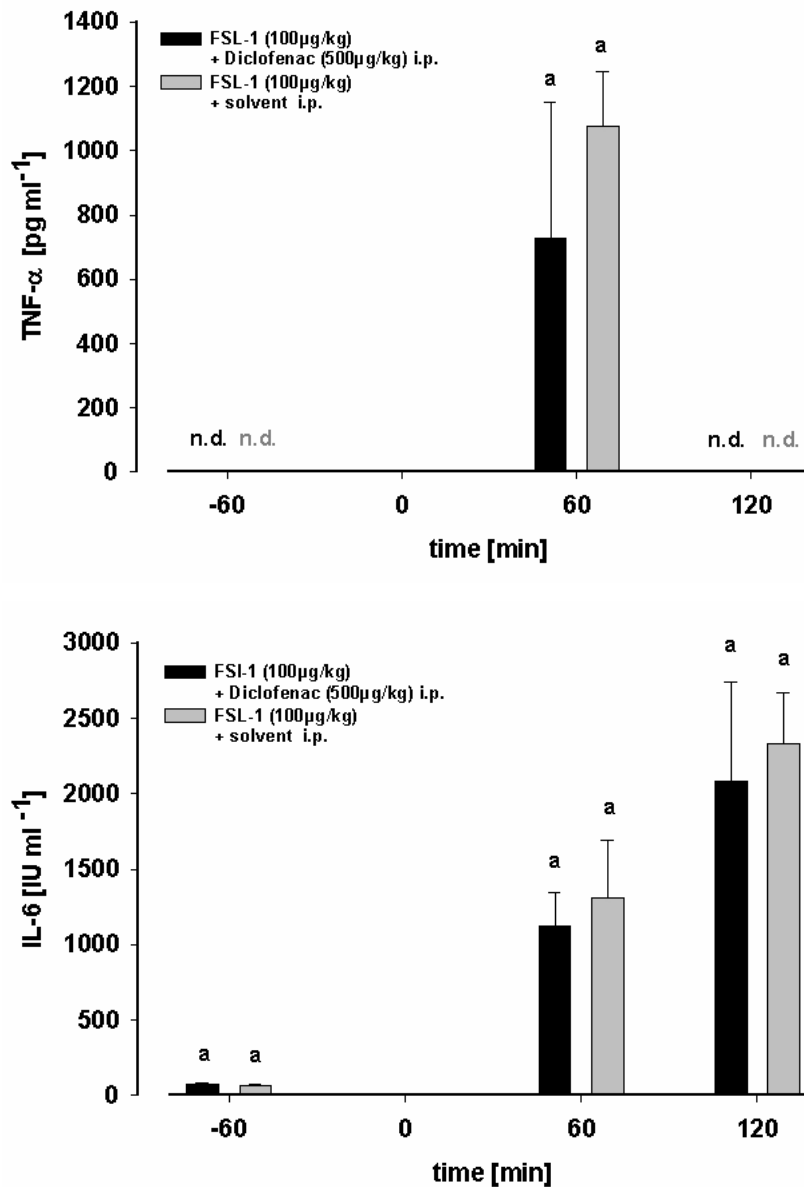


Abbildung 36: Die Abbildungen zeigen den gemessenen TNF (oben) und das gemessene IL-6 (unten) zu verschiedenen Messzeitpunkten nach der intraperitonealen Injektion von FSL-1 zusammen mit Diclofenac im Vergleich zu der Injektion von FSL-1 + solvent. Nach 120 Minuten waren in der ersten Gruppe noch bei 2 von 5 Tieren noch  $772,5 \pm 63,5$  und in der zweiten Gruppe ebenfalls bei 2 von 5 Tieren noch  $981,5 \pm 190,5$  pg/ml TNF nachweisbar. Die gleichen Buchstaben über den Säulen zeigen, dass die verglichenen Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich waren.

### **3.3.1.5 Bildung von PGE<sub>2</sub> nach intraarterieller und intraperitonealer Injektion von FSL-1 in Kombination mit dem Zyklooxygenasehemmer Diclofenac**

Es ist bekannt, dass Diclofenac es vermag, die Zyklooxygenase zu hemmen und dadurch antipyretisch und analgetisch zu wirken. Mit den folgenden Messungen der zirkulierende PGE<sub>2</sub>-Spiegel sollte sichergestellt werden, dass dieser bekannte Mechanismus auch für FSL-1 gilt, da sowohl bei der intraarteriellen als auch intraperitonealen Stimulation das Fieber durch die zusätzliche Gabe von Diclofenac vollständig unterdrückt wurde.

#### **3.3.1.5.1 Intraarterielle Injektion**

60 Minuten nach der Injektion von FSL-1 in Kombination mit solvent waren im Mittel  $656 \pm 152$  pg/ml PGE<sub>2</sub> messbar, während nach den Injektionen mit FSL-1 in Kombination mit Diclofenac ( $124 \pm 23$  pg/ml), PBS und Diclofenac ( $101 \pm 23$  pg/ml) oder PBS und solvent ( $143 \pm 21$  pg/ml) signifikant weniger ( $P=0,0025$ ,  $P=0,0114$ ,  $P=0,0070$ ) PGE<sub>2</sub> messbar war. Ebenso verhielt es sich nach 180 Minuten (Abbildung 37). Hier waren nach der Stimulation mit FSL-1 und solvent mit  $611 \pm 174$  pg/ml signifikant mehr PGE<sub>2</sub> nachweisbar als nach FSL-1 mit Diclofenac ( $135 \pm 31$  pg/ml,  $P=0,0107$ ), PBS und Diclofenac ( $90 \pm 23$  pg/ml,  $P=0,0257$ ) oder PBS und solvent ( $164 \pm 42$  pg/ml,  $P=0,0277$ ).

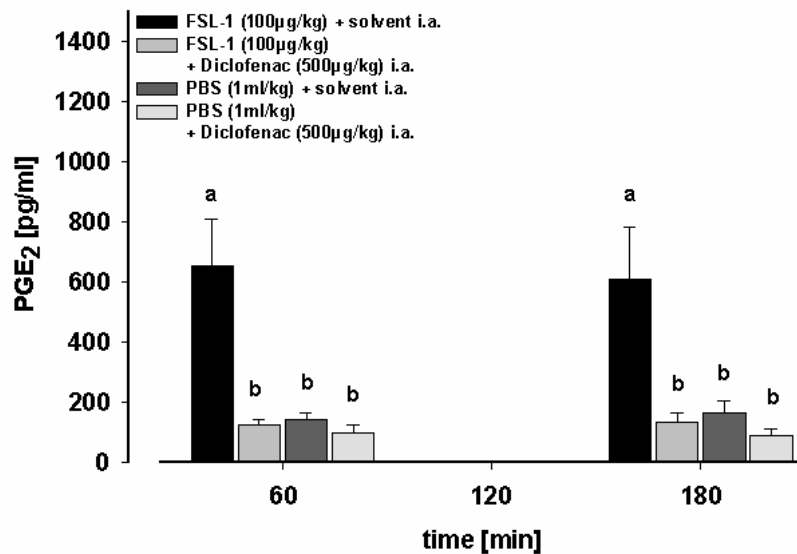


Abbildung 37: Die Abbildung zeigt zirkulierendes PGE<sub>2</sub> 60 und 180 Minuten nach den Injektionen von FSL-1 mit und ohne Diclofenac i.a. und den zugehörigen Kontrollen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten an.

### 3.3.1.5.2 Intraperitoneale Injektion

Die PGE<sub>2</sub>-Werte lagen nach der intraperitonealen Injektion von FSL-1 und solvent nach 60 Minuten bei  $222 \pm 19$  pg/ml, zwar niedriger als bei der intraarteriellen, aber signifikant höher als nach den Injektionen von FSL-1 und Diclofenac ( $117 \pm 20$  pg/ml,  $P=0,0006$ ), PBS und Diclofenac ( $105 \pm 14$  pg/ml,  $P=0,0008$ ) oder PBS und solvent ( $116 \pm 18$  pg/ml,  $P=0,0044$ ). Ebenso verhielt es sich nach 180 Minuten. Hier lagen die Durchschnittswerte nach Injektion von FSL-1 und solvent bei  $249 \pm 38$  pg/ml, somit ebenfalls signifikant höher als nach der Applikation von FSL-1 und Diclofenac ( $117 \pm 20$  pg/ml,  $P=0,0162$ ), PBS und Diclofenac ( $105 \pm 14$  pg/ml,  $P=0,0081$ ) oder PBS und solvent ( $120 \pm 15$  pg/ml,  $P=0,0146$ ).

Nur bei der Stimulation mit FSL-1 und solvent konnte bei beiden Applikationsarten also ein erhöhter PGE<sub>2</sub>-Spiegel im Plasma gemessen werden, der nach 180 Minuten noch aufrecht gehalten wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung des PGE<sub>2</sub> für die Mitwirkung am FSL-1 induzierten Fieber.

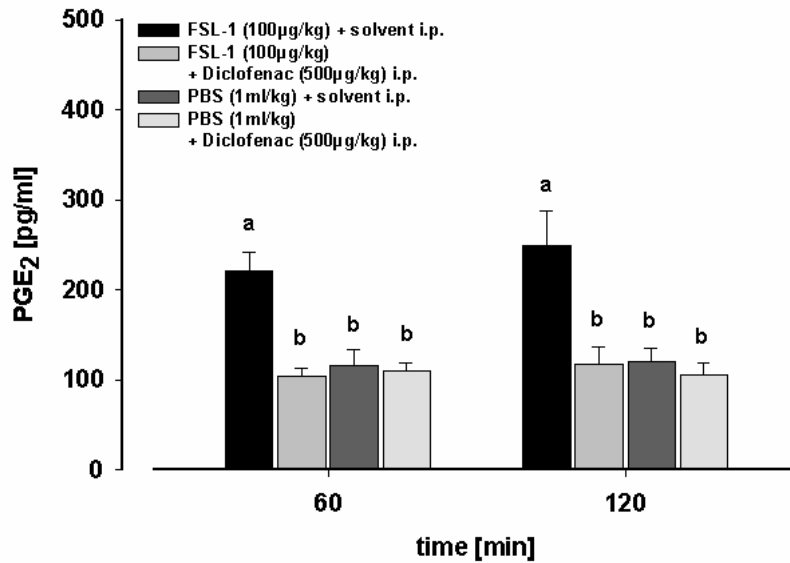


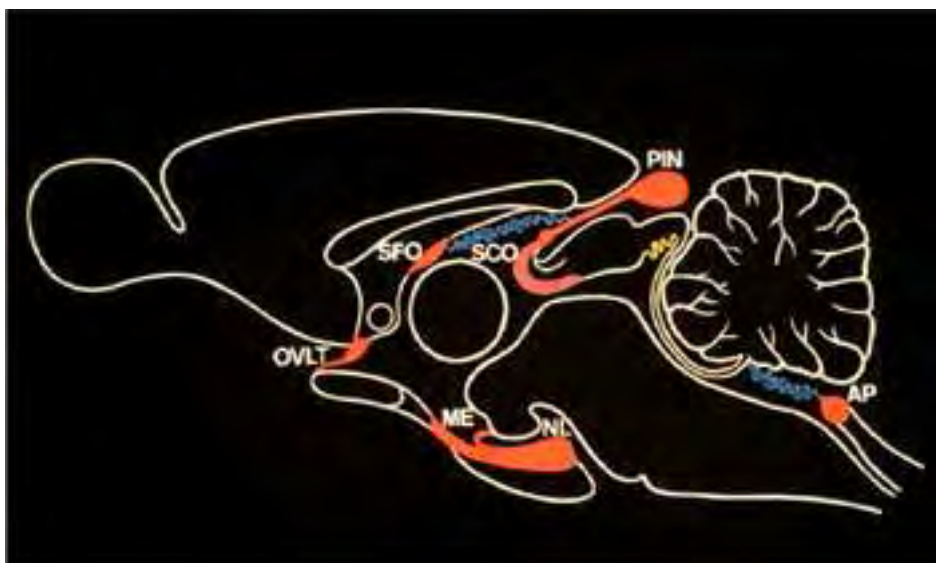
Abbildung 38: Die Abbildung zeigt zirkulierendes PGE<sub>2</sub> 60 und 180 Minuten nach den Injektionen von FSL-1 mit und ohne Diclofenac i.p. und den zugehörigen Kontrollen. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten an.

### 3.4 Aktivierung fieberrelevanter ZNS-Strukturen nach Injektion von FSL-1

#### 3.4.1 Nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 nach systemischer Stimulation von Meerschweinchen mit FSL-1

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt fünf Tiere eingesetzt. Drei von ihnen wurde FSL-1 in einer Dosierung von 100 µg/kg i.a. injiziert und die Tiere dann nach 120 Minuten perfundiert und die Gehirne entnommen. Als Kontrolle dienten zwei weitere Tiere, denen 1 ml/kg PBS injiziert wurde. Um sicherzustellen, dass die FSL-1 behandelten Tiere Fieber bekamen, wurde im Zeitraum von -120 bis +120 Minuten, also bis zum Zeitpunkt der Perfusion, mit Hilfe der intraperitonealen Sender (2.1.4) die Körperkerntemperatur aufgezeichnet (nicht dargestellt). Außerdem wurde von den Tieren vor der Perfusion noch eine Blutprobe zur Ermittlung des aktuellen IL-6-Spiegels genommen. Die Fieberkurven und gemessenen IL-6-Werte entsprachen den in 3.1.1.1 bzw. 3.1.1.2.2 beschriebenen Ergebnissen. Anhand der durchgeführten Immunhistochemie sollte nun gezeigt werden, ob das im Blut zirkulierende IL-6 zur Aktivierung von Zellen über den Transkriptionsfaktor

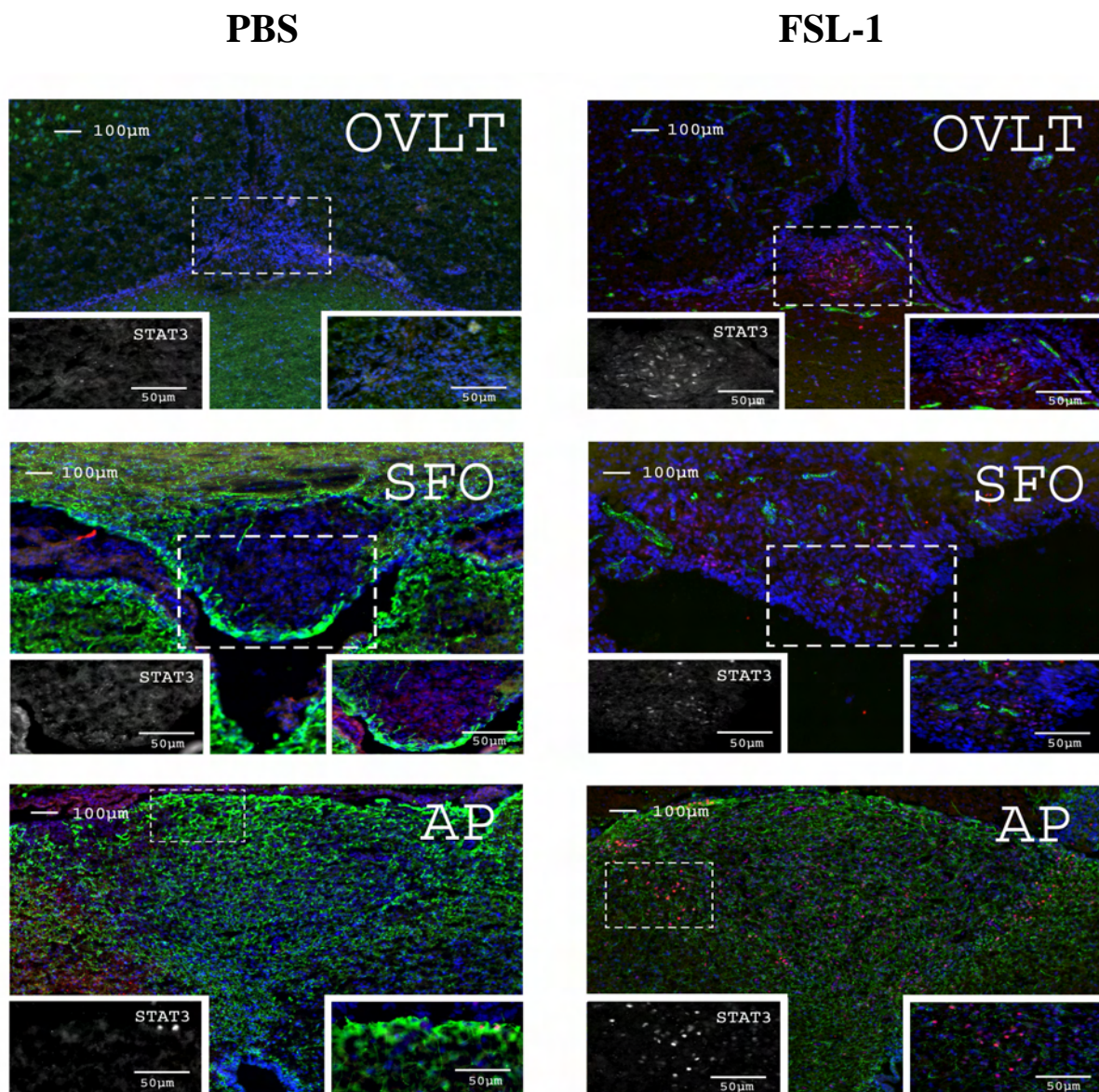
STAT3 und damit möglicherweise zur Entstehung von Fieber beiträgt. Die Regionen, denen in dieser Hinsicht besonders viel Beachtung geschenkt wurde, waren die in 1.8.2.1 beschriebenen CVOs, denen eine Blut-Hirn-Schranke fehlt. Hierzu zählen das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), das Subfornicalorgan (SFO) und die Area postrema (AP), weil diese Regionen verglichen mit den Kontrollgruppen die stärksten nukleären Translokationen von STAT3 aufwiesen. Es wurden auch weitere Strukturen wie etwa der Plexus chorioideus, die Eminentia mediana oder der Nucleus arcuatus analysiert, allerdings gab es dort nur eine sehr schwache und undeutliche Expression von nukleären STAT3 Signalen. Daher wurden sie im Weiteren nicht berücksichtigt. In Abbildung 39 sind in einem schematischen Querschnitt durch das Gehirn diese Strukturen zu lokalisieren. Zudem konzentrierte sich die Auswertung der STAT3-Signale auf Endothelien, die natürlich im gesamten Gehirn zu finden waren. Auch bei den Kontrolltieren fanden sich vor allen Dingen in den Meningen und im Endothel des Cortex immer einige wenige zytoplasmatische und nukleäre STAT3-Signale.



**Abbildung 39:** Die Abbildung zeigt einen schematischen Querschnitt des Gehirns. Die rot gekennzeichneten Areale gehören in die Gruppe der CVOs, die bis auf das Subcommissuralorgan (SCO), keine Blut-Hirn-Schranke besitzen. (ME-Median Eminence, PIN-Pineal Gland, SFO-Subfornicalorgan, OVLT-Organum vasculosum laminae terminalis, AP-Area postrema, NL-Neurohypophyse)

Die Teilergebnisse der Immunhistochemie sind in Abbildung 40 dargestellt. Es handelt sich um die drei oben beschriebenen Regionen in verschiedenen Vergrößerungen. In der linken

Spalte befinden sich Bilder der Gehirnschnitte von Kontrolltieren, die PBS i.a. erhielten, in der rechten Spalte Bilder von Gehirnschnitten der Tiere, die mit FSL-1 i.a. stimuliert waren. Im direkten Vergleich ist deutlich zu erkennen, dass die Applikation von PBS keine oder nur sehr wenige nukleäre STAT3-Translokationen hervorrief. Die Applikation von FSL-1 i.a. hingegen resultierte in einer Zunahme der STAT3-positiven Zellkerne, das gilt insbesondere für die AP und das OVLT. Während die Verteilung der Signale im OVLT und SFO eher homogen war, fanden sie sich in der AP vor allem in den Randbereichen. Von allen CVOs fand sich im SFO die niedrigste Dichte an STAT3 positiven Zellkernen.



**Abbildung 40:** Dargestellt sind hier die drei sensorischen CVO's: OVLT, SFO und AP. Die linke Spalte zeigt die genannten Areale nach der Kontrollinjektion mit PBS. Als Marker wurden



eingesetzt (von oben nach unten:) NeuN, GFAP und wiederum GFAP. In der rechten Spalte sind diese Regionen 120 Minuten nach Stimulation der Tiere mit FSL-1 i.a. gezeigt. Hier wurden von oben nach unten folgende Marker verwendet: vW, wiederum vW und GFAP. Es lässt sich erkennen, dass es bei den stimulierten Tieren deutliche STAT3-Signale (rot) in den CVO's auftraten, während bei den Kontrolltieren sehr wenige bis gar keine STAT3-Signale zu erkennen waren. Am ehesten fanden sich Signale im OVLT und in der AP. Blau gefärbt sind die Zellkerne, grün sind die Endothelzellen, Neurone, bzw. Astrozyten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die nukleäre STAT3-Translokation in den CVOs des Meerschweinchens im Zusammenhang mit den zirkulierenden Konzentrationen an IL-6 zu stehen scheint, d.h. die Translokation erfolgte korrespondierend zu den ansteigenden IL-6-Werten nach Stimulation mit FSL-1 i.a.

### **3.4.2 Kolokalisation der nukleären STAT3 Translokation mit verschiedenen zellulären Phänotypen**

Um zu ermitteln, welche verschiedenen Zelltypen durch FSL-1 induziertes IL-6 zu einer nukleären STAT3-Translokation angeregt werden, wurde der immunhistchemische Nachweis der Kolokalisation nukleärer STAT3-Signale mit Markerproteinen verschiedener Gehirnzellphänotypen durchgeführt.

#### **3.4.2.1 vW positive Endothelzellen**

Endotheliale STAT3 Signale konnten im ganzen Gehirn nachgewiesen werden. Abbildung 41 zeigt oben links einen mittels Immunfluoreszenz angefärbten Schnitt im Bereich des Cortex. Hier wurde ein Endothel angeschnitten, in dem man durch die Übereinanderlagerung der Aufnahmen eine Kolokalisation der STAT3-Signale in den Zellkernen von Endothelzellen erkennen kann. Die roten Signale in den blau gefärbten Zellkernen der grünen Endothelzellen sind besonders auf der 100fachen Vergrößerung gut erkennbar. Das Gehirnendothel scheint also eine erste und bedeutende Zielstruktur des durch FSL-1 induzierten IL-6 zu sein. Auch in Endothelzellen im Bereich der CVOs waren nukleäre STAT3-Signale nachweisbar. Exemplarisch ist dies für das OVLT in Abbildung 41 dargestellt.

### 3.4.2.2 GFAP –positive Astrozyten

Obwohl es auch im Cortex eine beträchtliche Zahl an Astrozyten gibt, gab es scheinbar nur in den CVOs Kolokalisationen mit STAT3-Signalen. Im Cortex schienen hauptsächlich die Endothelzellen Angriffspunkt für FSL-1 induziertes IL-6 und der damit verbundenen Aktivierung von STAT3 zu sein. Astrozytäre Kolokalisationen waren generell viel seltener zu finden als endotheliale. In Abbildung 41 sind vereinzelte aktivierte Astrozyten in den CVOs (hier: OVLT und AP) zu erkennen.

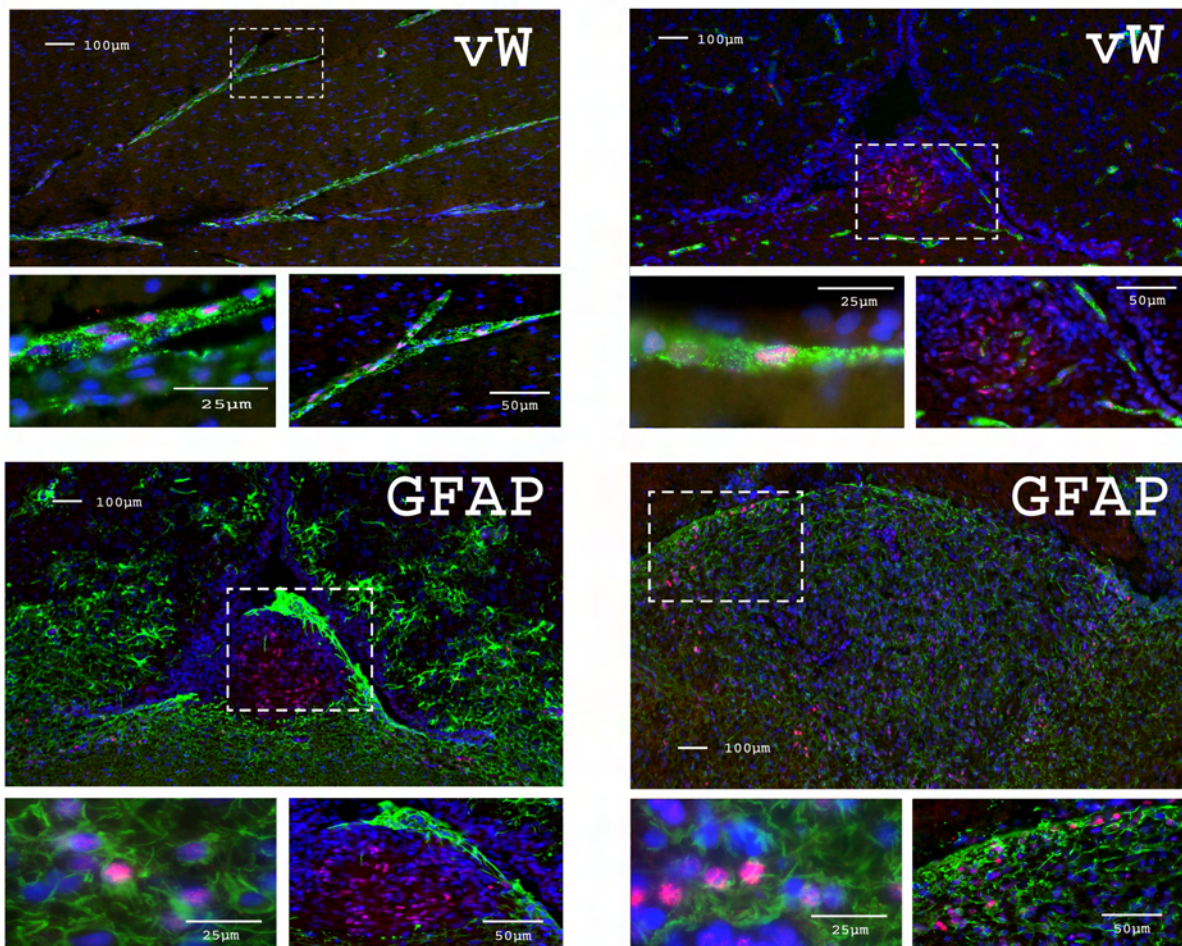


Abbildung 41: Die beide oberen Abbildungen zeigen die Kolokalisation von nukleären (Zellkerne=blau, DAPI) STAT3-Signalen (rot) mit dem endothelialen Marker vW (grün) 120 Minuten nach Stimulation der Tiere mit FSL-1 i.a. Das linke Bild zeigt ein Endothel aus dem Cortex, das rechte ein Endothel aus dem OVLT. Die beiden unteren Abbildungen zeigen die Kolokalisationen von nukleären STAT3-Signalen mit dem astrozytären Marker GFAP (grün). Das linke Bild zeigt das OVLT, das rechte die AP.

### **3.4.2.3 NeuN-positive Zellen**

Um zu überprüfen, ob in den sensorischen CVOs auch Neurone über den STAT3-Signalweg nach i.a. Injektion von FSL-1 aktiviert werden, wurden Kollokalisationsstudien von STAT3 mit dem neuronalen Zellmarker NeuN durchgeführt.

Der verwendete neuronale Marker griff aber leider bei den verwendeten Versuchstieren nicht in den CVOs (daher sind diese Bilder nicht dargestellt). In anderen Regionen konnten allerdings Neurone mit dem Marker nachgewiesen werden (siehe Abbildung 40). Studien an Ratten und Mäusen belegen eindeutig die Anwesenheit dieser Zellen in den entsprechenden Regionen. Warum sie also nur dort beim Meerschweinchen nicht markiert wurden, bleibt zunächst offen. Daher konnte in der vorliegenden Studie auch keine Aussage über eine eventuelle Lokalisation von nukleären STAT3-Signalen in Neuronen gemacht werden, umgekehrt ist es natürlich nicht auszuschließen, dass es solche gibt.

## **3.5 Toleranzerscheinungen gegenüber wiederholter Stimulation mit FSL-1 und Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS**

Da es bei verschiedenen Pyrogenen das Phänomen einer Toleranzentwicklung bei wiederholter Applikation gibt, wurde dies auch für FSL-1 und LPS sowohl nach intraarterieller als auch intraperitonealer Injektion untersucht.

Um zu überprüfen, ob die Tiere auf wiederholte Injektionen mit FSL-1 (100 µg/kg) bzw. LPS (10 µg/kg) eine Toleranz entwickeln und ob sich vielleicht sogar eine Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS ausbildet, wurden den Tieren diese Substanzen im Abstand von jeweils drei Tagen injiziert. Zur Messung von IL-6 und TNF wurden bei den intraarteriellen Injektionen Blutproben zu den Zeitpunkten -60, +60 und +180 Minuten genommen, bei den intraperitonealen Injektionen zu den Zeitpunkten -60, +60 und +120 Minuten. Die Einhaltung eines Abstandes von drei Tagen zwischen den einzelnen Injektionen wurde von früher durchgeführten Toleranzstudien übernommen. In einem Vorversuch wurde exemplarisch die tägliche Injektion mit 10 µg/kg LPS i.a. getestet. Sie brachte allerdings keine unterschiedlichen Ergebnisse zu dem drei-Tage-Rhythmus.

### 3.5.1 Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von FSL-1

Den Versuchstieren (n=5) wurde im Abstand von drei Tagen FSL-1 (100 µg/kg) in den in der A. carotis liegenden Katheter injiziert. Es kam nach allen Injektionen zu einer Fieberreaktion (Abbildung 42), wie sie schon in Abschnitt 3.1.1.1.1 beschrieben wurde, d.h. zu einem schnellen monophasischen, aber moderaten Fieber.

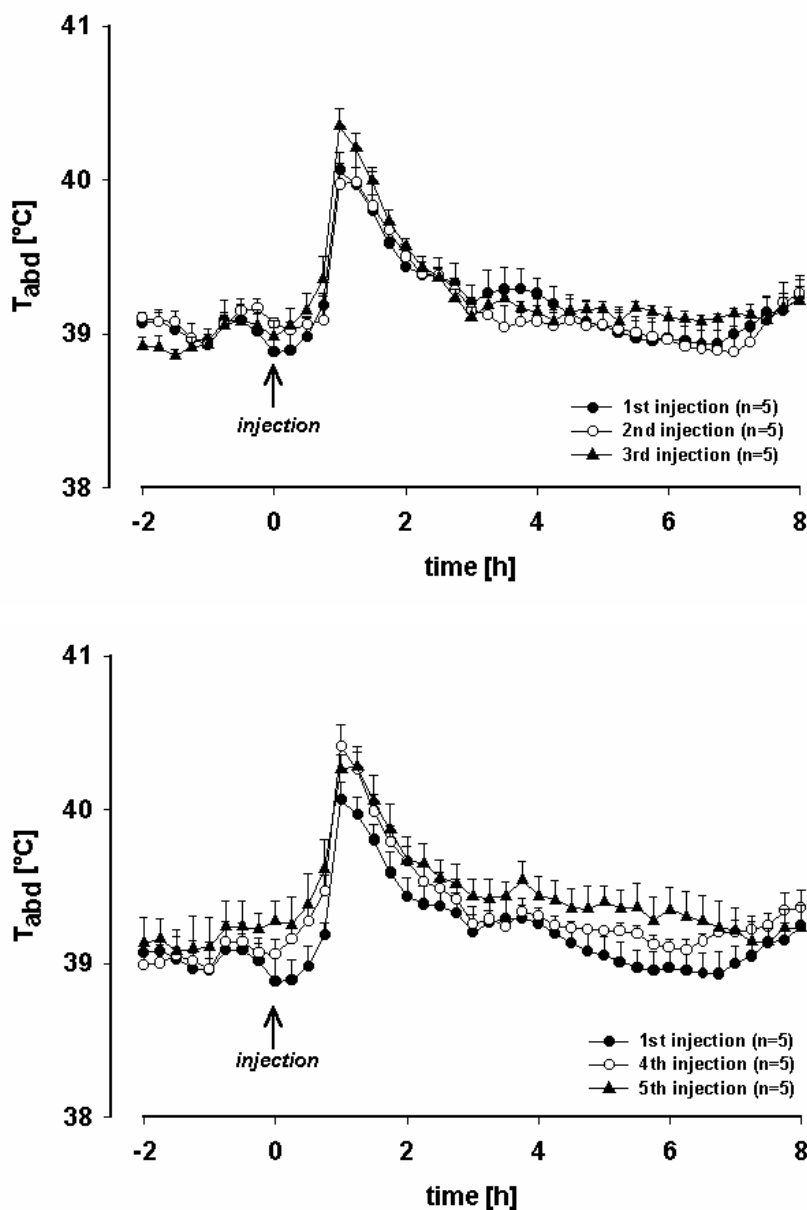


Abbildung 42: Die beiden Teilabbildungen zeigen die Temperaturverläufe nach der 1., 2. und 3. (obere) bzw. 1., 4. und 5. (untere) Injektion von FSL-1 (100 µg/kg). Zwischen den jeweiligen Injektionen lagen je drei Tage. Die Kurven waren zueinander nicht signifikant unterschiedlich.

Keine der in Abbildung 42 gezeigten Temperaturkurven unterschied sich signifikant von den anderen. Die dazugehörigen statistisch mittels der zweifaktoriellen ANOVA und dem Scheffé Test ermittelten F- und P-Werte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Die in der Tabelle angegebenen Werte fassen den statistischen Vergleich der in Abb. 42 gezeigten Kurven zusammen. Die Temperaturen nach den verschiedenen Injektionen wurden gegeneinander mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Scheffé Test verglichen. Dargestellt sind die errechneten F- und P-Werte. Im Fall der fünfmaligen Applikation von FSL-1 gab es keine signifikanten Unterschiede der Temperaturkurven im Zeitraum von +30 bis +210 Minuten.**

	1.Injektion	2.Injektion	3.Injektion	4.Injektion
2.Injektion	F= 0.042 P= 0.8431			
3.Injektion	F= 0.424 P= 0.5330	F= 1.156 P= 0.3137		
4.Injektion	F= 1.567 P= 0.2460	F= 2.964 P= 0.1235	F= 0.825 P= 0.3904	
5.Injektion	F= 2.153 P= 0.1804	F= 3.235 P= 0.1098	F= 1.415 P= 0.2683	F= 0.285 P= 0.6077

### **3.5.2 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von FSL-1**

TNF konnte bei allen fünf Injektionen nur nach 60 Minuten nachgewiesen werden. Die Werte lagen bei  $8801 \pm 1900$  pg/ml bei der ersten Injektion, während die TNF-Spiegel nach der zweiten Injektion mit  $4731 \pm 1806$  pg/ml tendenziell niedriger und nach der dritten ( $P=0,0263$ ), vierten ( $P=0,0389$ ) und fünften ( $P=0,0300$ ) Injektion ( $3568 \pm 584,2$  pg/ml) sogar signifikant erniedrigt waren (Abbildung 43).

Bei allen fünf Injektionen waren sowohl nach 60 als auch nach 180 Minuten erhöhte zirkulierende IL-6-Spiegel zu messen. Bei den Plasmaproben nach 60 Minuten lag die gemessene Konzentration an IL-6 bei  $1504 \pm 367$  IU/ml bei der ersten Injektion und fiel dann bei jeder weiteren auf letztendlich  $706 \pm 178$  IU/ml bei der 5. Injektion kontinuierlich ab (Abbildung 43). Trotz des stetigen Abfalls waren die Werte nach keiner der wiederholten FSL-1 Injektionen signifikant erniedrigt. Nach 180 Minuten lagen die Werte bei der ersten Injektion bei nur noch  $367 \pm 70$  IU/ml und fielen bis zur fünften ebenfalls stetig ab auf 142

$\pm 46$  IU/ml. Der IL-6-Spiegel nach der ersten Injektion war zu diesem Zeitpunkt signifikant höher als nach der dritten ( $P=0,0337$ ), vierten ( $P=0,0206$ ) und fünften ( $P=0,0097$ ) Injektion.

Obwohl die Fieberkurven nahezu identisch waren, kam es bei den gemessenen Zytokinen zu einem z.T. signifikanten Abfall der mittleren Werte von der ersten bis hin zu fünften Injektion.

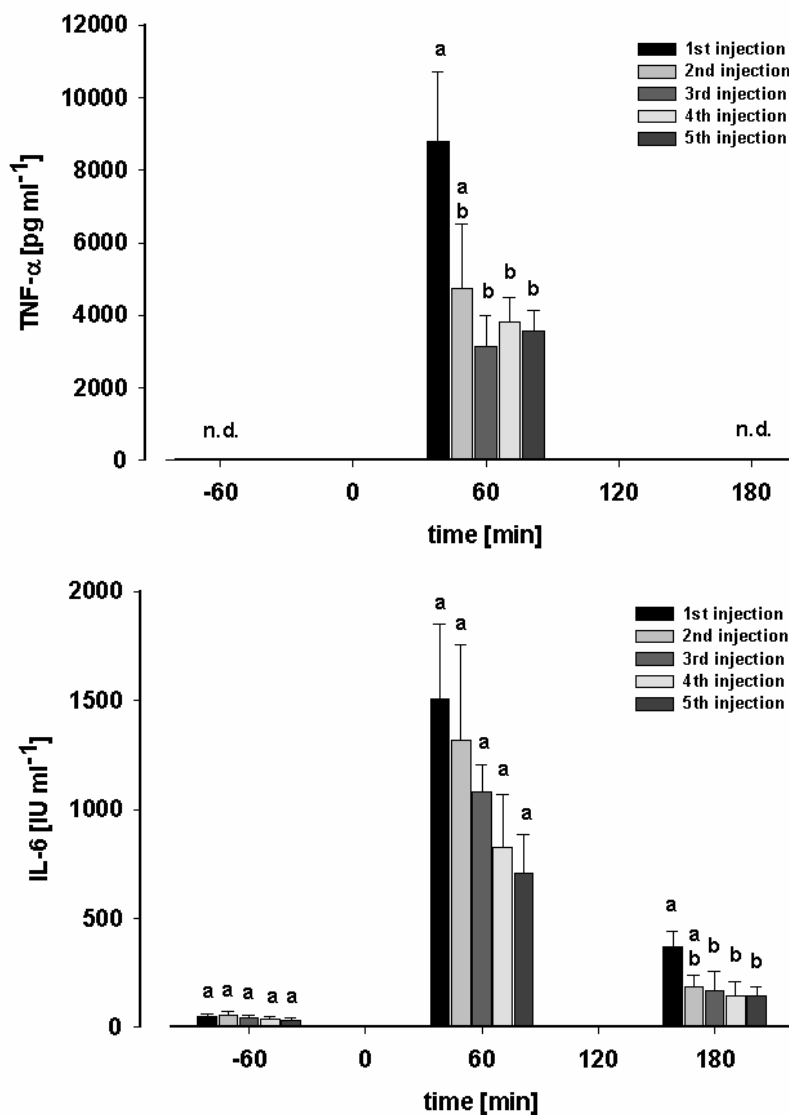


Abbildung 43: Die obere Abbildung stellt die durchschnittlich gemessenen TNF-Werte vor und nach fünf aufeinander folgenden FSL-1 i.a. Injektionen zu den Zeitpunkten -60, +60 und +180 Minuten dar. Bei allen fünf Injektionen konnte weder zum Zeitpunkt -60 noch +180 Minuten TNF im Plasma nachgewiesen werden. In der unteren Abbildung sind die entsprechenden IL-6-Werte abgebildet. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zu den untersuchten Zeitpunkten.

### 3.5.3 Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS bei intraarterieller Stimulation

Um festzustellen, ob es eine Kreuztoleranz zwischen FSL und LPS gibt, wurde den Tieren (n=4) drei Tage nach der fünfmaligen Injektion von FSL-1 i.a., LPS in einer Dosierung von 10µg/kg i.a. verabreicht. Die Fieberreaktion wurde dann mit derjenigen von naiven, d.h. nicht vorbehandelten Tieren, nach Injektion von 10 µg/kg LPS i.a. (n=6) verglichen (Abbildung 44). Die beiden Kurven waren im Zeitraum von 0 bis +360 Minuten nicht signifikant unterschiedlich (P=0,679), d.h. es wurde augenscheinlich keine Kreuztoleranz im Hinblick auf die durch LPS induzierte Fieberentwicklung ausgebildet.

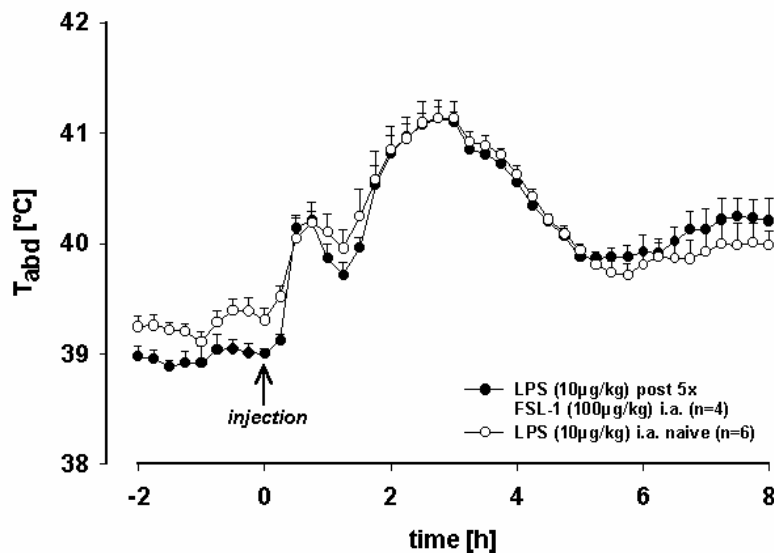


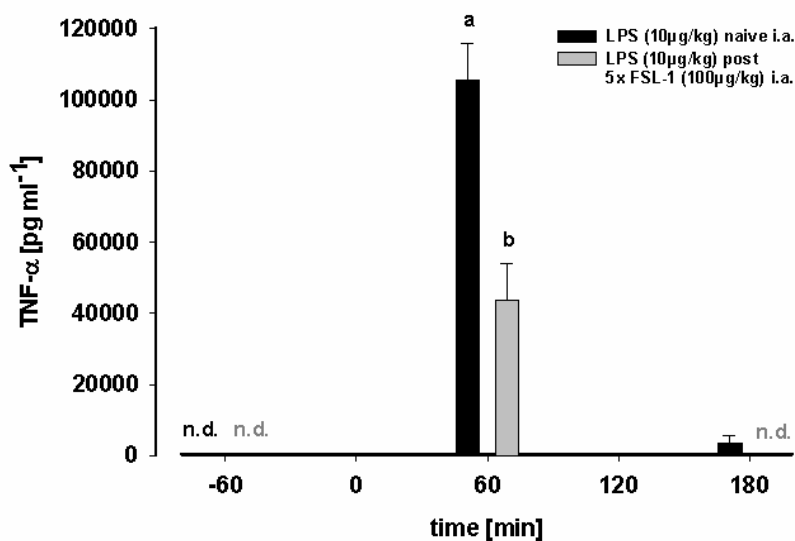
Abbildung 44: Die Abbildung stellt die Temperaturverläufe zur Untersuchung einer möglichen Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS dar. Hierzu wurde die Reaktion auf die LPS i.a. Injektion bei naiven Tieren mit derjenigen nach fünfmaliger FSL-1 i.a. Gabe verglichen. Die beiden Kurven waren nahezu identisch. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

### 3.5.4 Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 und TNF bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS nach intraarterieller Stimulation

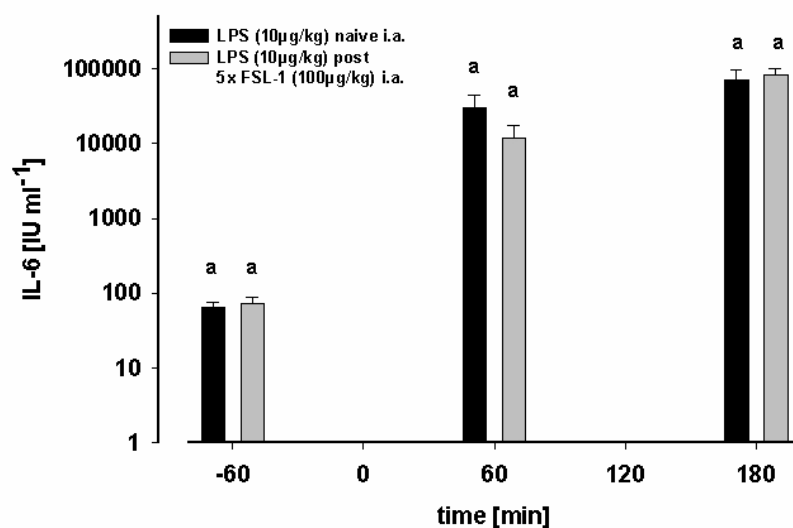
Der Vergleich der TNF-Werten bei naiven und fünf mal mit FSL-1 i.a. vorstimulierten Tieren ergab einen signifikanten Unterschied. Hier lag der mittlere Wert nach 60 Minuten bei der Injektion von LPS bei vorher unbehandelten Tieren mit  $105405 \pm 10615$  pg/ml signifikant

höher als bei den mit FSL-1 vorbehandelten Tieren ( $43671 \pm 10440$  pg/ml) ( $P=0,0057$ ). Zudem waren in den Proben der naiven Tiere 180 Minuten nach der Injektion noch durchschnittlich  $3556 \pm 2159$  pg/ml TNF enthalten, während bei den mit FSL-1 vorbehandelten Meerschweinchen kein TNF mehr nachweisbar war (Abbildung 45). Es schien sich also im Hinblick auf TNF eine Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS auszubilden.

Verglich man die Plasmawerte von IL-6 nach der naiven Injektion von LPS i.a. mit der Injektion von LPS nach vorheriger fünfmaliger Applikation von FSL-1 i.a., konnte zu den überprüften Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied der beider Werte festgestellt werden (Abbildung 45). Nach 60 Minuten lagen die durchschnittlichen Werte bei  $30608 \pm 13343$  bzw.  $12088 \pm 5512$  IU/ml (zwar deutlich niedriger, aber nicht signifikant:  $P=0,2020$ ), nach 180 Minuten bei  $72197 \pm 26353$  bzw.  $83651 \pm 19062$  IU/ml ( $P=0,9129$ ). Dieses Ergebnis korrespondiert zu den Fieberkurven (Abbildung 44).







**Abbildung 45:** Die obere Abbildung zeigt die durchschnittlichen TNF-Werte nach Injektion von LPS bei naiven Tieren im Vergleich zu den mit FSL-1 vorbehandelten Tieren, also der Injektion von LPS i.a. nach vorheriger fünfmaliger Gabe von FSL-1 i.a. Die obere Abbildung zeigt die entsprechenden IL-6-Werte. Die Darstellung erfolgte logarithmisch. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten an.

### 3.5.5 Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von LPS

Die Injektion der Tiere (n=6) erfolgte im Abstand von drei Tagen. Ihnen wurde eine Dosis von 10 µg/kg LPS i.a. injiziert. Die Reaktion hierauf zeigte sich als ein klassisches biphasisches Fieber, wie es in anderen Studien mit LPS schon oft gezeigt werden konnte (Abbildung 46). Es kam unmittelbar nach der Injektion (15 Minuten) zu einem Anstieg der Temperatur auf einen ersten Peak  $40,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$  nach 45 Minuten, danach fiel die Temperatur nur kurz ab um gleich darauf auf einen zweiten Peak von  $41,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$  nach 150 Minuten anzusteigen. Dann fiel die Temperatur langsam auf den Basalwert ab, der erst nach mehreren Stunden wieder erreicht wurde. Die erste bis hin zur fünften Injektion mit LPS verlief biphasisch, allerdings kam es ab der dritten Injektion zu einer Abschwächung der zweiten Phase, die im Zeitraum von +210 bis +360 Minuten im Vergleich zur ersten und zweiten Injektion signifikant niedriger war (Tabelle 12).

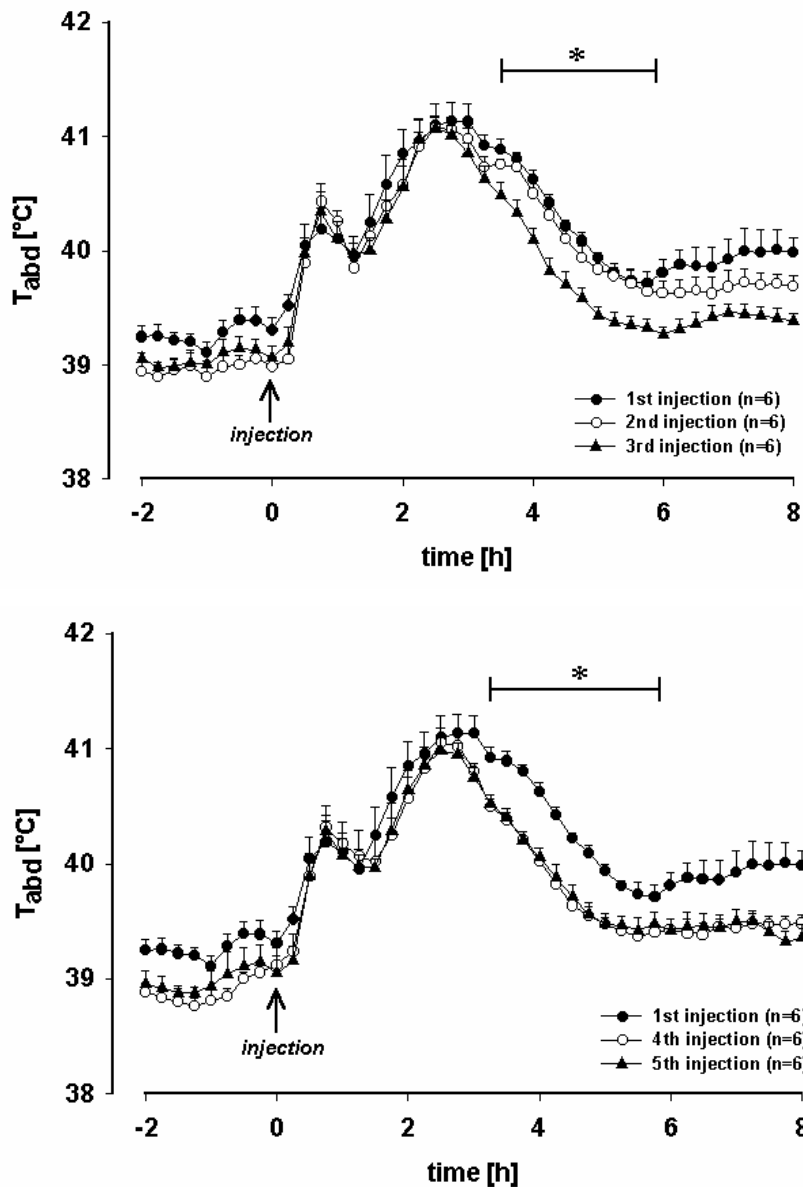


Abbildung 46: Die beiden Abbildungen zeigen den Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger Injektion von LPS ( $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i.a im Abstand von jeweils drei Tagen. Verglichen wurden die 1., 2. und 3. (obere) und die 1., 4 und 5. (untere) Injektion. Ab der dritten Injektion wurde die zweite Phase der biphasischen Fieberreaktion im Zeitraum von +210 bis +360 Minuten signifikant abgeschwächt.

**Tabelle 12:** Die in der Tabelle angegebenen F- und P-Werte fassen den statistischen Vergleich der in Abb. 46 gezeigten Fiebertverläufe zusammen. Sie wurden mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Scheffé post hoc Test errechnet. Anhand der fettgedruckten Schrift soll deutlich gemacht werden, dass die erste Kurve gegen die 3., 4. und 5., und die 2. Kurve gegen ebenfalls gegen die 3., 4. und 5. Kurve im überprüften Zeitraum von +210 bis +360 Minuten signifikant höher war.

	1.Injektion	2.Injektion	3.Injektion	4.Injektion
2.Injektion	F= 0.823 P= 0.3856			
3.Injektion	<b>F= 20.866</b> <b>P= 0.0010</b>	<b>F= 9.404</b> <b>P= 0.0119</b>		
4.Injektion	<b>F=35.318</b> <b>P= 0.0001</b>	<b>F=13.374</b> <b>P= 0.0044</b>	F= 5.944E-3 P= 0.9401	
5.Injektion	<b>F= 23.173</b> <b>P= 0.010</b>	<b>F= 9.859</b> <b>P= 0.0119</b>	F= 0.026 P= 0.8766	F=0.014 P= 0.9073

### 3.5.6 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraarterieller Injektion von LPS

Der durchschnittliche TNF-Wert 60 Minuten nach der ersten Applikation von LPS i.a. lag bei  $105405 \pm 10615$  pg/ml, fiel dann aber bei den weiteren Injektionen progressiv ab und war nach der dritten ( $39175 \pm 7037$  pg/ml) ( $P=0,0030$ ), vierten ( $P=0,0059$ ) und fünften ( $P=0,0002$ ) Injektion im Vergleich zur ersten LPS Stimulation signifikant erniedrigt (Abbildung 47). Im Gegensatz zu den FSL-1 i.a. Injektionen konnte TNF nach den LPS Stimulationen auch nach 180 Minuten nachgewiesen werden. Die Werte waren insgesamt niedriger als nach 60 Minuten und fielen ebenfalls von der ersten ( $3556 \pm 2159$  pg/ml) bis hin zur fünften Injektion ( $205 \pm 94$  pg/ml) stetig ab. Signifikant höher waren die Werte nach der ersten Injektion im Vergleich zur dritten ( $P=0,0273$ ) und die der zweiten zur dritten ( $P=0,0422$ ) Injektion.

Erwartungsgemäß wurden zum Zeitpunkt -60 Minuten nur basale IL-6 Werte gemessen. 60 Minuten nach der ersten Injektion von LPS i.a. wurden IL-6 Werte von  $30608 \pm 13343$  IU/ml gemessen. Bei den folgenden Injektionen wurden die Werte stetig niedriger, nach der vierten ( $6188 \pm 1729$  IU/ml) und fünften ( $5666 \pm 2015$  IU/ml) Injektion waren sie schließlich signifikant erniedrigt ( $P=0,0470$  und  $P=0,0362$ ). Nach 180 Minuten stieg der IL-6-Spiegel weiter an auf  $72197 \pm 26353$  IU/ml nach der ersten Injektion. Auch zu diesem Zeitpunkt wurden die Werte nach jeder weiteren Injektion niedriger, signifikant war die erste gegen die vierte ( $P=0,0091$ ) und fünfte ( $P=0,0011$ ), die zweite gegen die vierte ( $P=0,0306$ ) und fünfte

( $P=0,0026$ ), die dritte gegen die fünfte ( $P=0,0143$ ) und ebenfalls die vierte gegen die fünfte Reaktion ( $P=0,0160$ ) (Abbildung 47).

Sowohl IL-6 als auch TNF waren im Plasma bei der Injektion des Pyrogens LPS deutlich höher als bei der Stimulation der Tiere mit FSL-1 i.a. Bezogen auf die Zytokin-Werte bildete sich eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Toleranz aus.

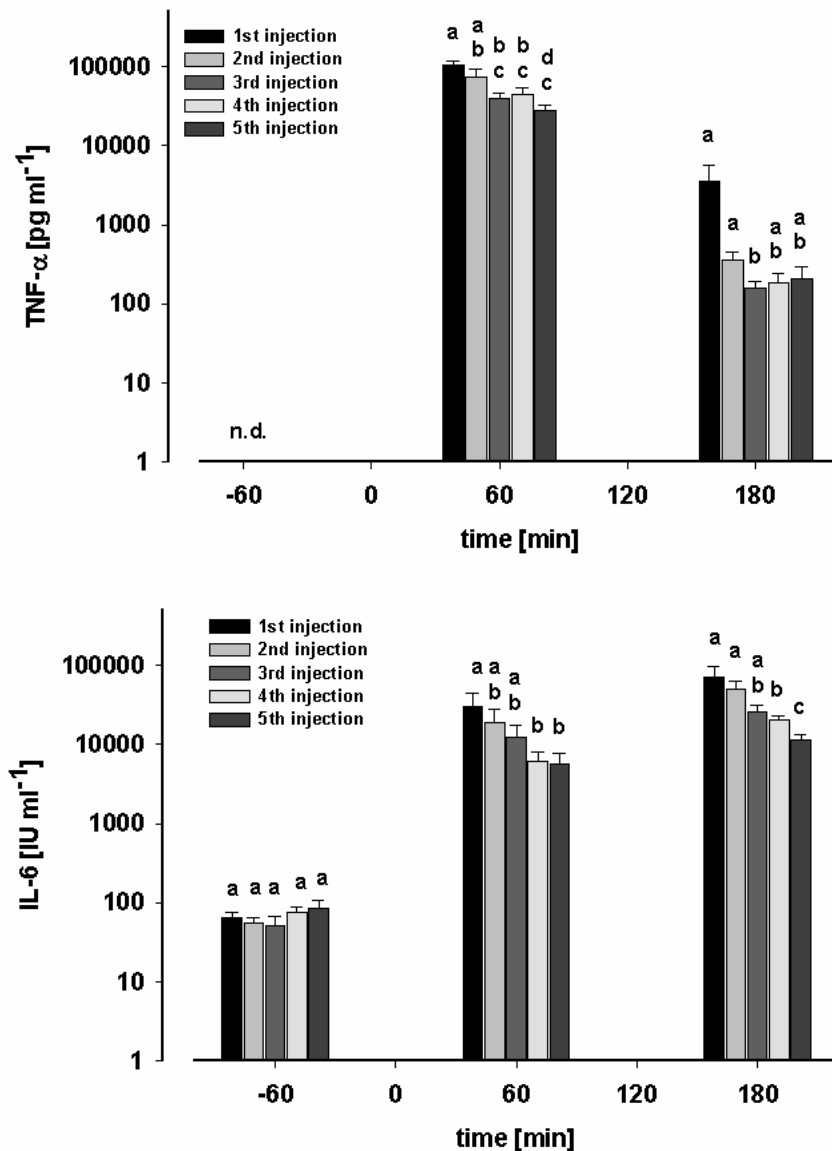


Abbildung 47: Die obere Abbildung stellt die durchschnittlich gemessenen TNF- Werte bei fünf aufeinander folgenden LPS i.a. Injektionen zu den Zeitpunkten -60, +60 und +180 Minuten dar. In der unteren Abbildung sind die entsprechenden IL-6-Werte abgebildet. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten an.

### 3.5.7 Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 bei intraarterieller Stimulation

Vergleich man die Temperaturverläufe nach der Injektion von FSL-1 i.a. bei naiven Tieren (n=5) mit denjenigen der fünfmal mit LPS vorbehandelten Meerschweinchen (n=6), waren sie nahezu identisch, d.h. es gab keinen signifikanten Unterschied der beiden Kurven im Zeitraum von +30 bis +210 Minuten (P=0,1541) (Abbildung 48).

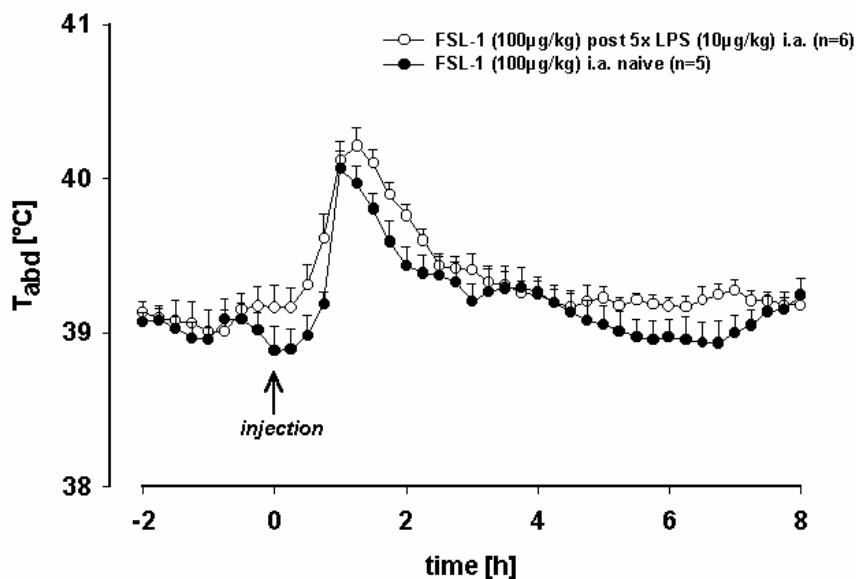


Abbildung 48: Die Abbildung stellt die Temperaturverläufe naiver Tiere nach Injektion von FSL-1 i.a. im Vergleich zu der Injektion von FSL-1 nach fünfmaliger Vorstimulation mit LPS i.a. dar. Der Verlauf der beiden Kurven war im Zeitraum von +30 bis +210 Minuten nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.5.8 Plasmakonzentration von bioaktivem TNF und IL-6 bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 nach intraarterieller Stimulation

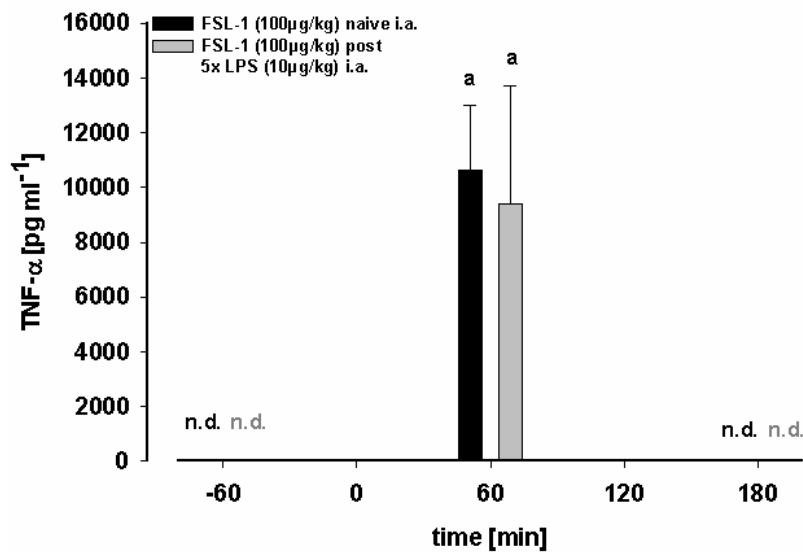
Zur Untersuchung einer eventuellen Kreuztoleranz wurden die Zytokinwerte naiver Tiere nach Injektion von FSL-1 i.a. mit denjenigen nach vorangegangener fünfmaliger Injektion von LPS i.a. verglichen (Abbildung 49).

Die Messungen von TNF ergaben nach +60 Minuten einen durchschnittlichen Wert von  $10620 \pm 2390$  bei naiven Tieren im Vergleich zu  $9409 \pm 4307$  pg/ml bei LPS vorbehandelten Tieren. Dieser Unterschied war nicht signifikant (P=0,5515). Nach 180 Minuten waren in

beiden Gruppen nur noch bei jeweils einem Tier eine geringe Konzentration TNF im Plasma (42 bzw. 28 pg/ml) messbar.

Bei IL-6 gab es nach 180 Minuten einen signifikanten Unterschied. Hier lagen die durchschnittlichen Werte bei  $414 \pm 74$  IU/ml im Vergleich zu  $1579 \pm 262$  IU/ml ( $P= 0,0004$ ). Die Werte nach 60 Minuten bei den vorbehandelten Tieren lagen zwar mit  $2191 \pm 962$  im Vergleich zu denen der unvorbehandelten mit  $1397 \pm 302$  IU/ml etwas höher, aber dieser Unterschied war nicht signifikant ( $P=0,3975$ ).

Es gab also offensichtlich keine Kreuztoleranz im Hinblick auf die Bildung Zytokinen, bei IL-6 waren die Durchschnittswerte nach vorangegangenen LPS Injektionen sogar leicht höher im Vergleich zur IL-6 Bildung naiver Tiere.



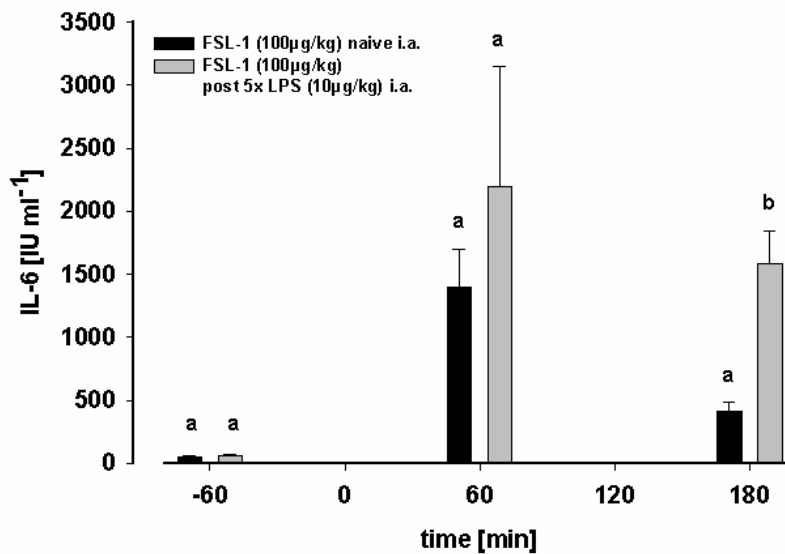


Abbildung 49: Diese Abbildung zeigt vergleichend die durchschnittlichen TNF bzw. IL-6 -Werte naiver Tiere nach Injektion von FSL-1 i.a. im Vergleich zu LPS vorbehandelten Meerschweinchen, d.h. bei Injektion von FSL-1 nach vorangegangener fünfmaliger LPS i.a. Stimulation. Bei IL-6 waren die durchschnittlich gemessenen Werte bei der Kreuztoleranz sogar etwas höher als bei der Reaktion naiver Tiere. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede zu den untersuchten Zeitpunkten.

### 3.5.9 Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von FSL-1

Im Abstand von drei Tagen erhielten die Tiere (n=5) fünf wiederholte Injektionen von 100 µg/kg FSL-1 intraperitoneal. Die Tiere reagierten hierauf mit einem biphasischen Fieber (Abbildung 50), d.h., die Temperatur stieg in einer ersten Phase (exemplarisch für die erste Injektion) auf einen Wert von  $39,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$  an, verblieb eine Viertelstunde auf diesem Wert und stieg dann in einer zweiten Phase weiter auf  $40,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , etwa  $1,5^\circ\text{C}$  über die Basistemperatur, nach 195 Minuten. Danach fiel die Temperatur wieder auf den Ausgangswert ab, der nach etwa acht Stunden fast wieder erreicht wurde. Bei der zweiten und dritten Injektion waren beide Fieberphasen gegenüber der Reaktion auf die erste Injektion abgeschwächt, bei der dritten Injektion war dieser Temperaturunterschied im Zeitraum von +180 bis +360 Minuten signifikant gegenüber der Reaktion auf die erste Injektion reduziert ( $P=0,0060$ ). Die Höchsttemperatur am dritten Stimulationstag lag nur noch bei  $39,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , also nur noch etwa  $0,5^\circ\text{C}$  über der Ausgangstemperatur. Bei der vierten Injektion war der Fieverlauf wieder höher als bei der dritten Injektion und die erste Phase begann früher, war

dafür aber deutlich schwächer. Die Höchsttemperatur stieg auf ca. 1 °C über die Referenzwerte. Somit war die Reaktion auf die vierte Injektion gegenüber der dritten Fieberantwort wieder signifikant höher ( $P=0,0320$ ). Die fünfte Fieberreaktion war dann wieder niedriger als die vierte, allerdings nur signifikant niedriger als die erste ( $P=0,0496$ ) (Tabelle 13). Um zu belegen, dass die Toleranz in diesem Fall transient ist, d.h. sich nach mehreren Injektionen teilweise wieder aufhebt, wurde jeweils die Fläche unter der Kurve ermittelt und so die errechneten Fieberindices miteinander verglichen (Abbildung 51). Hierbei zeigte sich dann, dass die Fläche unter der Kurve nach der dritten Stimulation im Vergleich zur ersten Fieberantwort signifikant kleiner ( $P=0,0084$ ) und dann im Vergleich dazu die vierte Reaktion wieder signifikant größer war ( $P=0,0241$ ).



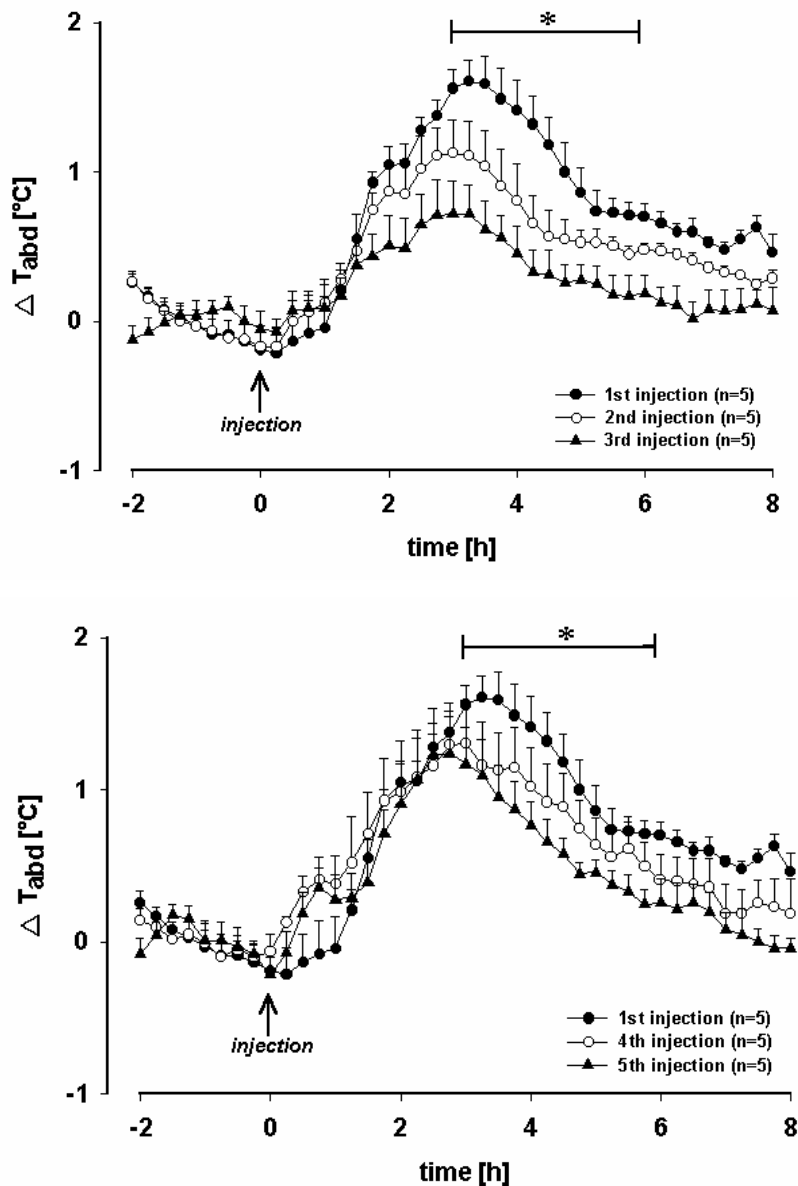
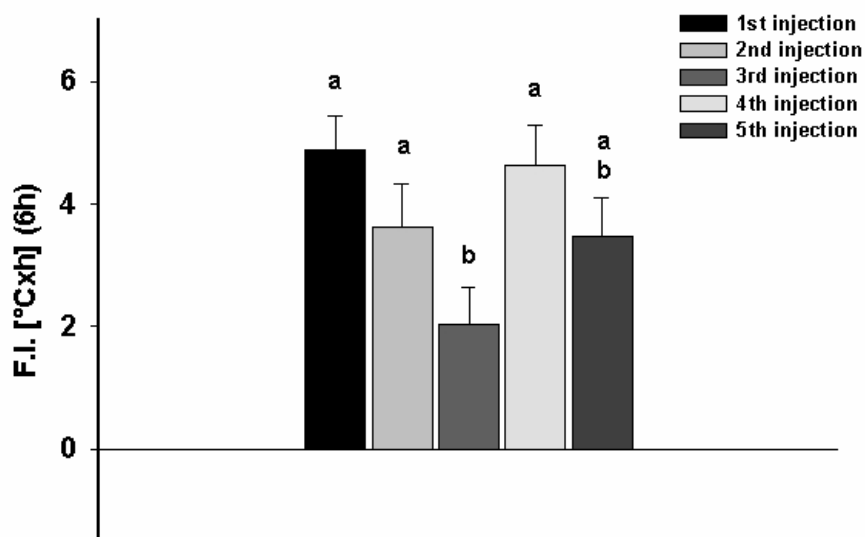


Abbildung 50: Die Abbildungen zeigen den Verlauf der abdominalen Temperaturen nach fünfmaliger Stimulation der Tiere mit FSL-1 i.p. im Abstand von jeweils drei Tagen. Um die stark variierenden Ausgangstemperaturen der Einzeltiere auszugleichen, wurden die Absolutwerte der ersten 120 Minuten gemittelt und im Zeitraum nach der Injektion die Differenzen zwischen den gemessenen Werten und der Nulllinie im Diagramm aufgetragen ( $\Delta T_{abd}$  °C). Die Temperaturen zum Zeitpunkt  $t=0$  lagen zwischen  $38,6 \pm 0,1$  und  $39,2 \pm 0,1$  °C. Dargestellt sind im oberen Diagramm die Fieberantworten auf die 1., 2. und 3., im unteren auf die 1., 4. und 5. Injektion. Im Zeitraum von +180 und +360 Minuten war die Fieberreaktion nach der dritten bzw. fünften Injektion gegenüber der ersten Reaktion signifikant erniedrigt.

**Tabelle 13:** Die mittels zweifaktorieller ANOVA und Scheffé post hoc Test errechneten P- und F- Werte in der Tabelle fassen den statistischen Vergleich der in Abb. 50 gezeigten Fieberverläufe zusammen. Somit waren im Zeitraum zwischen +180 und +360 Minuten die erste gegenüber der dritten und fünften Fieberantwort signifikant höher, ebenso die vierte gegenüber der dritten.

	1.Injektion	2.Injektion	3.Injektion	4.Injektion
2.Injektion	F= 3,412 P= 0,0978			
3.Injektion	F= 13,746 P= 0,006	F= 2,843 P= 0,1260		
4.Injektion	F= 1,582 P= 0,2439	F= 0,419 P= 0,5336	F= 6,717 P= 0,0320	
5.Injektion	F= 5,339 P= 0,0496	F= 0,151 P= 0,7066	F= 2,148 P= 0,1809	F= 1,229 P= 0,2999

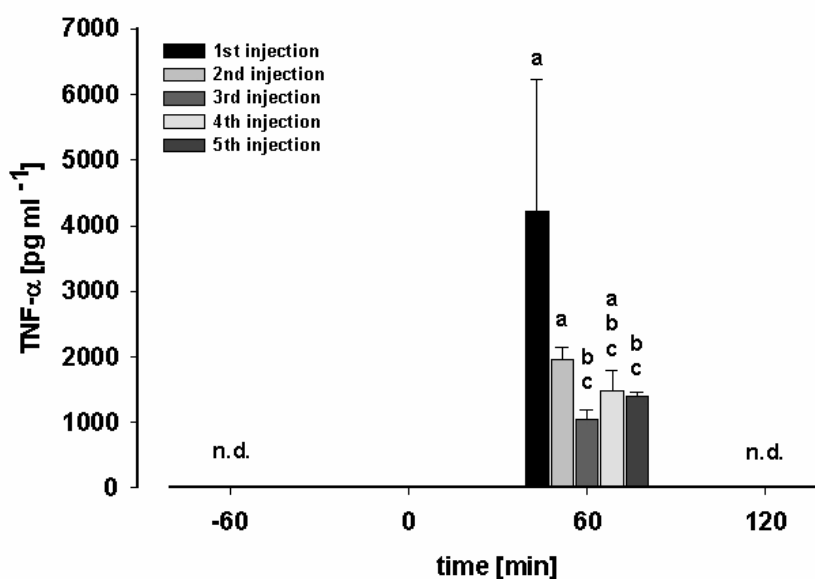


**Abbildung 51:** Um verdeutlichen zu können, dass die Toleranzentwicklung gegenüber FSL-1 i.p. transient ist, d.h. die Toleranz sich scheinbar wieder aufhebt, wurde von den Temperaturkurven ein Fieberindex [F.I. °C x h] über 6 Stunden errechnet. Hierzu wurden die Flächen unter den Kurven im Zeitraum t=0 bis t=6 h berechnet. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede an.

### 3.5.10 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von FSL-1

TNF konnte nach allen fünf Injektionen von FSL-1 i.p. nur nach 60 Minuten gemessen werden (Abbildung 52). Der durchschnittliche Wert bei der ersten Injektion lag zu diesem Zeitpunkt bei  $4213 \pm 2011$  pg/ml, fiel dann ab auf  $1953 \pm 191$  pg/ml nach der zweiten und war mit  $1055 \pm 133$  pg/ml nach der dritten Injektion signifikant erniedrigt ( $P=0,0310$ ). Nach der fünften Injektion lag der durchschnittlich gemessene Wert bei  $1388 \pm 66$  pg/ml, also ebenfalls signifikant niedriger als nach der ersten Injektion ( $P=0,0209$ ).

IL-6 im Plasma konnte nach allen fünf Injektionen in erhöhter Konzentration gemessen werden, sowohl nach 60 als auch 120 Minuten (Abbildung 52). Bei der ersten Injektion lag der durchschnittliche +60 Minuten-Wert bei  $2184 \pm 387$  IU/ml, bei der dritten dann signifikant niedriger bei  $1287 \pm 267$  IU/ml ( $P=0,0190$ ). Zur fünften Injektion stieg IL-6 dann wieder signifikant zur dritten an auf  $2062 \pm 456$  IU/ml ( $P=0,0291$ ). Die IL-6-Konzentrationen nach 120 Minuten waren bei allen fünf Injektionen nicht signifikant unterschiedlich. Die durchschnittlichen Werte fielen allerdings von  $5517 \pm 1285$  IU/ml nach der ersten auf  $1748 \pm 607$  IU/ml nach der dritten und stiegen zur fünften wieder auf  $2062 \pm 456$  pg/ml an. Aufgrund der starken Streuung der einzelnen gemessenen Werte waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant.



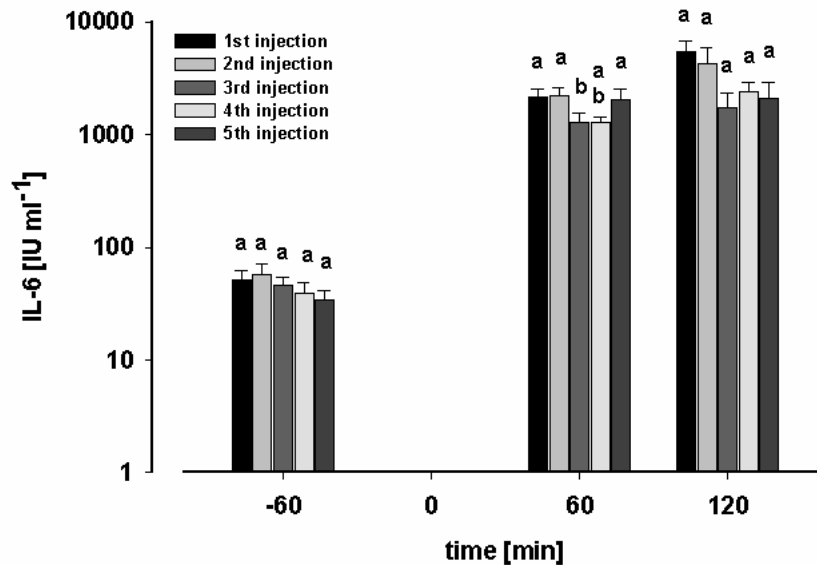


Abbildung 52: In der oberen Abbildung sind die durchschnittlichen TNF-Werte zu den Zeitpunkten -60, +60 und +120 Minuten nach allen fünf Injektionen mit FSL-1 i.p. dargestellt. Hier war nach 120 Minuten zu keinuchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Zeitpunkten an.

### 3.5.11 Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS bei intraperitonealer Stimulation

Nach der fünfmaligen Injektion von FSL-1 i.p. erhielten die Tiere zur Ermittlung einer eventuellen Kreuztoleranz 10 µg/kg LPS i.p. (n=4). Der entsprechende Temperaturverlauf ist im Vergleich zur Reaktion naiver Tiere auf LPS i.p. (n=6) in Abbildung 53 dargestellt. Sowohl die erste (90-135 Minuten) als auch die zweite (165-270 Minuten) Phase des Fiebers waren bei fünfmaliger Vorstimulation mit FSL-1 i.p. signifikant abgeschwächt (P=0,0338 und P=0,0112). Die Höchstwerte der ersten und zweiten Phase beider Gruppen unterschieden sich jeweils um  $0,5 \pm 0,2$  °C. Es konnte also für beide Fieberphasen eine Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS i.p. erzeugt werden.

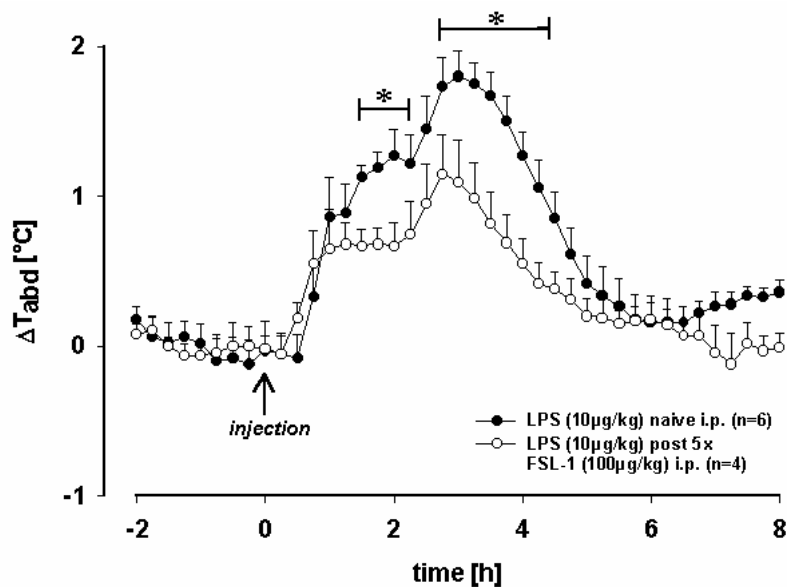


Abbildung 53: Dargestellt sind die Fieberkurven ( $\Delta T_{abd}$ ) einmal nach der Injektion von LPS i.p. bei naiven Tieren und einmal nach der fünfmaligen Vorbehandlung mit FSL-1. Letztere war im Zeitraum +90 bis +135 (1.Phase) und +165 bis +270 (2.Phase) Minuten signifikant abgeschwächt. Die durchschnittliche Ausgangstemperatur beider Gruppen lag zum Zeitpunkt  $t=0$  bei  $39,1 \pm 0,2$  °C bzw.  $39,3 \pm 0,4$  °C.

### 3.5.12 Plasmakonzentration von bioaktivem TNF und IL-6 bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS nach intraperitonealer Injektion

Nach der LPS i.p. Injektion bei naiven Tieren war TNF nach 60 Minuten deutlich erhöht und lag im Durchschnitt bei  $92999 \pm 16320$  pg/ml. Anders als nach Gabe von FSL-1 war bei allen vier Tieren dieser Gruppe auch nach 120 Minuten noch TNF in Höhe von  $5853 \pm 1594$  pg/ml im Mittel messbar. Bei den vorbehandelten Tieren, also der Injektion von LPS i.p. nach vorheriger fünfmaliger FSL-1 i.p. Injektion, waren die Werte nach 60 Minuten signifikant niedriger ( $8988 \pm 3101$  pg/ml;  $P=0,0048$ ). Nach 120 Minuten waren bei zwei von vier Tieren dieser Gruppe noch durchschnittlich  $4967 \pm 1809$  pg/ml TNF messbar, allerdings war dieser Wert nicht signifikant zu den 120 Minuten Werten der anderen Versuchsgruppe ( $P=0,8320$ ). Im Bezug auf TNF gab es also offensichtlich nach 60 Minuten eine Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS.

Bei naiven Tieren führte die Injektion von LPS i.p. zu einem mittleren Anstieg des IL-6-Spiegels auf  $4431 \pm 1358$  IU/ml nach 60 Minuten und  $116848 \pm 11465$  IU/ml nach 120 Minuten. Nach fünfmaliger Vorstimulation mit FSL-1 i.p. bewirkte die Injektion von LPS i.p.

einen IL-6-Spiegel von  $1813 \pm 280$  IU/ml nach 60 Minuten und von  $9120 \pm 2844$  IU/ml nach 120 Minuten. (Abbildung 54). Der Vergleich der beiden 60-Minuten-Werte war nicht signifikant, ( $P=0,0856$ ), der Vergleich der beiden 120 Minuten Werte hingegen war hoch signifikant ( $P<0,0001$ ). Es entwickelte sich also auch im Hinblick auf IL-6 eine Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS i.p. nach 120 Minuten.

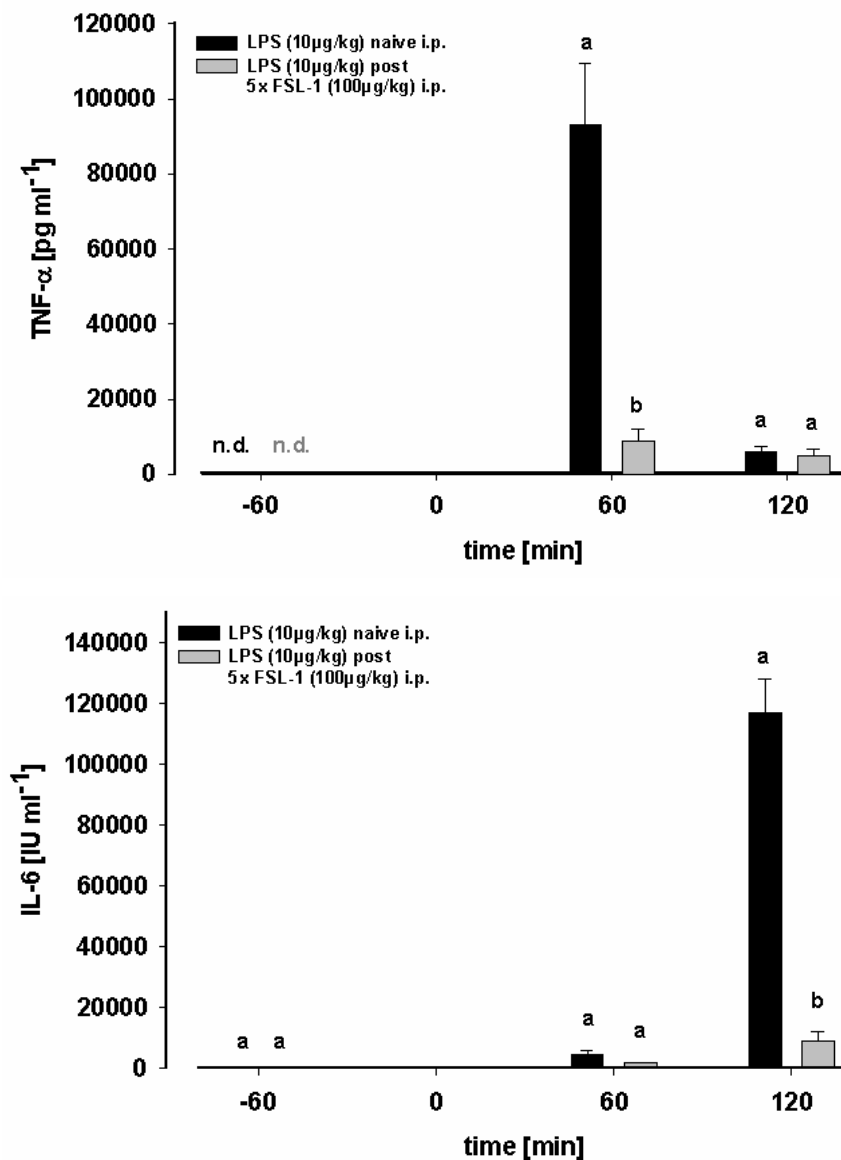


Abbildung 54: Hier dargestellt sind die durchschnittlichen TNF und IL-6 Werte nach der Injektion von LPS i.p. bei naiven Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Werten nach Injektion von LPS i.p. nach vorheriger fünfmaliger Injektion von FSL-1 i.p. (Kreuztoleranz). Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten an.

### **3.5.13 Verlauf der Körperkerntemperatur nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von LPS**

Bei der Injektion von 10 µg/kg LPS intraperitoneal kam es bei den Tieren (n=6) zu einem charakteristischen biphasischen Fieber, wie es in zahlreichen Studien mit LPS beim Meerschweinchen und anderen Spezies schon gezeigt werden konnte (Abbildung 55). Eine halbe Stunde nach Injektion kam es zu einem raschen Anstieg der Temperatur auf über 40 °C in der ersten Phase (45-120 Minuten) und dann zu einem weiteren Anstieg auf fast 41 °C in der zweiten Phase (150-300 Minuten). Nach 180 Minuten fiel die Temperatur wieder ab und das Fieber war nach etwa sechs Stunden vorüber. Die Temperaturverläufe nach den ersten drei Injektionen waren nahezu identisch. Die zweiten Phase nach der vierten und fünften Injektion von LPS war dann allerdings im Zeitraum zwischen +180 und +300 Minuten signifikant abgeschwächt (P=0,0234 und P=0,0484). Die Höchstwerte lagen nur noch bei 40,7 ± 0,2 bzw. 40,3 ± 0,2 °C. In Tabelle 14 sind die jeweiligen F- und P- Werte dazu zusammenfassend dargestellt. Es bildete sich also in der zweiten Fieberphase eine Toleranz gegenüber dem i.p.-injizierten LPS aus.

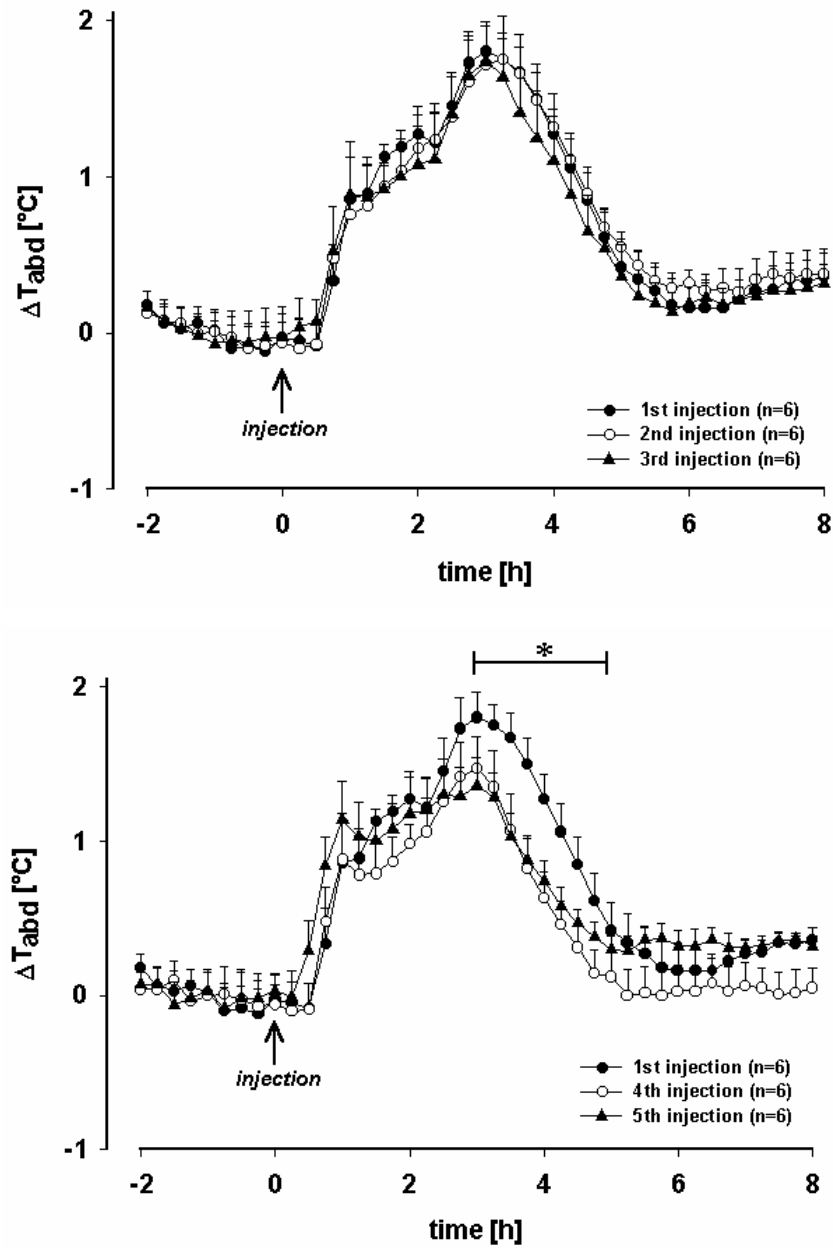


Abbildung 55: Die beiden Abbildungen zeigen die Temperaturverläufe bei sechs Tieren nach der 1., 2. und 3. (obere), bzw. 1., 4. und 5. (untere) Injektion von LPS (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i.p. Die Temperaturen nach der ersten Injektion waren gegenüber denen nach der vierten und fünften im Zeitraum von +180 bis +300 Minuten signifikant höher.



**Tabelle 14: In der Tabelle sind die mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Scheffé post hoc Test errechneten F- und P-Werte der Vergleiche der Temperaturverläufe nach den fünf Injektionen von LPS i.p. aufgelistet. Der Temperaturverlauf der ersten Kurve war im Zeitraum von +180 und +300 Minuten im Vergleich zur vierten und fünften signifikant höher.**

	1.Injektion	2.Injektion	3.Injektion	4.Injektion
2.Injektion	F=1,003 P=0,3401			
3.Injektion	F=0,894 P=0,3667	F= 0,616 P= 0,4507		
4.Injektion	<b>F= 7,137</b> <b>P= 0,0234</b>	F= 4,615 P= 0,0572	F= 3,001 P= 0,1139	
5.Injektion	<b>F= 5,052</b> <b>P= 0,0484</b>	F= 3,374 P=0,0961	F= 1,848 P= 0,2033	F= 0,096 P= 0,7630

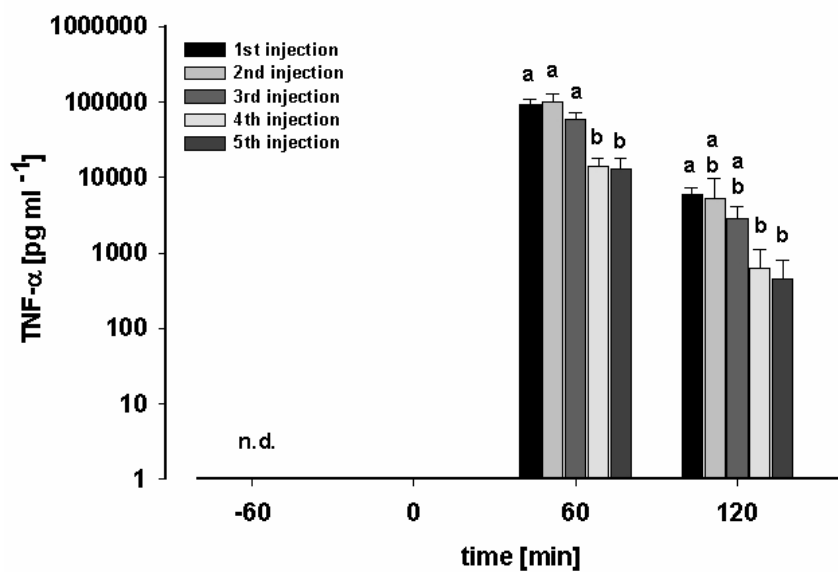
### 3.5.14 Plasmakonzentrationen von bioaktivem TNF und IL-6 nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von LPS

Durchschnittlich wurden bei der ersten LPS-Injektion  $92999 \pm 16320$  pg/ml TNF nach 60 Minuten gemessen. Nach der zweiten und dritten Injektion sank dieser mittlere Wert nicht signifikant ab, wohl aber nach der vierten ( $15081 \pm 4079$  pg/ml;  $P=0,0014$ ) und fünften ( $12937 \pm 4897$  pg/ml;  $P=0,0030$ ) Injektion. Die Werte nach der vierten Injektion waren im Vergleich zu denen nach der ersten und zweiten ( $P=0,0036$ ), die nach der fünften im Vergleich zur ersten, zweiten ( $P=0,0072$ ) und dritten ( $P=0,0123$ ) signifikant erniedrigt. Anders als bei den FSL-1 i.p. Injektionen war TNF bei allen Tieren auch noch nach 120 Minuten nachweisbar, nämlich bei der ersten Injektion in Höhe von durchschnittlich  $5853 \pm 1594$  pg/ml. Nach der dritten Injektion fiel der Wert dann ab ( $2836 \pm 1264$  pg/ml) und war nach der vierten ( $620 \pm 490$  pg/ml;  $P=0,0166$ ) und fünften Injektion ( $458 \pm 357$  pg/ml,  $P=0,0205$ ) signifikant erniedrigt.

60 Minuten nach der ersten LPS-Injektion wurden durchschnittlich  $4431 \pm 1358$  IU/ml IL-6 im Plasma gemessen. Nach jeder weiteren Injektion fiel der Wert progressiv ab auf etwa die Hälfte nach der dritten Injektion bis auf  $2276 \pm 538$  IU/ml nach der fünften Injektion (Abbildung 56). Signifikant unterschiedlich waren die Werte nach der ersten im Vergleich zur vierten ( $P=0,0099$ ) und fünften ( $P=0,0052$ ) Injektion, die Werte nach der zweiten gegen die nach der fünften ( $P=0,0025$ ), und die Werte der dritten gegenüber denen der vierten ( $P=0,0351$ ) und fünften ( $P=0,0075$ ) Injektion. Nach 120 Minuten stieg IL-6 im Plasma noch

weiter an. Hier lag der mittlere Wert nach der ersten Injektion bei  $116848 \pm 11465$  IU/ml und fiel ebenfalls progressiv ab, auf etwa die Hälfte ( $52395 \pm 15096$  IU/ml) nach der dritten Injektion und weiter auf  $12269 \pm 4098$  IU/ml nach der fünften Injektion. Signifikant unterschiedlich waren die IL-6-Werte nach der ersten Injektion gegenüber denen nach der dritten ( $P=0,0307$ ), vierten ( $P<0,0001$ ) und fünften ( $P=0,0011$ ), die nach der zweiten und dritten gegenüber denen der vierten ( $P=0,0044$ ,  $P=0,0255$ ) und fünften ( $P=0,0109$ ,  $P=0,0341$ ) Injektion.

Korrespondierend zu der entstandenen Toleranz bezüglich des Fiebers nach wiederholter LPS i.p. Injektion im Hinblick auf die zweite Phase, nahmen IL-6 und TNF progressiv nach jeder der wiederholten Injektionen ab.



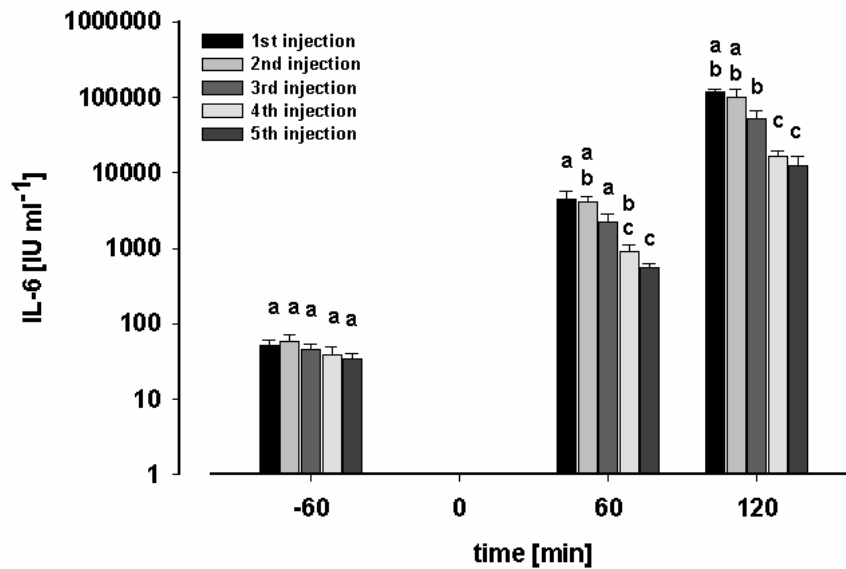


Abbildung 56: Die Abbildung zeigt die durchschnittlich nach den fünf LPS i.p. Injektionen gemessenen TNF (oben) und IL-6 (unten) –Werte im Plasma und die ermittelten Signifikanzen der Mittelwerte zueinander. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten an.

### 3.5.15 Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 bei intraperitonealer Stimulation

Nach der fünfmaligen Injektion von LPS i.p. erhielten die Tiere zur Untersuchung einer möglichen Kreuztoleranz drei Tage nach der letzten Injektion FSL-1 (100 µg/kg) i.p. Hierauf kam es im Gegensatz zur Injektion von FSL-1 i.p. bei naiven Tieren nur zu einem monophasischen, moderaten Fieber. Die Temperatur stieg erst 90 Minuten nach der Injektion an und erreichte nach 150 Minuten einen Peak von  $39,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Sechs Stunden nach der Stimulation war der Ausgangswert wieder erreicht, während das Fieber bei naiven Tieren noch weiter anhielt (Abbildung 57). Im Zeitraum von +120 bis +480 Minuten war der Temperaturunterschied der beiden Versuchsgruppen signifikant ( $P=0,0037$ ). Somit bildete sich augenscheinlich eine deutliche Kreuztoleranz bezüglich der Fieberreaktion zwischen LPS und FSL-1 i.p. aus.

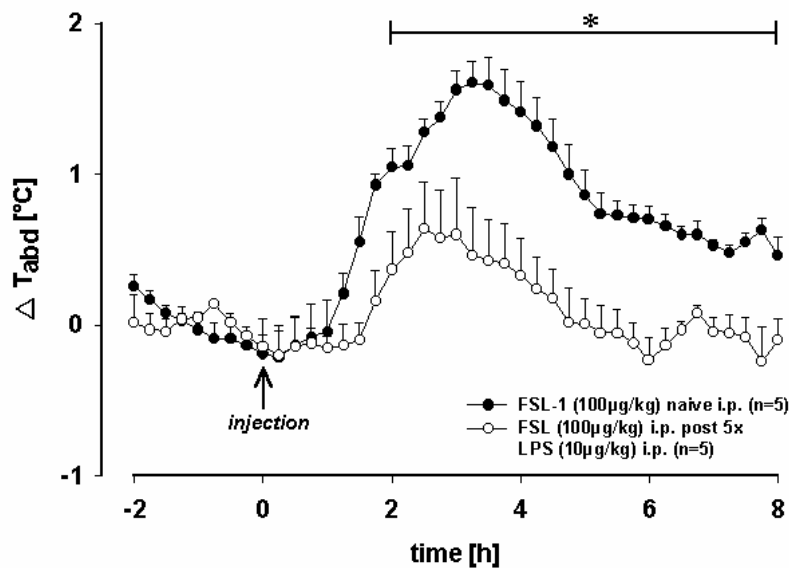


Abbildung 57: Dargestellt sind die Fieberreaktionen nach FSL-1 i.p. Injektion bei naiven Tieren und solchen nach vorheriger fünfmaliger Stimulation mit LPS i.p. Die Fieberantwort der mit LPS vorbehandelten Tiere war im Zeitraum +120 bis +480 Minuten signifikant niedriger.

### 3.5.16 Plasmakonzentration von bioaktivem TNF und IL-6 bei Untersuchung einer Kreuztoleranz zwischen LPS und FSL-1 nach intraperitonealer Injektion

Es wurde bei naiven Tieren 60 Minuten nach der Injektion  $4213 \pm 2011$  pg/ml TNF gemessen während der mittlere Wert in der anderen Gruppe bei nur  $1055 \pm 502$  pg/ml lag. Hier wurde ein signifikanter Unterschied aufgrund der relativ großen Streuung der Einzelwerte knapp verfehlt ( $P=0,0768$ ) (Abbildung 58).

Bei den gemessenen IL-6-Werten (Abbildung 58) in beiden Gruppen verhielt es sich vergleichbar. Der durchschnittlich gemessene IL-6-Wert nach 60 Minuten lag bei naiven Tieren nach der FSL-1 i.p. Injektion bei  $2184 \pm 387$  IU/ml. Nach fünfmaliger Vorbehandlung mit LPS wurde ein mittleren Wert von  $1031 \pm 244$  IU/ml gemessen, der allerdings eine statistische Signifikanz auch hier knapp verfehlte ( $P=0,0551$ ). Ebenso nicht signifikant unterschiedlich waren die Werte 120 Minuten nach Injektion von FSL-1 i.p., obwohl er bei naiven Tieren mit  $5517 \pm 1285$  IU/ml tendenziell höher lag als nach Injektion von FSL-1 i.p. nach vorangegangener fünfmaliger LPS i.p. Stimulation ( $3904 \pm 1115$  IU/ml).

Trotzdem kann man festhalten, dass die FSL-1 induzierte Produktion beider Zytokine nach vorausgegangenen LPS i.p.-Injektionen trotz fehlender Signifikanz zumindest tendenziell vermindert war.

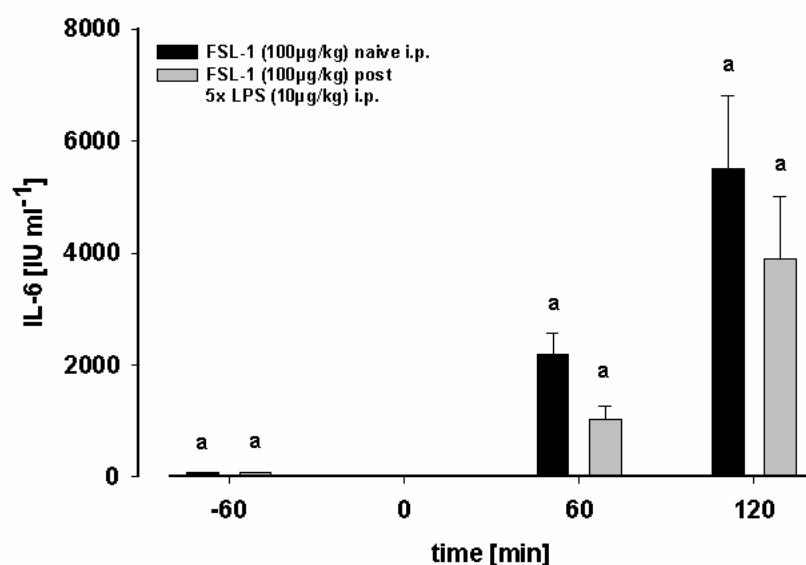
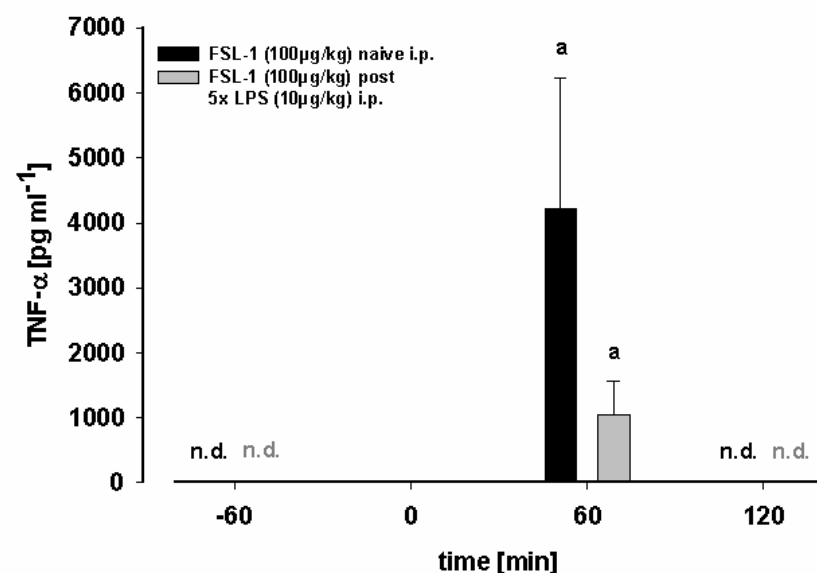


Abbildung 58: Dargestellt sind die im Mittel gemessenen Plasmawerte von TNF und IL-6 bei naiven und fünfmal mit LPS i.p. vorbehandelten Tieren. In der ersten Gruppe war bei einem von vier Tieren nach 120 Minuten noch 1331 pg/ml TNF messbar, in der zweiten Gruppen bei einem von drei Tieren noch 1157 pg/ml. Die gleichen Buchstaben über den Säulen zeigen zu den jeweiligen Zeitpunkten an, dass bezüglich der Zytokinwerte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen waren.

### **3.6 Einfluß wiederholter FSL-1 und LPS – Injektionen auf die Entwicklung des Körpergewichts**

An dem Tag der jeweiligen Injektion und einen Tag danach wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert, um die Auswirkungen der verschiedenen Substanzen bzw. Wirkstoffkombinationen auf eine eventuelle Anorexie der Tiere zu überprüfen. Die Tiere wurden am Folgetag zur selben Zeit gewogen wie am Tag der Injektion. Die Gewichtsverluste bzw. -zunahmen sind für die Toleranzversuche in den folgenden Abschnitten beschrieben und dargestellt. Die durchschnittliche Zunahme der Tiere betrug bei der Kontrollinjektion von PBS i.a.  $10,6 \pm 3,7$  g, bei der intraperitonealen Injektion  $3,8 \pm 2,5$  g (nicht dargestellt).

#### **3.6.1 Auswirkung der fünfmaligen Injektion von FSL-1 bei intraarterieller und intraperitonealer Applikation auf das Gewicht der Versuchstiere**

Bei der Stimulation mit FSL-1 i.a. nahmen die Tiere (n=5) nach der zweiten Injektion signifikant mehr ab ( $P=0,0188$ ) als bei allen anderen Injektionen, nämlich durchschnittlich  $-12,2 \pm 3,2$  g (Abbildung 59). Nach der dritten und vierten Injektion legten die Tiere sogar an Gewicht zu ( $+2,4 \pm 2,5$  g bzw.  $4,8 \pm 3,5$  g).

Nach der ersten Injektion von FSL-1 i.p. nahmen die Tiere signifikant ab ( $-4,2 \pm 0,6$  g) im Vergleich zur zweiten ( $+1,5 \pm 2,6$  g;  $P=0,0475$ ), vierten ( $-1,25 \pm 1,0$  g;  $P=0,0338$ ) und fünften ( $+0,4 \pm 1,5$  g;  $P=0,0214$ ) Injektion (Abbildung 59).

Die Gewichtsab- und zunahmen nach den FSL-1 Injektionen bei beiden Applikationsarten unterlagen größeren nicht eindeutig interpretierbaren Schwankungen.

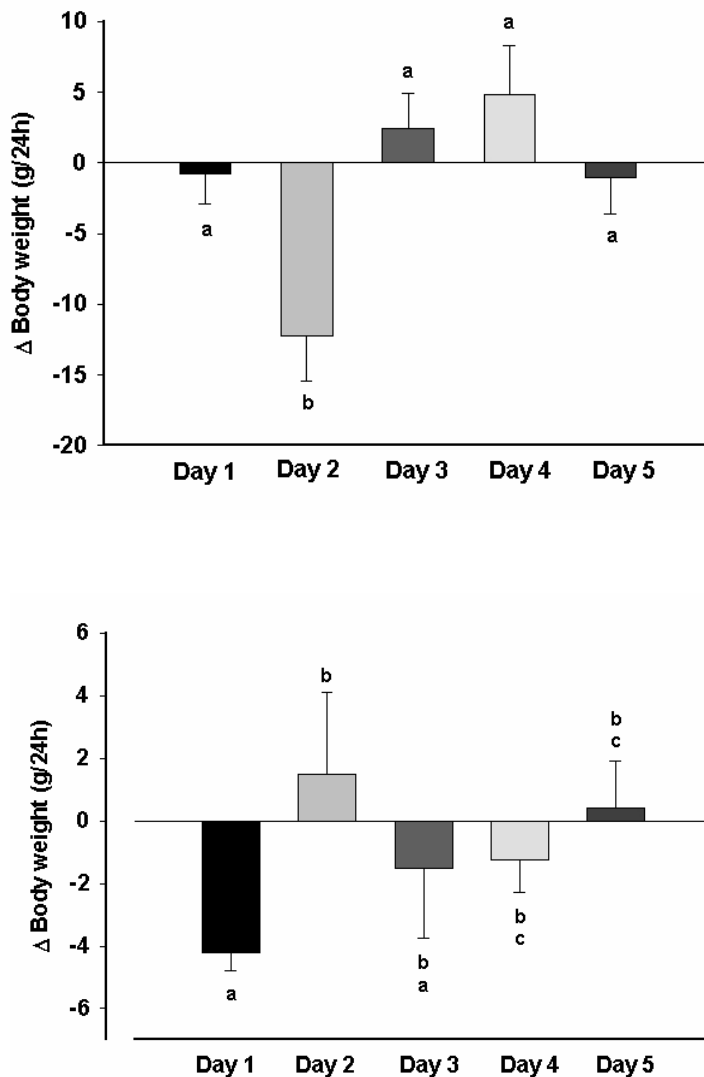


Abbildung 59: Durchschnittliche Gewichtszu- und -abnahmen der Tiere nach wiederholten Injektionen von FSL-1 i.a. (obere Abbildung) bzw. i.p. (untere Abbildung) am jeweiligen Folgetag des Versuches. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede bezüglich der Gewichtsveränderung nach den jeweiligen Injektionen an. (Day 1 steht für den Tag nach der ersten Injektion, Day 2 für den Tag nach der zweiten Injektion usw.).

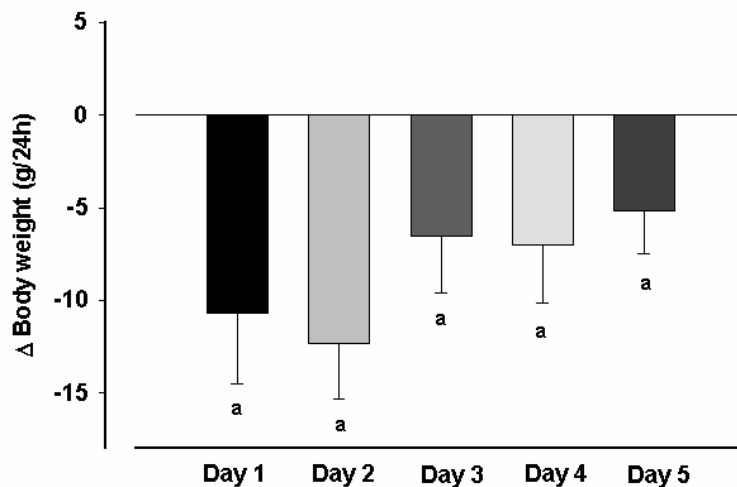
### 3.6.2 Auswirkung der fünfmaligen Injektion von LPS bei intraarterieller und intraperitonealer Applikation auf das Gewicht der Versuchstiere

Die Versuchstiere (n=6) nahmen am Tag nach der ersten LPS-Injektion i.a. durchschnittlich  $-10,7 \pm 3,8$  g ab. Nach der zweiten Injektion war der Gewichtsverlust sogar noch leicht stärker ( $-12,3 \pm 3,0$  g). Nach der dritten, vierten und fünften Injektion nahmen die Tiere dann nur

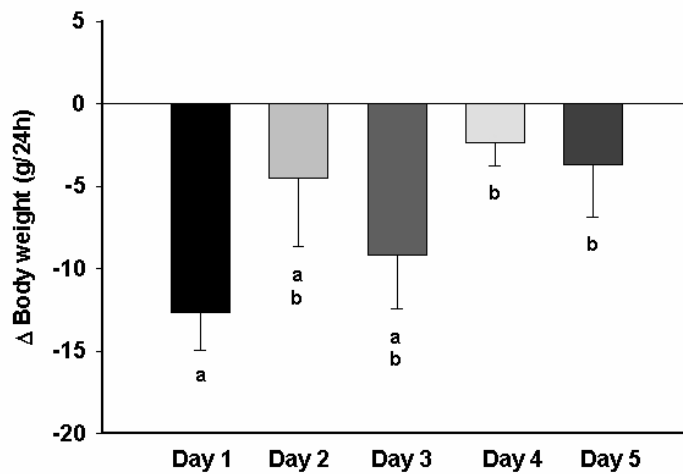
noch etwa halb so viel ab ( $7,0 \pm 3,1$  (4.Injektion) bzw.  $5,2 \pm 2,3$  g (5.Injektion)). Insgesamt waren die Gewichtsabnahmen nicht signifikant voneinander verschieden, jedoch schwächte sich der anorektische Effekt von LPS bei wiederholter Stimulation tendenziell ab

Bei den Toleranzversuchen mit intraperitonealen LPS-Injektionen nahmen die Tiere ( $n=6$ ) nach der ersten Injektion vergleichbar viel ab wie bei der intraarteriellen Injektion ( $-12,7 \pm 2,3$  g) (Abbildung 60). Die Gewichtsabnahme nach der zweiten ( $-4,5 \pm 4,1$  g) und dritten Injektion ( $-9,2 \pm 3,3$  g) war dazu nicht signifikant niedriger, wohl aber der Gewichtsverlust nach der vierten ( $-2,3 \pm 1,4$  g) ( $P=0,0033$ ) und fünften Injektion ( $-3,7 \pm 3,2$ g) ( $P=0,0437$ ) (Abbildung 60). Bei wiederholten intraperitonealen Injektionen von LPS schwächte sich der anorektische Effekt somit sogar deutlicher ab als nach wiederholten intraarteriellen Injektionen.

Damit korrespondierte die Gewichtsveränderung mit der Stärke der Fieberreaktion. Die Injektion von LPS führte also bei mehrmaliger Applikation i.a. oder i.p. zu einer Abnahme der Anorexie bzw. Inappetenz.







**Abbildung 60: Gewichtszu- und -abnahmen der Tiere nach wiederholten Injektionen von LPS i.a. (obere Abbildung) bzw. i.p. (untere Abbildung) am jeweiligen Folgetag des Versuches. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede bezüglich der Gewichtsveränderung nach den jeweiligen Injektionen an. (Day 1 steht für den Tag nach der ersten Injektion, Day 2 für den Tag nach der zweiten Injektion usw.).**

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Tiere auf die Stimulation mit LPS, unabhängig von der Applikationsform, generell mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Anorexie reagierten, die aber korrespondierend zu der entstandenen partiellen Toleranz nach jeder weiteren Injektion etwas schwächer wurde. Nach der Applikation von FSL-1 hingegen unterlagen die Tiere eher geringeren Gewichtsschwankungen bei beiden Applikationsarten und sie nahmen teilweise trotz Stimulation mit dem Pyrogen zu. Somit zeichnet sich bezüglich der anorektischen Eigenschaften von FSL-1 anhand der hier vorliegenden Daten nur eine Tendenz ab.

## 4 DISKUSSION

Das wohl mit Abstand am besten untersuchte und am häufigsten in experimentellen Fieberstudien eingesetzte exogene Pyrogen ist das LPS gramnegativer Bakterien. Es aktiviert das angeborene Immunsystem über den TLR4 und führt zu einer Reihe zentralnervös-kontrollierter Krankheitssymptome wie Fieber, Anorexie oder „sickness behavior“. Zu einem großen Teil werden diese Symptome durch proinflammatorische Zytokine ausgelöst (Roth & De Souza 2001). Mittlerweile sind eine Reihe weiterer PAMPs und ihre spezifischen Rezeptoren identifiziert.

Mycoplasmen sind prokariotische Organismen, die sich von anderen Bakterien durch ihre geringe Größe und dem Fehlen einer Zellwand unterscheiden (Rottem 2003). Diacylierte Lipopeptide aus Mycoplasmen agieren als PAMPs und stimulieren das Immunsystem über das TLRs 2/6 Heterodimer, was letztendlich in einer Produktion proinflammatorischer Zytokine, Prostaglandine und NO resultiert (Mühlradt & Schade 1993, Mühlradt & Fritsch 1994, Hübschle et al. 2006).

Mittelpunkt dieser Arbeit ist das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1), das die N-terminale Sequenz eines 44 kDa schweren Lipoproteins aus *Mycoplasma salivarium* darstellt (Shibata et al. 2000). Es wird angenommen, dass der freie N-Terminus ein generelles Merkmal von Lipoproteinen aus Mycoplasmen ist. FSL-1 besitzt einige fast identische Eigenschaften wie das aus *Mycoplasma fermentans* isolierte 2 kDa schwere Lipopeptid MALP-2 und unterscheidet sich von ihm nur in der Aminosäuresequenz und in der Länge des Peptidanteils. Beide mycoplasmale Lipopeptide sind in der Lage, *in vitro* stimulierte Zellen wie Makrophagen oder Monozyten zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, unter anderem IL-6 und TNF, anzuregen (Rawadi et al. 1996, Shibata et al. 2000, Okusawa et al. 2004). *In vivo* können MALP-2 und FSL-1 bei Ratten ebenfalls die Produktion der proinflammatorischer Zytokine IL-6 und TNF hervorrufen und zu Fieber und „sickness behavior“ führen (Hübschle et al. 2006). Die wiederholte Gabe von MALP-2 gab *in vitro* (Sato et al. 2000) und *in vivo* Hinweise auf eine mögliche Toleranzentwicklung (Deiters 1999, Deiters et al. 2003). Da diese für MALP-2 beschriebenen Eigenschaften für FSL-1 noch nicht untersucht wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit die *in vivo*-Eigenschaften von FSL-1 am Versuchstiermodell Meerschweinchen eingehend untersucht werden. Das Hauptaugenmerk richtete sich hierbei auf die Fähigkeit von FSL-1 als potenzielles exogenes

Pyrogen Fieber zu erzeugen, und die Bildung der proinflammatorischer Zytokine IL-6 und TNF zu induzieren. Dann wurde mittels eines TNFbp die Rolle von TNF- $\alpha$  und mit Hilfe des unselektiven Zyklooxygenasehemmers Diclofenac der jeweilige Einfluß dieser Substanzen auf das Fiebergeschehen bzw. auf die Zytokin- und PGE<sub>2</sub>-Bildung untersucht. Hierdurch sollten mögliche Mechanismen charakterisiert werden, denen ein durch FSL-1 induziertes Fieber zugrunde liegt. Des Weiteren wurde die durch FSL-1 induzierte IL-6-Aktivierung anhand von nukleären STAT3-Translokationen in den CVOs überprüft. Schließlich wurde ermittelt, ob durch wiederholte Applikation von FSL-1 eine mögliche Toleranz bzw. Kreuztoleranz mit LPS hervorzurufen ist. Im Rahmen dieser Toleranzuntersuchungen wurden außerdem die anorektischen Eigenschaften von FSL-1 betrachtet.

#### **4.1 Pyrogene Eigenschaften von FSL-1**

##### **4.1.1 Die Induktion von Fieber**

Obwohl *in vitro* Studien FSL-1 eine höhere Aktivität zuschreiben als MALP-2 (Okusawa et al. 2004), konnte dies *in vivo* nicht bestätigt werden. MALP-2 und FSL-1 sind als exogene Pyrogene mit annähernd gleicher Wirksamkeit in der Lage, die Bildung proinflammatorischer Zytokine zu induzieren, Fieber zu erzeugen und „sickness behavior“ bei Ratten hervorzurufen (Hübschle et al. 2006). Die Induktion eines Fiebers konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn es kam nach Applikation von FSL-1 in einer niedrigen (100  $\mu$ g/kg) und hohen (1000  $\mu$ g/kg) Dosis beim Meerschweinchen zu einem dosisabhängigen Fieber. Die intraarterielle Injektion von FSL-1 erzeugte ein monophasisches, relativ kurzes, moderates Fieber. Bei der hohen Dosis war das Fieber deutlich höher und länger, aber noch immer monophasisch.

Die Entstehung eines Fiebers und dessen Ausprägung ist bei verschiedenen Substanzen wohl abhängig von der Art der Applikation, dies konnte beispielsweise für PI:PC gezeigt werden (Voss et al. 2006). Dies war auch bei FSL-1 der Fall, denn bei der intraperitonealen Injektion war das Fieber wesentlich stärker als bei der intraarteriellen und deutlich biphasisch. Bei Gabe der hohen Dosis dauerte die zweite Phase sogar über 20 Stunden an. Im Gegensatz zu Ratten, die auf eine hohe Dosis i.p. mit einer Hypothermie und nachfolgendem Fieber reagieren (Hübschle et al. 2006), kam es bei den Meerschweinchen zu einem direkten

Fieberanstieg. Sie scheinen also weniger sensitiv auf FSL-1 zu reagieren als Ratten, da eine sich manifestierende Hypothermie als Zeichen eines septischen Zustands interpretiert wird.

Eine Unterdrückung des Fiebers bei vagotomierten Meerschweinchen hängt von der Dosis und der Art der Applikation ab (Goldbach et al. 1997). Vagale Afferenzen werden in erster Linie von einem Pyrogen in der Bauchhöhle stimuliert. Es ist also möglich, dass FSL-1 daher bei der intraperitonealen Injektion über diesen zusätzlichen Signalweg ein stärkeres Fieber verursacht. Möglich ist auch, dass FSL-1 in größerem Ausmaß an Zellen in der Bauchhöhle, die das TLR 2/6 Heterodimer exprimieren, bindet, und es so zu einer Infiltration der Bauchhöhle mit Makrophagen und Leukozyten kommt, die dann proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF, und Chemokine wie MIP-1 $\alpha$  oder MCP-1 bilden. Dies wurde für MALP-2 nachgewiesen (Deiters et al. 1999, 2003, Deiters & Mühlradt 1999); hier kam es beim Kaninchen 24 Stunden nach Injektion zu einem hohen Anstieg der Granulozyten, der sogar erst nach zwei bis drei Tagen sein Maximum erreicht.

Erstaunlich war allerdings, dass bei der Injektion in die Bauchhöhle zwar mehr IL-6, aber weniger TNF als bei der Injektion in die Blutbahn gemessen wurde. Bei der hohen Dosis wiederum wurde IL-6 bei beiden Applikationsarten in etwa gleicher Menge gemessen, dafür war TNF bei der hohen intraperitonealen Dosis mehr als doppelt so hoch als bei der intraarteriellen Dosis. Da TNF selbst keine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Fiebers zu spielen scheint - denn nach 120 Minuten war bei beiden Dosierungen und nach beiden Applikationsarten schon kein TNF mehr im Blut nachweisbar - ist es anscheinend an der Induktion eines Mediators beteiligt, der für die Aufrechterhaltung des Fiebers sorgt. IL-6 kommt hierfür in Betracht, es korreliert am besten mit der Fieberantwort (Roth & de Souza 2001). Allerdings kann über seine Bedeutung für das hohe und langanhaltende Fieber bei der hohen Dosis i.p. nur spekuliert werden, da IL-6 in den späten Phasen der Fieberreaktion nicht mehr gemessen wurde. Auf die Rolle von TNF und IL-6 bezüglich des FSL-1 induzierten Fiebers soll im Folgenden noch einmal näher eingegangen werden, da diese beiden Zytokine als wichtige endogene Pyrogene zentralnervös gesteuerte Krankheitssymptome vermitteln und als einzige reproduzierbar in höheren Konzentrationen in der Blutbahn fiebernder Tiere nachweisbar sind.

## **4.1.2 Die FSL-1 induzierte Freisetzung von Zytokinen**

### **4.1.2.1 Die Bedeutung des TNF**

TNF hat eine Schlüsselrolle in der Vermittlung endotoxischer Effekte von LPS. TNF gilt als endogenes Pyrogen, denn nach Injektionen von LPS (Roth et al. 1993), MDP (Roth et al. 1997b) oder PI:PC (Voss et al. 2006) kommt es beim Meerschweinchen zu erhöhten TNF-Plasmaspiegeln, außerdem verursacht die Injektion von TNF selbst eine ähnliche Fieberreaktion wie LPS (Roth et al. 1994b). Nach LPS-Stimulation ist TNF- $\alpha$  als erstes Zytokin im Blut messbar, gefolgt von IL-1 $\beta$  und IL-6. Von TNF ist bekannt, dass er für die Induktion von IL-1 $\beta$  (Dinarello et al. 1986) und IL-6 mitverantwortlich ist.

Die Menge an gebildetem TNF korreliert nicht mit der Fieberantwort auf LPS. TNF erreicht seinen Peak im Plasma schon in einem sehr frühen Stadium des Fieberanstiegs, fällt danach aber rapide ab und ist zum Peak des Fiebers meist schon nicht mehr messbar. Dies unterstützt die These, dass TNF für die Induktion des Fiebers relevant ist. Dies korreliert auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Bei allen Injektionen mit FSL-1 – unabhängig von der Dosis und der Art der Applikation - war TNF nur nach 60 Minuten nachweisbar, nach 120 bzw. 180 Minuten war seine Konzentration bereits unter die Nachweisgrenze gesunken. Die Höhe des Plasmawertes korrelierte mit der Dosis: bei Gabe der hohen FSL-1-Dosis wurde um ein Vielfaches mehr TNF gemessen. Bei der intraperitonealen Injektion war allerdings der gemessene TNF-Plasmaspiegel etwa sechs Mal niedriger als bei der intraarteriellen. Dies könnte darauf schließen lassen, dass TNF bei der Injektion von FSL-1 in die Bauchhöhle eher lokal von den infiltrierenden Makrophagen gebildet wird und so die Bildung weiterer Mediatoren wie IL-6 oder PGE<sub>2</sub> induziert, aber nicht unbedingt in gleichem Umfang in die Zirkulation gelangt. Der gemessene Wert an PGE<sub>2</sub> korreliert mit demjenigen von TNF. Obwohl die Fieberreaktion bei der intraarteriellen Injektion mit FSL-1 eher moderat war, zirkulierte im Blut mehr als sechs mal mehr TNF und drei mal soviel PGE<sub>2</sub> als bei der intraperitonealen Gabe. Möglicherweise ist TNF somit an der Induktion peripheren PGE<sub>2</sub>s beteiligt.

Die Menge an gebildetem TNF ist auch abhängig vom Pyrogen, bei Gabe von LPS z.B. war der Plasmaspiegel an TNF bei beiden Applikationsarten um ein Vielfaches höher als nach

Stimulation mit FSL-1 und zudem auch nach 120 bzw. 180 Minuten noch im Blut nachweisbar.

Die Aktivierung eines Signalweges erfolgt über zwei TNF-Rezeptoren (TNFR1/p55 und TNFR2/p75) (Goeddel 1999) und führt über verschiedene Transkriptionsfaktoren zur Translation von Zielgenen oder der Einleitung einer Apoptose. Da TNF für die Effekte von LPS eine essentielle Rolle spielt, wurden viele „Anti-TNF“ Strategien entwickelt. Antikörper gegen TNF beispielsweise führen zu einer signifikanten Abschwächung der LPS-Toxizität (Beutler et al. 1985). Lösliche TNF-Rezeptoren können *in vitro* und *in vivo* vor exzessiven TNF-Plasmaspiegeln schützen (van Zee et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, dass TNFbp (PEG(rsTNF-RI)<sub>2</sub>) zirkulierenden TNF nach Injektion von LPS oder MDP sehr effektiv neutralisieren kann; die zweite Fieberphase wurde deutlich abgeschwächt und der Plasmaspiegel an zirkulierendem IL-6 war ebenfalls deutlich niedriger (Roth et al. 1998). Bei Pavianen konnten die pathologischen Effekte einer *E.coli*-Bakterämie durch ein dimeres TNFbp erfolgreich blockiert werden (Solorzano et al. 1998). Bei sehr hohen LPS-Dosierungen, die bei Ratten zu einer anfänglichen Hypothermie mit nachfolgendem mehrtägigen Fieber führten, konnte der Temperaturabfall durch das TNFbp schneller überwunden werden (Töllner et al. 2000). Bei anderen Studien an Ratten wurde das Fieber durch TNFbp jedoch verstärkt. Es wird daher auch über eine antipyretische Wirkung von TNF diskutiert. Der pro- oder antipyretische Effekt von TNF hängt wohl von mehreren Faktoren ab: dem Stimulus (Kozak et al. 1995), der Dosis (Leon et al. 1997) und der jeweiligen Spezies (Roth et al. 1998).

Um überprüfen zu können, welche Rolle TNF bei dem durch FSL-1 induzierten Fieber spielt, wurde TNFbp zusammen mit dem Pyrogen injiziert und daraufhin die Entwicklung der Körpertemperatur beobachtet und die zirkulierenden Spiegel von IL-6 und TNF zu definierten Zeiten bestimmt. Bei der intraarteriellen Injektion konnte eine erste Phase des Fiebers vollständig unterdrückt werden, während es nach einigen Stunden in einer „zweiten Phase“ etwas über den Normalbereich anzusteigen schien, allerdings war dieser Anstieg nicht signifikant. Bei der intraperitonealen Gabe kam es nur anfangs zu einem kurzen und moderatem Anstieg der Temperatur, das Fieber wurde stark abgeschwächt. TNF wurde vollständig vom TNFbp neutralisiert, denn es war zu keinem Meßzeitpunkt im Blut nachzuweisen. Dies hatte auch Einfluß auf die Induktion von IL-6, denn bei beiden Applikationsarten war IL-6 deutlich abgeschwächt.

Da trotz allem noch erhöhte Konzentrationen an IL-6 gemessen werden konnte, scheint TNF nicht allein für dessen Induktion verantwortlich zu sein. Ein weiteres wichtige endogenes Pyrogen, das die Bildung von IL-6 induzieren kann, ist IL-1 $\beta$  (Zhang et al. 1990). Es wird lokal gebildet und erscheint daher nur in geringen Konzentrationen im Blut und entzieht sich daher oft der Detektion (Kluger 1991). Seine Beteiligung an der FSL-1 induzierten Fieberreaktion bzw. Induktion von IL-6 ist anzunehmen. Obwohl TNF vollständig neutralisiert wird, kommt es bei der intraartriellen Injektion von FSL-1 zu einem kurzen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg des Fiebers in der zweiten Phase. Dieser kann nicht durch das TNFbp selbst verursacht sein, denn die Tiere zeigten auf die Kontrollinjektion mit dem Bindungsprotein und PBS keinerlei Veränderung der Temperatur. Der Anstieg ist daher möglicherweise auf eine verzögerte Bildung von peripherem bzw. zentralem IL-6 und IL-1 $\beta$  zurückzuführen.

Bei LPS entwickelt sich das Fieber der kurzen ersten Phase wohl unabhängig von IL-6 und TNF, eine Beteiligung neuronaler Afferenzen wird daher angenommen (Blatteis & Sehic 1997). Bei FSL-1 kam es bei der i.p. Injektion zu einem kurzen leichten Anstieg des Fiebers. Es ist daher möglich, dass auch hier für die frühe Fieberphase der nervale Signalweg eine Rolle spielt, da vor allem bei Injektionen in die Bauchhöhle der *Nervus vagus* bei der Fieberentstehung mitzuwirken scheint. Trotzdem scheint nach Neutralisation von TNF die Menge an zirkulierendem IL-6 nicht auszureichen, um das Fieber aufrecht zu halten. Es ist möglich, dass das fehlende TNF und die dadurch bedingte fehlende oder verminderte Induktion weiterer Zytokine dafür verantwortlich sind.

TNF hat bei dem durch intraarteriell appliziertes FSL-1 induzierten monophasischen Fieber einen großen Einfluß auf die Erhöhung der Körpertemperatur. Bei der intraperitonealen Injektion scheinen wie erwähnt noch andere Mechanismen eine kurzzeitige Fieberentstehung verursachen zu können.

Schließlich muß noch erwähnt werden, dass TNF nicht nur in der Peripherie vorkommt, sondern auch im Gehirn, und seine jeweilige Rolle unterschiedlich ist. Daher müsste man das TNFbp intrazerebral injizieren, um mehr über die Bedeutung von zentralem TNF im FSL-1 induzierten Fieber zu erfahren.

#### 4.1.2.2 Die Bedeutung des IL-6

IL-6 wird als wichtiger endogener Mediator eines LPS induzierten Fiebers angesehen. Es ist an der zentralnervös kontrollierten APR beteiligt und somit an der Induktion von „sickness behavior“, Anorexie, Aktivierung der HPA-Achse und Fieber (Le May et al. 1990, Plata-Salaman 1996). Der gemessene Plasmaspiegel von IL-6 korreliert am besten mit einem LPS induzierten Fieber (Roth & De Souza 2001). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit beim FSL-1 induzierten Fieber beim Meerschweinchen bestätigt werden. Die Korrelation zwischen dem Fieber und dem IL-6-Level im Blutplasma konnte bei beiden Applikationsarten beobachtet werden. Zudem war die Menge an gebildetem IL-6 abhängig von der Dosis des injizierten FSL-1. Es wurde in beiden Fällen nach Injektion der hohen Dosis weit mehr IL-6 gebildet. Der mehr als doppelt so hohe Plasmaspiegel an IL-6 nach der intraperitonealen Injektion im Vergleich zu der intraarteriellen lässt sich eventuell auf Infiltration der Bauchhöhle mit Leukozyten zurückführen, die dann vermehrt IL-6 bilden, das dann auch in die Zirkulation abgegeben wird. Der in diesem Fall lokal in der Bauchhöhle gebildete Anteil an IL-6 bleibt spekulativ, da er nicht gemessen wurde. Die Bildung von IL-6 wird zumindest zum Teil von TNF induziert, so wurde der IL-6-Plasmaspiegel durch die Injektion des TNFbp deutlich abgeschwächt.

Versuche an IL-6-„knock-out“-Mäusen zeigten, dass die Applikation von IL-1 $\beta$  oder LPS kein Fieber hervorrufen konnte (Chai et al. 1996). Ebenso konnte die Gabe eines spezifischen Antiserums gegen IL-6 eine Fieberreaktion unterdrücken (Cartmell et al. 2000). Die lokale Injektion von IL-6 alleine (Cartmell et al. 2000) führte zu keinem Fieber, die systemische (Blatteis et al. 1990, Harré et al. 2002) nur zu einem moderaten. Man geht daher davon aus, dass die pyrogene Wirkung hauptsächlich von zentralem IL-6 hervorrufen wird.

Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass peripheres IL-6 in den Mengen, die 120 Minuten nach FSL-1 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Injektion i.p. gemessen wurden, für die Aufrechterhaltung eines 22h andauernden Fiebers verantwortlich ist, da relativ hohe Mengen an IL-6 benötigt werden, um überhaupt Fieber zu erzeugen. Es ist anzunehmen, dass in diesem Fall zentrales IL-6 eine viel größere Rolle spielt, bzw. weitere Mediatoren, die am inflammatorischen Geschehen beteiligt sind, wie z.B. IL-1 $\beta$  oder PGE<sub>2</sub>. Es scheint jedoch sinnvoll, dieses Zytokin auch in späteren Phasen des Fiebers quantitativ zu erfassen und zusätzlich eine zentrale Bildung dieses Zytokins nach Gabe von FSL-1 zu untersuchen.



Auf die Rolle des IL-6 bezüglich einer Aktivierung des STAT3 in den CVOs soll in Abschnitt 4.1.4 noch näher eingegangen werden.

### **4.1.3 Die Bedeutung von COX und Prostaglandinen**

PGE<sub>2</sub> wird eine Schlüsselrolle in der Fieberentstehung im Gehirn zugeschrieben (Roth et al. 2006, Blatteis et al. 2006). Prostaglandine erzeugen Fieber, wenn sie in die für die Thermoregulation zuständige Region des Gehirns, die POA injiziert werden (Scammel et al. 1996). Endothelzellen des Gehirns werden als die wichtigste Quelle für PGE<sub>2</sub> angesehen, da sie auf die Stimulation mit einem Pyrogen COX-2 und die mPGES exprimieren (Matsumura & Kobayashi 2004). Das zeitliche Auftreten von zentralem PGE<sub>2</sub> korreliert mit einem Anstieg des LPS-Fiebers (Inoue et al. 2002). Injektionen von Prostaglandinen in die Zirkulation oder direkt in das Gehirn führen zu einem schnellen Anstieg von ACTH im Blut (Turnbull & Rivier 1999). Dies wird wohl durch die Stimulation von hypothalamischen Neuronen durch PGE<sub>2</sub> verursacht, die dann CRF produzieren. Prostaglandine spielen also nicht nur in der Fieberentstehung, sondern auch bei der Aktivierung der HPA-Achse eine wichtige Rolle. Dies konnte allerdings nicht für das Meerschweinchen bestätigt werden, da die Gabe eines unselektiven (Diclofenac) oder präferentiellen (COX-2, Meloxicam) Hemmstoffes der Zyklooxygenase, einem Schlüsselenzym in der Entstehung des PGE<sub>2</sub>, die Cortisolwerte im Blut nicht beeinflusste (Roth et al. 2002).

Die systemische Gabe von Diclofenac oder Meloxicam kann jedoch das durch LPS hervorgerufene Fieber bei Ratten unterdrücken bzw. signifikant abschwächen (Roth et al. 2006). Beim Meerschweinchen hingegen hatte Meloxicam nur einen sehr schwachen Einfluß auf die Fieberreaktion, der sich auf die erste Phase des LPS- Fiebers beschränkte (Roth et al. 2002). Dies ist insofern erstaunlich, da in COX-2 defizienten Mäusen kein Fieber durch LPS hervorgerufen werden konnte, während dies in COX-1 defizienten durchaus gelang (Li et al. 1999). Dies könnte eventuell mit einer zu niedrigen Dosis an Meloxicam zusammenhängen, oder der konstitutiv exprimierten COX-1 ebenfalls eine Rolle in der Fieberentstehung beim Meerschweinchen einräumen. Auch in dieser Studie führten Versuche mit dem selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib zu keinen nennenswerten Beeinträchtigungen der durch FSL-1 induzierten Fieberreaktion (Daten nicht gezeigt). Die Gründe hierfür bleiben zunächst spekulativ.

Die Gabe des unselektiven COX-Hemmstoffes Diclofenac konnte, sowohl bei der intraarteriellen, als auch bei der intraperitonealen Injektion von FSL-1, das Fieber komplett unterdrücken. TNF und IL-6 wurden in beiden Fällen davon nicht beeinflusst.

Es konnte bei der Injektion von FSL-1 und Diclofenac nur ein basaler Level an PGE<sub>2</sub> im Blut gemessen werden, der mit den basalen Werten anderer Spezies korreliert. Der Wert bei der FSL-1 Injektion naiver Tiere war hingegen um ein Mehrfaches erhöht. Diese Erhöhung ist etwa mit der Erhöhung bei Gabe von LPS beim Meerschweinchen und anderen Spezies vergleichbar (Davidson et al. 2001, Kozak et al. 2006, Li et al. 2006).

Erstaunlicherweise war die Konzentration an PGE<sub>2</sub> im Plasma bei der intraarteriellen Injektion von FSL-1 höher als bei der intraperitonealen, obwohl dies nicht mit der Stärke der Fieberantwort korrelierte. Es wird diskutiert, ob peripheres PGE<sub>2</sub> erst auf die Induktion von Zytokinen hin gebildet wird, oder direkt auf den pyrogenen Stimulus in Kupffer Zellen der Leber (Blatteis 2006). Letzteres könnte die vermehrte Bildung von PGE<sub>2</sub> bei intraperitonealer Gabe erklären. Es wird angenommen, dass peripheres PGE<sub>2</sub> eher für die Entstehung des Fiebers und zentrales PGE<sub>2</sub> eher für die Aufrechterhaltung des Fiebers zuständig ist (Blatteis 2006).

Für Diclofenac wird ein relativ langsamer, passiver Transport durch die Blut-Hirn Schranke beschrieben (Dehouck et al. 1992). Daher ist nicht auszuschließen, dass die Substanz in unseren Versuchen auch die zentrale Bildung von PGE<sub>2</sub> verhindert hat.

Wie in 4.1.4 beschrieben, wird IL-6 aufgrund der STAT3-Aktivierung und dessen Kolokalisation mit einer COX-2-Immunreaktivität eine entscheidende Rolle bei der Induktion von PGE<sub>2</sub> zugeschrieben. Außer IL-6 ist auch IL-1 $\beta$  über den NF- $\kappa$ B an der Induktion von COX-2 beteiligt, dieser Weg wurde lange als wichtigster angesehen. Die Rolle des NF-IL6 in der COX-2-Induktion bleibt fraglich (Rummel et al. 2006). Da die Gabe des unselektiven COX-Inhibitors Diclofenac das FSL-1 induzierte Fieber und den FSL-1 induzierten Anstieg an PGE<sub>2</sub> vollständig unterdrücken konnte, spricht dies für eine essentielle Beteiligung der Zyklooxygenasen am Fiebergeschehen nach Stimulation mit mycoplasmalen Lipopeptiden.

#### **4.1.4 Die Beteiligung der CVOs**

Systemisches IL-6 ist in der Lage, im Gehirn die nukleäre Translokation des STAT3 in Strukturen mit fehlender BHS und Endothelzellen entlang der BHS zu bewirken (Harré et al.

2002, Rummel et al. 2005). Da zirkulierendes IL-6 offensichtlich an der FSL-1 induzierten Fieberentstehung beteiligt ist, sollte geklärt werden, ob es, wie bei LPS-induzierten Fieber schon hinreichend erforscht, auch im hier eingesetzten Fiebermodell über die CVOs von der Peripherie in die thermoregulatorischen Zentren des Gehirns gelangt. Die CVOs werden aufgrund ihrer fehlenden Blut-Hirn Schranke als Zielstruktur für endogene Pyrogene angesehen (Blatteis & Sehic 1997). Die Zytokine interagieren dort mit ihren spezifischen Rezeptoren und können dadurch z.B. die Induktion von PGE<sub>2</sub> induzieren, welches als zentraler Mediator in der Fieberentstehung angesehen wird.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 wird durch die Interaktion von IL-6 mit seinem Rezeptor aktiviert. LPS beispielsweise kann die Expression des IL-6R und seinem Adaptermolekül gp130 in den CVOs induzieren, und IL-6 kann die Expression seines Rezeptors innerhalb zentraler Blutgefäße selbst induzieren (Vallières & Rivest 1997). Viele Zellen wie Neurone und Astrozyten sind für ihre Aktivierung auf die Anwesenheit des sIL-6R angewiesen (März et al. 1999). Die immunhistochemische Detektion von STAT3 ist eine sichere Methode zum Nachweis einer IL-6 vermittelten Zellaktivierung, daher wurde sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die nukleäre Translokation von STAT3 nach Stimulation mit Pyrogenen ist IL-6 induziert und findet vor allem in der POA und den CVOs statt (Rummel et al. 2004, Harré et al. 2002). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn STAT3-Signale waren in den CVOs SFO, OVLT und AP zu finden, und darüber hinaus in Endothelzellen des gesamten Gehirns und in den Meningen. Obwohl keine Zählung der Kerne mit STAT3-Signalen erfolgte, war es offensichtlich, dass es bei Stimulation mit FSL-1 deutlich weniger Signale sind, als sich beim Meerschweinchen nach intraarterieller LPS-Injektion im Gehirn finden (Vergleich mit Studien unserer eigenen Arbeitsgruppe: Rummel et al. 2004, 2005). Das hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass es nach FSL-1 i.a. Injektion nur zu einem moderaten Fieber und auch weit niedrigeren IL-6-Werten im Blut kommt als nach LPS-Gabe. Nukleäre STAT3-Translokation nach Stimulation mit LPS konnte beim Meerschweinchen nur nachgewiesen werden, wenn der Plasmalevel an IL-6 einen bestimmten Schwellenwert überschritten hatte (Rummel et al. 2004). Der Plasmaspiegel an IL-6 korreliert bei Gabe von LPS mit der Anzahl an nukleären STAT3-Signalen (Roth et al. 2004). Da nachgewiesen werden konnte, dass STAT3-positive Endothelzellen und perivaskuläre Zellen mit einer COX-2 Immunreaktivität kolokalisiert waren (Rummel et al. 2006), wird angenommen, dass IL-6 direkt zur Bildung von PGE<sub>2</sub> beiträgt. Die nachgewiesene Zellaktivierung in den CVOs durch FSL-1 induziertes IL-6 trägt also aller Wahrscheinlichkeit

nach zu einer Genexpression der COX-2 bei. Inwieweit das zeitliche Auftreten der STAT3-Signale mit dem IL-6-Plasmaspiegel korreliert, ist nicht abschließend zu sagen, da in den hier durchgeführten Versuchen nur nach 120 Minuten perfundiert wurde und somit in der Anstiegsphase des Fiebers und der IL-6-Werte. Eine zeitliche Relation zwischen Fieber und dem Auftreten nukleärer STAT3-Signale konnte für LPS bei der Ratte gezeigt werden (Harré et al. 2002).

Im Rahmen der humoralen Fieberhypothese spielen auch die Toll-like Rezeptoren eine große Rolle. Sie sind ein wichtiger Teil der komplexen angeborenen Immunantwort (Uematsu & Akira 2006) und sie befinden sich nicht nur in der Peripherie, sondern auch im ZNS. TLR2 und TLR4 beispielsweise werden in den CVOs und dem Plexus chorioideus exprimiert (Laflamme et al. 2003). Es kommt nach Stimulation mit LPS zu einer vermehrten Expression des CD14 und des TLR4 im Bereich der CVOs (Laflamme & Rivest 2001). TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9 mRNA konnte in kultivierten Astrozyten nachgewiesen werden (Bowman et al 2003). Diese Expression ist anscheinend von einem Stimulus abhängig. Vermutlich können also Zellen des Gehirns, wie z.B. Astrozyten, selbst auf eine Stimulation mit einem exogenen Pyrogen, in diesem Fall FSL-1, zur Immunantwort beitragen und zentrale Symptome der APR vermitteln. Dies könnte wohl vor allem in der Anfangsphase des Fiebers von entscheidender Bedeutung sein. Eine mögliche Beteiligung an der Fieberentstehung durch eine direkte Aktivierung von TLRs in Gehirnzellen im Bereich der CVOs durch PAMPs muß jedoch noch systematisch untersucht werden.

#### **4.1.4.1 Aktivierte Zellphänotypen**

Im Rahmen des Nachweises von STAT3 wurden auch Kollokalisationsmarker zur Detektion verschiedener Zelltypen verwendet. Bei dem neuronalen Marker NeuN wurden nur Neurone außerhalb der CVOs markiert, obwohl eine Existenz dieser Zellen in den CVOs bewiesen ist. Daher konnte eine neuronale Kollokalisierung mit STAT3 nicht nachgewiesen, aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Es gibt nämlich Hinweise darauf, dass der hier eingesetzte neuronale Marker NeuN in Neuronen der sCVOs nicht „greift“ (McKinley, Hübschle, persönliche Mitteilung). Es ist kann also nicht ausgeschlossen werden, dass IL-6 thermoregulatorisch relevante Neurone stimulieren kann.

Eine STAT3-Aktivierung findet in den Endothelzellen des gesamten Gefäßsystems des Gehirns statt, so dass diese Zellen als wichtigste Zielzellen zirkulierender endogener Pyrogene angesehen werden können (Matsumura & Kobayashi 2004). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn nukleäre Translokationen des STAT3 erfolgten 120 Minuten nach Injektion von FSL-1 i.a. in Endothelzellen im gesamten Gefäßsystem des Gehirns. In der Annahme einer Genexpression von COX-2 würde folglich eine Bildung von PGE<sub>2</sub> ebenfalls überall dort stattfinden. Studien zeigten aber, dass eine Expression des für die Fieberantwort zuständigen PGE<sub>2</sub>-Rezeptors EP3 hauptsächlich in den thermoregulatorischen hypothalamischen Strukturen erfolgt (Ek et al. 2000, Scammel et al. 1996), d.h. gebildetes PGE<sub>2</sub> muß - wahrscheinlich über die CVOs - dorthin gelangen.

Astrozyten gelten aufgrund ihrer Fähigkeiten als Vermittler von Entzündungs- und Immunreaktionen des Gehirns. Die LPS-Stimulation von kultivierten Astrozyten führt zu einer Produktion von IL-1, TNF und IL-6 (Lieberman et al. 1989). Innerhalb der CVOs befanden sich nukleäre Translokationen von STAT3 außer in Endothelzellen auch in GFAP-positiven Zellen, und zwar vor allem in den Randbereichen der drei Strukturen AP, OVLT und SFO. Die Kollokalisierung von STAT3 mit Astrozyten konnte für LPS in anderen Studien bei der Ratte schon gezeigt werden, sogar für andere Strukturen als den CVOs (Harré et al. 2003, Gautron et al. 2002). Beim Merschweinchen beschränkten sich die nukleären STAT3-Signale in Astrozyten allerdings auf die sCVOs (Rummel et al. 2005), was auch bei der Stimulation mit FSL-1 i.a. der Fall war. Allerdings waren diese Kollokalisierungen im Vergleich zu denen mit Endothelzellen eher selten und z.T. nicht eindeutig einem Astrozyten zuzuordnen. Dass es sich oft nur um zytoplasmatische Signale handelte oder dass auch andere Zellen involviert waren, die nicht markiert waren, wie etwa Mikrogliazellen, konnte nicht ausgeschlossen werden.

## **4.2 Toleranz-Erscheinungen gegenüber Pyrogenen**

### **4.2.1 Die Endotoxin-Toleranz**

Das Phänomen einer Endotoxintoleranz ist schon seit über einem halben Jahrhundert bekannt (Beeson 1947) und wird als ein bei Stimulation mit subletalen LPS-Dosierungen refraktäres Stadium gegenüber dem Endotoxin definiert. Dabei kann eine frühe und eine späte Phase

unterschieden werden, während es sich bei letzterer um eine immunologische handelt. Daher ist nur die erste Phase für diese Studie interessant. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, die sie hervorrufen. Es handelt sich dabei beispielsweise um eine verminderte Bildung von Zytokinen, insbesondere TNF- $\alpha$  (Zeisberger & Roth 1998), eine verminderte Ansprechbarkeit ihrer Rezeptoren bzw. die Blockade ihres Signalweges durch konstitutive Inhibitoren (Rakesh & Agrawal 2005), oder die Bildung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 (Frankenberger et al. 1995, Tripp et al. 1998). Eine veränderte Ansprechbarkeit neuronaler Rezeptoren für PGE<sub>2</sub> (Chemo et al. 1997), die Down-Regulierung von TLRs (Nomura et al. 2000) oder die Beeinflussung der Signalkaskade an den betreffenden TLRs an verschiedensten Zwischenschritten werden ebenfalls als Ursachen für eine Toleranz bzw. Kreuztoleranzentwicklung in Betracht gezogen, welche letztendlich wiederum in einer verminderten Bildung von sekundären Botenstoffen resultieren.

Die wiederholte Stimulation von Makrophagen mit LPS führte zu einer verminderten Transkription der TNF mRNA und der Ausschüttung von TNF sowie der folglich verminderten Ausschüttung von IL-6 (Zuckermann & Evans 1992). Diese Beobachtungen konnten auch *in vivo* verifiziert werden. Die wiederholte Gabe von LPS führen beim Meerschweinchen (i.m) und bei der Ratte (i.p.) zu einer Toleranz, die mit einer abgeschwächten Fieberreaktion und der Abnahme der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF einhergeht (Roth et al. 1994a, Tripp et al. 1998). Allerdings wurden Toleranzversuche mit LPS bei Meerschweinchen noch nie mittels intraarterieller oder intraperitonealer Injektionen durchgeführt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren daher z.T. überraschend. Bei beiden Applikationsarten von LPS kam es zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Toleranz, die zweite Phase der Fieberreaktion wurde erst ab der dritten (i.a.) bzw. vierten (i.p.) Injektion signifikant abgeschwächt. Allerdings kommt es bei Ratten sogar zu einer völligen Unterdrückung der Fieberreaktion bei mehrmaliger Stimulation mit LPS i.p., während die Toleranzentwicklung beim Meerschweinchen eher moderat war. Das Fieber blieb bis zur fünften Injektion biphasisch, die zweite Phase erreichte jedoch schneller wieder die Ausgangstemperatur.

Bei Ratten wurde nach der dritten intraperitonealen Injektion von LPS gar kein TNF mehr gebildet, während IL-6 deutlich absank (Tripp et al 1998). Bei der intraarteriellen Stimulation der Meerschweinchen mit LPS wurden ab der dritten Injektion signifikant weniger TNF und ab der vierten signifikant weniger IL-6 gebildet, bei der intraperitonealen Injektion nahmen beide Zytokine ab der vierten LPS-Injektion signifikant ab. Da die erste Phase des Fiebers

gleich blieb, ist anzunehmen, dass für die Induktion der ersten Phase des LPS-Fiebers der nervale, von zirkulierenden Zytokinen unabhängige Weg eine wichtige Rolle spielt. Diese nervale Fieberhypothese ist für LPS schon mehrfach nachgewiesen worden (Zeisberger 1999, Ross et al. 2000, Blatteis 2006). Die Abschwächung der zweiten Fieberphase könnte dann auf das verminderte Signal der Zytokine aus der Peripherie zurückzuführen sein. Desweiteren ist möglicherweise die Stimulation der für LPS zuständigen Rezeptoren in den CVOs (TLR4 und CD14) durch das Pyrogen selbst an der Entstehung der ersten Phase des Fiebers beteiligt.

Anders als bei FSL-1 konnte nach allen fünf Injektionen von LPS auch nach 180 Minuten (i.a.) bzw. 120 Minuten (i.p.) noch TNF gemessen werden. Die Menge der gebildeten Zytokine ist also offensichtlich abhängig von der Art des Pyrogens. FSL-1 verursacht im Gegensatz zu LPS eine weitaus moderateres Fieber und eine niedrigere Produktion an proinflammatorischen Zytokinen.

Es wird angenommen, dass eine verminderte Antwort von Zellen auf LPS von der Expression der TLRs unabhängig ist (Medvedev et al. 2001), daher wird die Modulation mehrerer in die Signalkaskade involvierte Proteine wie SOCS-1 (Nakagawa et al. 2002) oder IRAK-1 und IRAK-M (Kobayashi et al. 2002) für eine Toleranzentwicklung in Betracht gezogen. Auch die vermehrte Expression hemmender Faktoren in dieser Signalkaskade wie PIAS sind involviert. Weitere für die Ausbildung einer LPS-Toleranz bestehende Theorien wurden in 1.9.1 eingehend beschrieben.

#### **4.2.2 Die Toleranz gegenüber FSL-1**

Die Toleranzentwicklung auf verschiedene exogene oder endogene Pyrogene ist sehr unterschiedlich. Die intravenöse Injektion von PI:PC beispielsweise führte beim Kaninchen zu keiner Toleranz (Soszynski et al. 1991), beim Meerschweinchen war sie bei intraarterieller (Voss et al. 2006) und intramuskulärer (Cooper et al. 1988) Injektion nur transient. Bei wiederholter Gabe von MDP kommt es zu einer abgeschwächten zweiten Fieberphase (Soszynski et al. 1991, Roth et al. 1997b), allerdings kommt es zu keiner signifikanten Abnahme der Zytokine IL-6 oder TNF (Roth et al. 1997b). Die systemische Injektion von TNF führte zu einer leichten Abschwächung der zweiten Fieberphase (Goldbach et al. 1996b), die wiederholte intrazerebrale Infusion dieses Zytokins konnte keine Toleranz auslösen (Goldbach et al. 1996a).

Bei der intraarteriellen Gabe von FSL-1 entwickelte sich keine Toleranz bezüglich der Fieberantwort, alle fünf Injektionen resultierten in einem etwa gleichhohen Fieber. Erstaunlicherweise war aber der gemessene TNF-Plasmaspiegel ab der dritten Stimulation mit FSL-1 signifikant niedriger. Dies spricht dafür, dass TNF wohl nur einen bestimmten Schwellenwert überschreiten muß, um Fieber zu erzeugen.

IL-6 sank zwar kontinuierlich leicht ab, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Dies kann allerdings auch mit der hohen Streuung der Einzeltierwerte und der moderaten Gruppengöße (n=5) zusammenhängen. Da TNF an der Induktion von IL-6 beteiligt ist, scheint sein Absinken wohl auch den sinkenden IL-6-Plasmaspiegel zumindest teilweise zu verursachen. Peripheres IL-6 scheint also nicht alleine für eine Aufrechterhaltung des Fiebers verantwortlich zu sein, denn trotz seines Absinkens nach jeder weiteren Injektion, entwickelte sich gleichhohes Fieber. Dies spricht dafür, dass noch andere Mediatoren wie IL-1 $\beta$  oder PGE<sub>2</sub>, bzw. zentrales IL-6 die Dauer und Art des Fiebers beeinflussen.

Bei Gabe von FSL-1 i.p. kam es zu einer transienten Fieberabschwächung, ähnlich wie bei wiederholter Injektion von PI:PC i.a. (Voss et al. 2006). Der IL-6 Spiegel korrelierte hier mit der Höhe des Fiebers, erst fiel der Wert zur dritten Injektion hin ab, dann stieg IL-6 im Plasma zur fünften Injektion hin wieder leicht an. TNF dagegen war ab der dritten Injektion von FSL-1 signifikant niedriger und blieb es auch bis zur fünften Injektion. Der weit geringere TNF-Spiegel scheint also für eine IL-6-Induktion und die Entstehung des Fiebers auszureichen, dies spricht auch hier wieder für einen bestimmten Schwellenwert von TNF, der zur Aufrechterhaltung des Fiebers ausreichen könnte.

Die bei beiden Applikationsarten verminderte Bildung von TNF kann durch eine Verschiebung der NF- $\kappa$ B p50/p65 Heterodimere zugunsten der p50/p50 Homodimere mitverursacht sein, die die Transkription der für die TNF-Bildung zuständigen Gene blockieren (Ziegler-Heitbrock et al. 1994).

Die fehlende Induktion einer Toleranz bzw. die transiente Toleranz gegenüber FSL-1 liefern einen weiteren Hinweis dafür, dass LPS und FSL-1 unterschiedliche Signalwege aktivieren. Dieses Ergebnis begründet sich sicher auch darauf, dass LPS den TLR4 aktiviert und mycoplasmale Lipopeptide dagegen das TLR2/6 Heterodimer.

Die Expression von Zytokinen auf die Stimulation mit LPS wird in der Peripherie und dem ZNS unterschiedlich reguliert. IL-1 $\beta$  und IL-6, nicht aber TNF- $\alpha$  scheinen die wichtigsten Zytokine bezüglich der Induktion des komplexen Zytokinnetzwerkes innerhalb des ZNS zu sein (Chen et al. 2005). Es ist daher gut möglich, dass trotz des sinkenden peripheren



Zytokinspiegels bei mehrmaliger Stimulation mit einem exogenen Pyrogen, IL-6, IL-1 $\beta$  und z.T. auch TNF im Gehirn weiterhin gebildet werden (Chen et al. 2005) und dies für eine Fieberinduktion durch FSL-1, auch nach wiederholten Gaben, noch ausreichend ist. Über eine Beteiligung antiinflammatorischer Zytokine an der Toleranzentwicklung gegenüber FSL-1 kann nur spekuliert werden, da im Rahmen dieser Studie keine Messungen dieser Zytokine erfolgten.

#### 4.2.3 Die Kreuztoleranz

Es wurden bisher noch keine *in vivo* Versuche mit FSL-1 bezüglich einer Kreuztoleranzentwicklung mit LPS durchgeführt.

Bei den wiederholt mit FSL-1 i.a. vorstimulierten Tieren kam es zu keiner Kreuztoleranz mit LPS. IL-6 wurde bei vorstimulierten und naiven Tieren nach Gabe von LPS in der gleichen Konzentration gemessen, während TNF allerdings bei den vorstimulierten Meerschweinchen signifikant niedriger war. Dies spricht dafür, dass TNF nicht allein für die Initiierung des LPS-Fiebers zuständig ist. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer Studie von Deiters et al. (2003), die zeigte, dass eine Vorbehandlung von Mäusen mit MALP-2 diese zwar vor einer letalen Dosis TNF, nicht aber vor einer letalen Dosis LPS schützen kann. Es kommt wohl nicht nur zu einer verminderten Bildung an TNF, sondern auch zu einer verminderten Ansprechbarkeit seiner Rezeptoren im Zustand einer induzierten Kreuztoleranz.

Ebenfalls keine Kreuztoleranz entwickelte sich nach der Gabe von FSL-1 bei wiederholt mit LPS i.a. vorstimulierten Tieren. Während hier die TNF Konzentration in beiden Versuchsgruppen gleich war, war der IL-6 Spiegel bei vorstimulierten Tieren sogar leicht, aber nicht signifikant erhöht.

Erstaunlicherweise kam es jedoch bei der wiederholten intraperitonealen Vorstimulation mit FSL-1 zu einer Kreuztoleranz mit LPS. Sowohl TNF als auch IL-6 wurden in viel geringerer Konzentration nach Gabe von LPS gemessen, wenn die Tiere vorher wiederholt mit FSL-1 behandelt worden waren.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der wiederholten LPS-Vorstimulation erzielt werden, hier setzte der Fieberanstieg nach Injektion von LPS bei den wiederholt mit FSL-1 vorstimulierten Tieren sogar später ein und der Verlauf des Fiebers war nur noch monophasisch, während die Injektion von LPS i.p. bei naiven Tieren ein biphasisches Fieber erzeugte. Die gemessenen

Zytokinewerte von IL-6 und TNF lagen bei den vorstimulierten Tieren niedriger, aber aufgrund der Streuung der Einzeltierwerte war die Abschwächung nicht signifikant.

Warum kommt es nun bei der intraarteriellen Vorstimulation zu keiner Kreuztoleranz, während sich bei der intraperitonealen eine solche recht deutlich ausbildet?

Anscheinend spielt, wie bei LPS, auch bei Stimulation mit FSL-1 die verminderte Produktion beider Zytokine IL-6 und TNF für eine entstehende Toleranz eine Rolle. Bei den FSL-1 i.a. vorstimulierten Tieren kommt es zwar offensichtlich zu einer verminderten Bildung an TNF und einer verminderten Ansprechbarkeit ihrer Rezeptoren, trotzdem kann LPS gleichhohes Fieber erzeugen wie bei naiven Tieren. Auch die LPS i.a. Vorstimulation führt zu keiner Kreuztoleranz mit FSL-1, weder im Bezug auf Fieber noch auf die Zytokine. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer Studie mit MDP, bei der es ebenfalls keine Kreuztoleranz mit LPS gab (Roth et al. 1997a). Da LPS im Gegensatz zu FSL-1 in der Lage ist, einen MyD88 unabhängigen Signalweg über TLR4 zu aktivieren (Kawai & Akira 2005), könnte dieser bei der i.a. Stimulation eine größere Rolle spielen.

Bei den intraperitonealen Vorstimulationen kommt es im Gegenzug dazu in beiden Fällen zu signifikanten Abschwächungen beider gemessener Zytokine. In der Studie von Deiters et al. (2003) führte eine Vorstimulation mit MALP-2 i.p. bei Mäusen ebenfalls nach folgender LPS-Gabe zu einer Reduktion der Plasmaspiegel an TNF und IL-6.

Die Art der entstehenden Kreuztoleranz ist offensichtlich abhängig von der Art der Applikation. FSL-1 und LPS aktivieren unterschiedliche Rezeptoren, und die Expression dieser Rezeptoren ist in verschiedenen Geweben und potenziellen Zielzellen unterschiedlich. Makrophagen beispielsweise können sowohl auf die Stimulation mit LPS als auch FSL-1 antworten, während Zellen wie NK (Natural killer cells) TLR2 negativ sind (Flo et al. 2001) und somit wahrscheinlich auch keine Toleranz bezüglich FSL-1 ausbilden. So kommt es möglicherweise durch die wiederholte Aktivierung von Zellen in der Bauchhöhle, die die TLRs 4 bzw. 2/6 koexprimieren, zu einer Induktion von Mechanismen, die regulierend in die Signalkaskade eingreifen. Es wird angenommen, dass nicht die Downregulierung der TLRs für eine Kreuztoleranz eine Rolle spielt, sondern eher in die Signalkaskade involvierte Proteine wie ST2 (Feterowski et al. 2005) oder IRAK-1 bzw. IRAK-M (Sato et al. 2002).

Für die Rezeptoren ist bekannt, dass sie über einen MyD88 abhängigen Weg zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder cJun führen können. Bei MALP-2 Vorstimulation kam es *in vitro* zu einer abgeschwächten Bildung von TNF- $\alpha$  (Sato et al. 2000) und zu einer verminderten Aktivierung

von c-Jun und NF- $\kappa$ B. Die verminderte Bildung an TNF wird, wie in 4.2.2 bereits erwähnt, wahrscheinlich durch eine Verschiebung des NF- $\kappa$ B p50/p65-Verhältnisses verursacht.

Im Rahmen der nervalen Fieberhypothese (1.8.4) wird dem *Nervus vagus* eine Schlüsselrolle bei der Fieberentstehung zugeschrieben. Es wurde nachgewiesen, dass die Bedeutung des nervalen Signalweges von der Art der Applikation abhängig ist und vor allem eine Rolle bei der intraperitonealen Injektion hat. Es ist daher möglich, dass es nach mehrmaliger Stimulation mit FSL-1 i.p. zu einer Abnahme der Ansprechbarkeit der IL-1 $\beta$  oder PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren in vagalen afferenten Nervenfasern kommt (Chemo et al. 1997). Der Beitrag anderer Faktoren an der Toleranzentwicklung, wie z.B. anti-inflammatorischer Zytokine oder Glucocortikoide, wird diskutiert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich bei der Entstehung einer Toleranz bzw. Kreuztoleranz um ein multifaktorielles Geschehen vieler einzelner Mechanismen handelt. Welche Mechanismen im Bezug auf eine Toleranz gegenüber FSL-1 oder einer Kreuztoleranz mit LPS im Einzelnen aktiviert werden, oder eben nicht, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilt werden.

#### **4.2.4 Anorektische Eigenschaften von FSL-1**

Eine wiederholte Stimulation mit LPS führt nicht nur zu Toleranzerscheinungen bezüglich des Fiebers und der Induktion proinflammatorischer Zytokine, sondern kann auch weitere Symptome des „sickness behavior“ abschwächen. Eine intrazerebrale Gabe von *M.fermentans* führte bei Ratten zur Produktion von Prostaglandinen, TNF und IL-1, die für eine Verhaltensänderung wie Anorexie und den Verlust sozialer Aktivitäten verantwortlich gemacht werden (Yirmiya et al. 1997,1999).

Dies konnte z.T. auch bei intraperitonealer Gabe von MALP-2 oder FSL-1 bei Ratten gezeigt werden (Hübschle et al. 2006). Im Rahmen der Toleranzversuche wurden daher die Körpergewichtsentwicklungen der Tiere analysiert.

TNF wurde als ein wichtiger Vermittler von Kachexie identifiziert. Er hat unter anderem Auswirkungen auf Symptome des „sickness behavior“, denn Ratten konnten nach Gabe von TNFbp bei hohen LPS-Dosierungen eine entstehende Anorexie und Adipsie schneller überwinden (Töllner et al. 2000). Der Einfluß von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-1 auf diese Symptome ist bekannt (Plata-Salaman 1996). Da TNF allerdings nur für

wenige Stunden nach Stimulation mit einem Pyrogen im Blut nachgewiesen werden kann, scheint es die Bildung weiterer Stoffe zu induzieren, die die Anorexie über einen längeren Zeitraum vermitteln. Dazu gehört z.B. Leptin, ein Peptidhormon, das eine Rolle in der Regulation des Körpergewichtes spielt und das durch TNF (Finck et al. 1998) induziert werden kann. In der vorliegenden Arbeit nahmen die Tiere nach Injektion von FSL-1 und TNFbp bei beiden Applikationsarten durchgehend zu (nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass TNFbp durch die Neutralisation von TNF auch die Bildung von Leptin oder anderen für die Regulation des Körpergewichtes verantwortliche Stoffe beeinflussen kann. Bei der intraarteriellen Injektion im Rahmen der Toleranzversuche war die Gewichtsabnahme bei der zweiten Injektion am größten, bei allen anderen Injektionen bewegten sich die Zu- und Abnahmen im einem Bereich von  $\pm 5g$ . Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit den gemessenen TNF-Werten, die nach der dritten Injektion signifikant niedriger waren. Warum gerade die zweite FSL-1 Injektion die größte Anorexie verursachte, bleibt fraglich. Ähnlich heterogen sind die Ergebnisse nach FSL-1 i.p. Injektion. Hier war die Gewichtsabnahme nicht sehr groß, zwischenzeitlich nahmen die Tiere zu, dann wieder geringgradig ab. Diese Ergebnisse korrelieren eher mit dem Fieberindex bzw. den gemessenen Werten an IL-6. Für die Beteiligung von TNF spricht, dass die Abnahme am ersten Injektionstag am größten ist, hier wurde auch der höchste FSL-1 induzierte TNF-Spiegel gemessen. Die Rolle von TNF an der Anorexie, einem Teil des „sickness behavior“, kann angenommen werden, es ist jedoch davon auszugehen, dass weitere Faktoren daran beteiligt sind. Aufgrund der geringen Tierzahlen und der daraus resultierenden Heterogenität der Gewichte wären weitere Studien zur Verifizierung dieser Tendenz erforderlich.

Bei mehrmaliger Injektion von LPS waren die Ergebnisse homogener. Es kam bei beiden Applikationsarten durchgehend zu einer Gewichtsabnahme der Tiere, diese wurde jedoch zu den letzten Injektionen hin schwächer, allerdings war diese Abschwächung bei der intraarteriellen Injektion nicht signifikant. Diese Tendenz korreliert sowohl mit den gemessenen TNF-Werten, als auch den IL-6-Werten.

Natürlich sind auch andere proinflammatorische Zytokine (Dantzer 2001) oder der neuronale Signalweg (Konsman et al. 2000) am „sickness behavior“ beteiligt. Inwieweit dies auch für FSL-1 gilt, ist nur zu vermuten, aber nicht mit abschließender Sicherheit zu sagen, da diese Verhaltensparameter nicht untersucht wurden.

### 4.3 Ausblick

Die meisten Mycoplasmenarten sind nicht pathogen. Oft sind sie nur als Kommensalen auf Schleimhäuten zu finden. Trotzdem gibt es auch einige pathogene Vertreter dieser Spezies, die z.B. bei Erkrankungen des Respirationstraktes, der Gelenke oder des Urogenitaltraktes eine Rolle spielen, oder sogar als Kofaktoren bei HIV angesehen werden. Die Erforschung mycoplasmaler Lipopeptide, die aus der Membran von Myoplasmen isoliert werden können und denen eine biologische Wirkung zugeschrieben wird, ist daher von großer Relevanz.

Studien an MALP-2 aus *M.fermentans* haben gezeigt, dass diese Substanz zwar prinzipiell pyrogene Eigenschaften besitzt, aber weit weniger potent ist als LPS. Desweiteren konnten sogar mehrere positive Effekte mit Hilfe von MALP-2 erzielt werden, wie etwa eine Beschleunigung der Wundheilung, der Einsatz als mukosales Adjuvans oder eine längere Überlebenszeit bei Pankreaskrebs.

Für FSL-1, als die N-terminale Sequenz eines LP44 aus *M. salivarium*, konnten in dieser Arbeit ebenfalls pyrogene Eigenschaften nachgewiesen werden. Es kommt auf die Stimulation mit dieser Substanz bei Meerschweinchen zur Entstehung von Fieber, zum Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 im Blut, zu einer nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3, der als Indikator einer IL-6 Aktivierung im Gehirn gilt, zur Bildung von PGE<sub>2</sub> und zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Anorexie, als einem Symptom des „sickness behavior“. Trotz seiner Pyrogenizität ist FSL-1 aufgrund der ermittelten Ergebnisse weit weniger potent als LPS.

Anders als bei LPS unterbleibt eine Toleranzentwicklung gegenüber FSL-1 völlig (i.a.), oder wird nur unvollständig (i.p.) ausgebildet. Eine Kreuztoleranz mit LPS hingegen hängt von der Art der Applikation ab. Welche Mechanismen im Bezug auf eine Toleranz gegenüber FSL-1 oder einer Kreuztoleranz mit LPS im Einzelnen aktiviert werden, oder welche Aktivierung bei einer fehlenden Toleranz im Gegenzug unterbleibt, bedarf noch weiterer spezieller Untersuchungen.

Zur Vervollständigung der Daten über die biologischen Eigenschaften von FSL-1 sind in Zukunft noch umfassende weitere Studien notwendig, beispielsweise um die Effekte anderer Applikationsarten als die in der vorliegenden Arbeit gewählten, die Beteiligung des N.vagus am Fiebergeschehen oder die Rolle zentraler Zytokine zu klären. Die Bedeutung der TLRs als Teile der angeborenen Immunantwort im Rahmen ermittelter Eigenschaften von FSL-1 können durch Knock-out-Studien, die z.Z. in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt werden,

aufgeklärt werden. Derartige Untersuchungen könnten einige kontroverse Ergebnisse zwischen *in vitro* und *in vivo* Befunden möglicherweise klären. Auch offensichtliche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zu dem „klassischen“ Pyrogen LPS oder zu dem Struktur analogon MALP-2 könnten mit Hilfe derartiger Ansätze untersucht werden. Ob MALP-2 bzw. FSL-1 durch ihre pyrogenen Eigenschaften tatsächlich das „Ende einer Ära des LPS-Monopols“ (Galanos et al. 2000) einleiten, bleibt somit noch offen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Mycoplasmen stellen eine große Gruppe prokariotischer Organismen dar, die sich von anderen Bakterien durch ihre geringe Größe und dem Fehlen einer Zellwand unterscheiden. Diacylierte Lipopeptide aus Mycoplasmen agieren als sogenannte „Pathogen- assoziierte Molekülstrukturen“ (PAMPs) und stimulieren das angeborene Immunsystem über das „Toll-like Receptor“ (TLRs)- 2/6 Heterodimer. Diese Aktivierung resultiert in einer Reihe von Symptomen einer APR, wie der Produktion proinflammatorischer Zytokine, Prostaglandine und NO, oder führt zu Fieber und „sickness behavior“. Im Mittelpunkt dieser Studie stand das Fibroblasten-stimulierende Lipopeptid-1 (FSL-1), das die N-terminale Sequenz eines 44 kDa schweren Lipoproteins aus *Mycoplasma salivarium* darstellt. Zentrales Ziel dieser Arbeit war es, die pyrogenen Eigenschaften von FSL-1 anhand verschiedener Parameter *in vivo* zu charakterisieren.

Intraarterielle (i.a.) und intraperitoneale (i.p.) Injektionen von FSL-1 führten bei Meerschweinchen zu einem dosisabhängigen Fieber, das von erhöhten zirkulierenden Spiegeln der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 begleitet war, wobei die i.p. Stimulationen im Vergleich zu den i.a. Injektionen effektiver waren.

Mit Hilfe eines neutralisierenden löslichen TNF-Rezeptors (TNFbp) konnte gezeigt werden, dass TNF eine entscheidende Rolle bei dem durch FSL-1 induzierten Fieber spielt, da dieses durch die Behandlung mit TNFbp (i.a. und i.p.) fast vollständig unterdrückt werden konnte. TNF wurde hierbei vollständig neutralisiert, IL-6 in seiner Bildung deutlich abgeschwächt.

Mittels eines unselektiven Zyklooxygenase (COX) Inhibitors (Diclofenac) und der Messung von zirkulierendem PGE<sub>2</sub> konnte dann gezeigt werden, dass die Hemmung der Bildung von PGE<sub>2</sub> ebenfalls bei beiden Applikationsformen einen entscheidenden Einfluss auf die Fieberentstehung durch FSL-1 hatte. Durch diese Maßnahme wurde das Fieber völlig unterdrückt, ohne dass die Bildung von TNF und IL-6 beeinträchtigt wurde. Die zirkulierenden Konzentrationen an PGE<sub>2</sub> entsprachen bei Gabe von Diclofenac zusammen mit FSL-1 nur einem basalen Niveau, während es bei der Injektion von FSL-1 alleine zu einem deutlichen Anstieg kam.

Um zu überprüfen, welche Gehirnregionen nach Gabe von FSL-1 aktiviert wurden, erfolgte mittels Immunhistochemie ein Nachweis von nukleären Signalen des Transkriptionsfaktors STAT3 im ZNS. STAT3 wird in diesem Zusammenhang als Indikator einer durch FSL-1

induzierten und durch IL-6 vermittelten Aktivierung von Gehirnzellen angesehen. Es konnten 120 Minuten nach Injektion von FSL-1 i.a. in Endothelzellen des gesamten Gehirns und in Strukturen mit teilweise offener Blut-Hirn Schranke (den CVOs: AP, OVLT, SFO) positive STAT3-Signale in Zellkernen nachgewiesen werden. In den CVOs traten nukleäre STAT3 Signale nicht nur in Endothelzellen sondern auch in Astrozyten auf.

Schließlich wurde untersucht, ob wiederholte Konfrontation mit FSL-1 in kurzen Abständen zu Toleranzerscheinungen führte. Hierbei ergab sich, dass es durch wiederholte Applikationen von FSL-1 keine (i.a.) bzw. nur eine transiente (i.p.) Toleranzentwicklung hinsichtlich des Fiebers kam. Jedoch die Bildung der Zytokine TNF und IL-6 wurde bei wiederholter Stimulation mit FSL-1 mehr oder weniger stark abgeschwächt. Eine Kreuztoleranz zwischen FSL-1 und LPS unterblieb bei den intraarteriellen Applikationen, während sie sich bei den intraperitonealen Stimulationen manifestierte. Dies betraf sowohl die Reaktivität gegenüber FSL-1 nach wiederholter Vorbehandlung mit LPS als auch die Antwort auf LPS-Gabe nach wiederholter Vorstimulation mit FSL-1. Im Rahmen der Toleranzversuche wurden auch die anorektischen Eigenschaften von FSL-1 betrachtet. Während es bei LPS-Injektionen erwartungsgemäß zu einer Anorexie kam, die mit jeder weiteren Injektion schwächer wurde, waren die Ergebnisse bei wiederholten Injektionen von FSL-1 heterogener. So wird auch durch FSL-1 ein anorektischer Effekt vermittelt, der jedoch bei wiederholter Injektion dieses exogenen Pyrogens zumindest teilweise wieder aufgehoben wurde.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde die Pyrogenizität von FSL-1, einem mycoplasmaler Lipopeptid, eindeutig nachgewiesen, die zugrunde liegenden Mechanismen wurden weitgehend aufgeklärt. Es zeigte sich, dass FSL-1 aus *M. salivarium* zum Teil über ähnliche Mechanismen Fieber induziert wie das „klassische“ exogene Pyrogen LPS gramnegativer Bakterien, allerdings weit weniger potent ist.



## 6 SUMMARY

*Mycoplasmas* form a large group of procaryotic microorganisms that can be distinguished from ordinary bacteria by their small size and their total lack of a cell wall. Diacylated lipopeptides from *Mycoplasmas* act as so called “pathogen associated molecular patterns” (PAMPs) and stimulate the innate immune system via activation of the “Toll-like receptor” (TLRs) 2/6 heterodimer. This kind of activation results in a number of symptoms of the acute-phase response, such as the formation of proinflammatory cytokines, prostaglandins, and NO, or in the manifestation of fever and sickness behavior. In this study, we investigated the properties of fibroblast-stimulating lipopeptide-1 (FSL-1), which represents the NH<sub>2</sub>-terminal sequence of a lipoprotein from *Mycoplasma salivarium*. Central goal was to characterize the pyrogenic properties of FSL-1 in an established *in vivo* model.

Intra-arterial (i.a.) and intraperitoneal (i.p.) injections of FSL-1 caused dose-dependent fevers in guinea pigs, which coincided with elevated plasma levels of TNF and IL-6, the i.p. route of administration being more effective than the i.a. route.

I.a. or i.p. injection of a soluble form of the TNF type 1 receptor (referred to as TNF binding protein, TNFbp) together with FSL-1 completely neutralized FSL-1-induced circulating TNF, and reduced fever and circulating IL-6. I.a. or i.p. injection of the non-selective cyclooxygenase (COX)-inhibitor diclofenac depressed fever and FSL-1-induced elevations of circulating prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Circulating TNF and IL-6, however, remained unimpaired by the treatment with diclofenac. Thus, FSL-1-induced fever in guinea pigs is to a high degree mediated by pyrogenic cytokines and cyclooxygenase products.

Immunohistochemical detection of nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the brain revealed a direct activation of brain cells in response to treatment with FSL-1 (120 min after its systemic administration). The FSL-1-induced and IL-6-mediated genomic activation of brain cells mainly occurred in two target structures: the endothelium of vessels within the entire brain, and endothelial cells and astrocytes in structures with an open blood-brain barrier, e.g., the sensory circumventricular organs such as the area postrema, the vascular organ of the lamina terminalis, and the subfornical organ.

Finally, it was investigated if repeated confrontation with FSL-1 in short-term intervals resulted in the development of tolerance to its own effects. With regard to fever, there was a lack of tolerance to repeated i.a. injections, but a transient partial tolerance to repeated i.p.

administrations of FSL-1. Endogenous formation of TNF and IL-6 was attenuated in response to repeated stimulation with FSL-1. Cross-tolerance between FSL-1 and LPS was absent in response to i.a. injections. However, repeated i.p. pretreatments with FSL-1 resulted in attenuated LPS-induced effects and *vice versa* (with regard to fever and cytokine formation). Data on the development of the animals' body weight indicated that FSL-1 causes anorexia, which is, however, much less pronounced when compared to the anorectic effects of LPS. The results of this thesis clearly document pyrogenic properties of FSL-1 in guinea pigs. In part, the mechanisms responsible for the manifestation of FSL-1-induced fever are similar to those employed by bacterial LPS, the "classic" exogenous pyrogen. The pyrogenic capacity of FSL-1 is, however, less pronounced when compared to LPS.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AC	Anterior Commissure
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
AP	Area postrema
AP-1	Activator Protein-1
APP	Akut Phase Proteine
APR	Akut Phase Reaktion
APRF	Acut Phase Response Factor
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BHS	Blut-Hirn Schranke
CD	Cluster of differentiation
cIAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein
CMB	Cytokine Binding Molecule
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Zyklooxygenase
CRF	Corticotropin Releasing Factor
CSF	Colony stimulating Factor
CVO	Zirkumventrikuläre Organe
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylindol
DD	Death Domain (Todesdomäne)
DIF	Dorsal related Immunity Factor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal related Kinase
FADD	Fas associated Death Domain
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FI	Fieberindex
FNIII	Fibronektin Typ III
FOS	FOS-Protein, Proto-Onkogen, Transkriptionsfaktor
FSL-1	Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid-1
Gas	Gamma activating Site
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Gp130	Glycoprotein 130
HCl	Salzsäure
HDL	High density Lipoprotein
HEK	Human embryonic kidney Zelllinie
HGF	Human Gingival Fibroblasts
His	Histidin
HL	Human acute myeloid leukemia cells
HPA	Hypophysen-Hypothalamus Achse
i.a.	intra-arteriell
IA <sup>b</sup>	MHC-Klasse-II-Molekül
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
i.c.v.	intra-cerebrovenikulär
IFN	Interferon
IKK	I-κB Kinase Komplex
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin

## -Abkürzungsverzeichnis-

---

IL-6R	IL-6 Rezeptor
IL-6RE	IL-6 Responsives Element
Imd	Immune deficiency gene
i.p.	intra-peritoneal
IRAK	IL-1 Receptor associated Kinase
IRF-3	Interferon regulatory Factor
IUPS	Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences
JAK	Janus Kinase
JH	Janus Homologie
JNK	cJun NH <sub>2</sub> terminal Kinase
kDa	kilo Dalton
KGW	Körpergewicht
LAF	Lymphozyten aktivierender Faktor
LAMP	Lipid associated Membrane Proteins
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate
LBP	LPS Bindungsprotein
LIF	Leukemia inhibitory Factor
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich Repeats
LT- $\alpha/\beta$	Lymphotoxin- $\alpha/\beta$
LTbR	Lymphotoxin-beta Rezeptor
Lys	Lysin
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid-2
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MCP	Monocytes chemoattractant Protein
MDHM	Mycoplasma-derived high molecular weight material
MDP	Muramyl-dipeptid
ME	Eminentia mediana
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1	Makrophagen inflammatorisches Protein
MOAT	Multispezifischer Anionen Transporter
MTT	Methylthiazoltetrazolium
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
n.d.	nicht detektierbar
NES	Nuclear Export Signals
NeuN	Neuronal Nuclei
NF-IL6	Nuclear Factor IL-6
ng	Nanogramm
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NHS	Normal Horse Serum
NIK	NF- $\kappa$ B inducing Kinase
NL	Neurohypophyse
NLS	Nuclear Localisation Signals
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NOS	NO-Synthase
NSAID	Nonsteroidal antiinflammatory Drugs (nicht-steriodale Antiphlogisika)
NTS	Nucleus Tractus Solitarius
OVLTL	Organum vasculosum laminae terminalis
PAF	Platelet activating Factor
PAMP	Pathogen associated molecular Pattern
PBS	Phosphate buffered Saline
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PG(E)S	Prostaglandin (E)-Synthase

## -Abkürzungsverzeichnis-

---

PGT	Prostaglandin-Transporter
Phe	Phenylalanin
PIAS	Protein Inhibitors of activated STATs
PIN	Glandula Pinealis (Epiphyse)
PI:PC	Polyinosinic : Polycytidylic Acid
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
Pro	Prolin
pNPP	pNitrophenylphosphat
POA	Präoptische Region
PRR	Pattern Recognition Receptors
PVN	Paraventriculärer Nucleus
RES	Retikuloendotheliales System
RIP	Receptor interacting Protein
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAPK/JNK	Stress-activated Protein Kinase/JNK
s.c	subkutan
SCO	Organum Subcommissurale
Ser	Serin
SFO	Subfornicalorgan (Organum subfornicale)
SH2	Scr Homologie Domäne
SHP <sub>2</sub>	Protein-Tyrosin-Phosphatase
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
SODD	Silencer of Death Domain
ST2	Mitglied der TIR Familie,
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TACE	TNF- $\alpha$ converting Enzyme
TAK	Transforming Growth Factor- $\beta$ activating Kinase
TBK-1	TRAF Family Member associated NF- $\kappa$ B activator binding Kinase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
THP	Human acute monocytic leukemia Zelllinie
TICAM-1/2	TIR Domain containing Adaptor Molecule
TIR	Toll/IL-1R Homologie Domäne
TIRAP/MAL	TIR Domain containing adaptor Protein/ MyD88 adaptor-like
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFbp	TNF-Bindungsprotein
TNFR	TNF-Receptor
TRADD	TNF-Receptor associated Death Domain
TRAF	TNF-Receptor associated Factor
TRAIL	TNF-related Apoptosis inducing Ligand
TRAM	TRIF-related adaptor Molecule
TRIF	TIR Domain containing adaptor inducing Interferon- $\beta$
TWEAK	TNF-related, weak Ability to induce Apoptosis
TYK	Tyrosin Kinase
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial Growth Factor
vW	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8 Literaturverzeichnis

**Aarden L.A., DeGroot E.R., Schaap O.L., Landsdorp P.M.** (1987) Production of hybridoma growth factors by human monocytes. *Eur J Immunol* 17: 1411-1416

**Abul H.T., Davidson J., Milton A.S., Rotondo D.** (1997) Prostaglandin E2 enters the brain following stimulation of the acute phase immune response. *Ann N Y Acad Sci* 813: 287-295

**Aderem A. & Ulevitch R.J.** (2000) Toll-like receptors in the induction of innate immune response. *Nature* 406: 782-787

**Akira S.** (1997) IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1401-1418

**Alexander W.S., Starr R., Metcalf D., Nicholson S.E., Farley A., Elefanty A.G., Brysha m., Kile b.T., Richardson R., Baca M., Zhang J.-G., Willson T.A., Viney E.M., Sprigg N.S., Rakar S., Corbin J., Mifsud S., DiRago L., Cary D., Nicola N.A., Hilton D.J.** (1999) Suppressors of cytokine signaling (SOCS). Negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 66: 588-592

**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

**Aliprantis A.O., Yang R.B., Mark M.R., Suggett S., Deveaux 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

**Atkins E.** (1960) Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* 40:580-646

**Baker S.J. & Reddy E.P.** (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270

**Banner D., D'Arcy A., Janes W. Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H, Lesslauer W.** (1993) Crystal structure of the soluble human 55 Kd TNF receptor-human TNF complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73: 431-455

**Banks W.A., Kastin A.J., Broadwell R.D.** (1995) Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 2: 241-248

**Bazan J.F.** (1990) Haematopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11: 350-354

**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 substance obtained from polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 27: 524-548

**Bennett I.L. & Beson P.B.** (1953) Studies on the pathogenesis of fever II. Characterisation of fever-producing substances from polymononuclear leukocytes and from the fluid of sterile exsudates. *J Exp Med* 98: 493-508

**Beutler B. & Cerami A.** (1986) Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol Res* 5: 281-293

**Beutler B., Milsark I.W., Cerami A.C.** (1985) Passive immunisation against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229(4716): 869-871

**Beutler B. & Rietschel E.T.** (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Rev* (3): 169-176

- Blatteis C.M.** (2006) Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacology & Therapeutics* 111: 194-223
- Blatteis C.M., Bealer S.L., Hunter W.S., Llanos-Q J., Ahokas R.A., Mashburn Jr. T.A.** (1983) Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull* 11: 519-526
- Blatteis C.M. & Sehic E.** (1997) Fever: how many circulating pyrogens signal the brain? *News Physiol Sci* 12, 1-9
- Blatteis C.M., Quan N., Xin L., Ungar E.** (1990) Neuromodulation of acute phase responses to interleukin-6 in guinea pigs. *Brain Res Bull* 25: 895-901
- Bluthé R.M., Michaud B., Poli V., Dantzer R.** (2000) Role of IL-6 in cytokine induced sickness behavior: A study with IL-6 deficient mice. *Physiol Behav* 70: 367-373
- Borsutzky S.** (2004) Funktionelle Charakterisierung des Lipopeptids MALP-2 aus *Mycoplasma fermentans* als neues mukosales Adjuvans. *Dissertation*, Universität Braunschweig
- Boulant J.A.** (1991) 1. Thermoregulation. In: *Fever: Basic Mechanism and Management*, ed P. Mackowiak, pp.1-22, Raven Press Ltd., New York
- Bowman C.C., Rasley A., Tranguch S.L., Marriot I.** (2003) Cultured astrocytes express Toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43: 281-291
- Bradbury M.W.** (1984) The structure and function of the blood-brain barrier *Fed Proc* 43(2): 186-190
- Braun V.** (1975) Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 415: 335-337
- Breyer R.M., Bagdassarian C.K., Myers S.A., Breyer M.D.** (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 661-690
- Brint E.K., Xu D., Liu H.** (2004) ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance *Nat Immunol* 5(4): 373-379
- Brück K. & Zeisberger E.** (1990) Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis. In: Schönbaum E. & Lomax P. (eds) *Thermoregulation: Physiology and Biochemistry*. Pergamon, NY, 255-307
- Buwitt-Beckmann U., Heine H., Wiesmüller K.-H., Jung G., Brock R., Akira S., Ulmer A.J.** (2005) Toll-like receptor-6 independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol* 35: 282-289
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B.** (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors *Proc Natl Acad Sci USA* 72(9): 3666-3670
- 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(3): 653-661
- Chaby R. & Girard R.** (1993) Interaction of lipopolysaccharide with cells of immunological interest. *European Cytokine Network* 4: 399-414
- Chai Z., Gatti S., Toniatti C., Poli V., Bartfai T.** (1996) Interleukin (IL)-6 expression in the central nervous system is necessary for fever in response to lipopolysaccharide or IL-1 $\beta$ : a study on IL-6 deficient mice. *J Exp Med* 183: 311-316
- Chan F.K., Chun H.J., Zheng L., Siegel R.M., Bui K.L., Leonardo M.J.** (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288(5475): 2351-2354
- Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos L.T., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L.** (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21): 13371-13373

- Chemo A., Fraifeld V., Adramovich L., Sod-Moriah U.A., Kaplanski J.** (1997) Tolerance to lipopolysaccharide is not related to the ability of the hypothalamus to produce prostaglandin E2. *Life Sci* 61: 813-818
- Chung C.D., Liao J., Liu B., Rao X., Jay P., Berta P., Shuai K.** (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278: 1803-1805
- Conti B., Tabarean I., Andrei C., Bartfai T.** (2004) Cytokines and fever. *Front Biosci* 9: 1433-1449
- Coons A.H.** (1958) Fluorescent antibody methods. In: *General Cytochemical methods*, ed. J.F. Danielli, pp. 399-422, Acad Press, New York
- Coope H.J., Atkinson P.G., Huhse B., Belich M., Janzen J., Holman m.J., Klaus G.G., Johnston L.H., Ley S.C.** (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* 21(20): 5375-5385
- Cooper K.E., Blasher 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 fever produced by Poly I: Poly C. *Plügers Arch* 412: 292-296
- Dantzer R.** (2001) Cytokine-induced sickness behaviour: Where do we stand? *Brain, Beh and Immun* 15: 7-24
- Dantzer R., Bluthé R.-M., Castanon N., Chauvet N., Capuron L., Goodall G., Kelly K.W., Konsman J.-P., Layé S., Parnet P., Pousset F.** (2001) Cytokine effects on behaviour. *Psychoneuroimmunology* 3(1): 703-727
- Darnay B.G. & Aggarwal B.B.** (1999) Signal transduction by tumor necrosis factor and tumor necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann Rheum Dis* 58: 2-13
- Darnell J.E. Jr., Kerr I.M., Stark G.R.** (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164): 1415-1421
- Davidson J., Abul H.T., Milton A.S., Rotondo D.** (2001) Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 442: 526-533
- Decoster E., Vanhaesebroeck B., Vandenabeele P., Grooten J., Fiers W.** (1995) Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor *J Biol Chem* 270: 18473-18478
- Dehouck M.P., Jolliet-Riant P., Bree F., Fruchart J.C., Cecchelli R., Tillement J.P.** (1992) Drug transfer cross the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* 58: 1790-1797
- Deiters U.** (1999) In vivo Effekte des Makrophagen stimulierenden Lipopeptids MALP-2 aus Mycoplasma fermentans: Induktion von Leukozyteninfiltration und Endotoxintoleranz. *Dissertation*, Universität Braunschweig
- Deiters U., Barsig J., Tawil B., Mühlradt P.F.** (2004) The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Experimental Dermatology* 13: 731-739
- Deiters U., Gumenscheimer M., Galanos C., Mühlradt 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, 4456-62
- Deiters U. & Mühlradt P. F.** (1999) Mycoplasmal lipopeptide MALP-2 induces the chemoattractant proteins macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1alpha), monocyte chemoattractant protein 1, and MIP-2 and promotes leukocyte infiltration in mice. *Infect Immun* 67, 3390-3398
- Devin A., Lin Y., Yamaoka S., Li Z., Karin M., Liu Z.G.** (2001) The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol* 21(12): 3986-3994



- DiBenedetto F.E. & Bito L.Z.** (1986) Transport of prostaglandins and other eicosanoids by the choroid plexus: its characterisation and physiological significance. *J Neurochem* 46: 1725-1731
- Dinarello C.A.** (1999) Cytokines as endogenous pyrogens. *J Inf Dis* 179(2): 294-304
- Dinarello C.A., Cannon J.G., Wolff S.M., Bernheim H.A., Beutler B., Cerami A., Figari I.S., Palladino M.A., O'Connor J.V.** (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med* 163: 1433-1450
- Dong L., Shibata K.-I., Sawa Y., Hasebe A., Yamaoka Y., Yoshida S., Watanabe T.** (1999) Transcriptional activation of mRNA of intercellular adhesion molecule 1 and induction of its cell surface expression in normal human gingival fibroblasts by *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* 67: 3061-6544
- Eisenmann J.S.** (1972) Unit activity studies of thermosensitive neurons. In: *Essays on Temperature Regulation*, eds. J Bligh & R.E. Moore, pp. 55-69, North Holland Publishing Company, Amsterdam
- Ek M., Arias C., Sawchenko P., Ericsson-Dahlstrand A.** (2000) Distribution of the EP3 prostaglandin E (2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. *J Comp Neurol* 428: 5-20
- Ek M., Kurosawa M., Lundeberg T., Ericsson A.** (1998) Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 $\beta$ : role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* 18: 9471-9479
- Elmqvist J.K., Scammel T.E., Jacobson C.D., Saper C.B.** (1996) Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J Comp Neurol* 371(1): 85-103
- Engblom D., Ek M., Saha S., Ericsson-Dahlstrand A., Jakobsson P.-J., Blomqvist A.** (2002) Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. *J Mol Med* 80: 5-15
- Espat N.J., Cendan J.C., Beierle E.A., Auffenberg T.A., Rosenberg J., Russell D., Kenney J.S., Fischer E., Montegut W., Lowry S.F., Copland E.M., Moldawer L.L.** (1995) PEG-BP30 monotherapy attenuates the cytokine-mediated inflammatory cascade in baboon *Escherichia coli* septic shock. *J Surg Res* 59: 153-158
- 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* 150: 5033-5040
- Feterowski C., Novotny A., Kaiser-Moore S., Mühlradt P.F., Roßmann-Bloek T., Rump M., Holzmann B., Weighardt H.** (2005) Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. *Int Immunol* 17(8): 1035-1046
- Fiedler V.B., Loof I., Sander E., Voehringer V., Galanos C., Fournel M.A.** (1992) Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha prevents lethal endotoxin sepsis in adult rhesus monkeys. *J Lab Clin Med* 120: 574-588
- Finck B.N., Kelley K.W., Dantzer R., Johnson R.W.** (1998) In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the induction of leptin by lipopolysaccharide. *Endocrinology* 139: 2278-2283
- Fitzgerald K.A., Rowe D.C., Barnes B.J., Caffrey D.R., Visinin 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(7): 1043-1055
- Fitzgerald K.-A., Rowe D.C., Golenbock D.T.** (2004) Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2 complex. *Microbes Infect* 6: 1361-1367
- Flo T.H., Halaas O., Torp S., Ryan L., Lien E., Dybdahl B., Sundan A., Espevik T.** (2001) Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* 69: 474-481
- Frankenberger M., Pechumer H., Ziegler-Heitbrock H.W.** (1995) Interleukin-10 is upregulated in LPS-tolerance. *J Inflamm* 45(1): 56-63

- Freudenberg M.A. & Galanos C.** (1988) Induction of tolerance to Lipopolysaccharide (LPS)-D galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* 56: 1352-1357
- Frisch M.** (1996) Mycoplasma –Lipopeptid-abhängige Modulation der MHC Klasse II-Expression und Signaltransduktion bei Makrophagen. *Dissertation*, Universität Hannover
- Fujita M., Into T., Yasuda M., Okusawa T., Hmahira S., Kuroki Y., Eto A., Nisizawa T., Morita M., Shibata K.** (2003) Involvement of leucine residues at positions 107, 112, and 115 in a leucine-rich repeat motif of human Toll-like receptor 2 in the recognition of diacylated lipoproteins and lipopeptides and *Staphylococcus aureus* peptidoglycans. *J Immunol* 171(7): 3675-3683
- Galanos C., Gumenscheimer M., Mühlradt P., Jirillo E., Freudenberg M** (2000) MALP-2, a Mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? *J Endotox Res* 6: 471-476
- Garcia J., Lemercier B., Roman-Roman S., Rawadi G.** (1998) A Mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF- $\kappa$ B activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein-kinase pathways. *J Biol Chem* 273: 34391-34398
- Gautron L., Lafon P., Chaigniau M., Tramu G., Layé S.** (2002) Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in the brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience* 112: 717-729
- Gaykema R.P.A., Dijkstra I., Tilders F.J.H.** (1995) Supradiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* 136: 4717-4720
- Goldbach J.M., Roth J., Störr B., Zeisberger E.** (1996a) Lack of tolerance development to tumor necrosis factor alpha inside the central nervous system. *Experientia* 52(8): 774-777
- Goldbach J.M., Roth J., Störr B., Zeisberger E.** (1996b) Repeated infusions of TNF- $\alpha$  cause attenuation of the thermal response and influence LPS fever in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 270: R749-R754
- 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-R681
- Golenbock D.T., Bach R.R., Liechenstein H., Juan T.S., Tadavarthy A., Moldow C.F.** (1995) Soluble CD14 promotes LPS activation of CD14-deficient PNH monocytes and endothelial cells. *J Lab Clin Med* 125(5): 662-671
- Goeddel D.V.** (1999) Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor. *Chest* 116: 69S-73S
- Ghosh S. & Karin M.** (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl: S81-96
- Greisman S.E., Edward M.D., Young J., Woodward W.E.** (1966) Mechanism of endotoxin tolerance IV: specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *J Exp Med* 124: 983-1000
- Grell M., Zimmermann G., Gottfried E., Chen C.M., Grunwald U., Huang D.C., Wu Lee Y.H., Durkop H., Engelmann h., Scheurich P., Wajant H., Strasser A.** (1999) Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role of TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J* 18(11): 3034-3043
- Gruss H.-J. & Dower S.K.** (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphomas *Blood* 85: 3378-3404
- Hammel H.T., Jackson D.T., Stolwijk J.A.J., Hardy J.D., Strømme S.B.** (1963) Temperature regulation by hypothalamic proportional control with an adjustable set point. *J Appl Physiol* 18: 1146-1154

- Harré E.M., Roth J., Gerstberger R., Hübschle T.** (2003) Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* 980: 151-155
- Harré E.M., Roth J., Pehl U., Kueth M., Gerstberger R., Hübschle T.** (2002) Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in the sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol* 92:2657-2666
- Hart B.L.** (1988) Biological basis of the behaviour 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
- Haziot A., Ferrero E., Köntgen F., Hijiya N., Yamamoto S., Silver J., Stewart C.L., Goyert S.M.** (1996) resistance to endotoxic shock and reduced dissemination of Gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4: 407-414
- Heine H. & Lien E.** (2003) Toll-Like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 130: 180-192
- Heinrich P.C., Behrmann I., Hermanns H.M., Müller-Newen G., Schaper F.** (2003) Principles of interleukin-(IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1-20
- Hirano T., Taga T., Nakano N., Yasukawa K., Kashiwamura S., Shimizu K., Nakajima K., Pyun K.H., Kishimoto T.** (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5490-5494
- Hoebe K., Georgel P., Rutschmann S., Du X., Mudd S., Crozat K., Sovath S., Shamel L., Hartung T., Zähringer U., Beutler B.** (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433(7025): 523-527
- Hofer H.** (1958) Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Zool Anz (Suppl)* 22: 203-251
- Hoffmann A., Levchenko A., Scott M.L., Baltimore D.** (2002) The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signalling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298(5596): 1241-1245
- Hoffmann J.A.** (2003) The innate immune response in *Drosophila*. *Nature* 426: 33
- Horn K.D.** (1998) Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Q J Med* 91: 265-277
- Horng T., Barton G.M., Medzhitov R.** (2001) TIRAP: An adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2: 835-841
- Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S.** (1999) Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* 162: 3749-3752
- Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., Goeddel D.V.** (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways *Cell* 84(2): 299-308
- Hsu 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
- Hübschle T., Harré E.-M., Meyerhof W., Pehl U., Roth J., Gerstberger R.** (2001) The central pyrogenic action of interleukin-6 is related to nuclear translocation in the anteroventral preoptic area of the rat brain. *J Therm Biol* 26: 299-305

- Hübschle T., Mütze J., Mühlrad P.F., Korte S., Gerstberger R., Roth J.** (2006) Pyrexia, anorexia, adipisia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R170-178
- Ibelgaufts H.** (1995) *Dictionary of cytokines*. VCH Verlag, Weinheim
- Ihle J.N.** (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84: 331-334
- Inoue W., Matsumura K., Yamagata K., Takemiya T., Shiraki T., Kobayashi S.** (2002) Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E2 synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci Res* 44: 51-61
- Into T., Kiura K., Yasuda M., Kataoka H., Inoue N., Hasebe A., Takeda K., Akira S., Shibata K.** (2004) Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- $\kappa$ B activation. *Cell Microbiol* 6(2): 187-199
- Ivanov A.I. & Romanovsky A.A.** (2004) Prostaglandine E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosc* 9: 1977-1993
- Jacobs M.D. & Harrison S.C.** (1998) Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 95(6): 749-758
- Jansson E., Backman A., Hakkarainen K., Miettinen A., Seniusova B** (1993) Mycoplasmas and arthritis. *Z Rheumatol* 42(6): 315-319
- Janeway C.A. & Medzithov** (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216
- Johnson A.K. & Gross P.M.** (1993) Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J* 7: 678-686
- Kaufmann A., Mühlrad P.F., Gemsa D., Sprenger H.** (1999) Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by *Mycoplasma fermentans* derived lipopeptide MALP-2. *Infect Immun* 67: 6303-6308
- Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Atkins S.** (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11(1): 115-122
- Kawai T. & Akira S.** (2005) Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 7: 12-19
- Kawasaki H., Moriyama M., Ohtani Y., Naitoh M., Tanaka A., Nariuchi H.** (1989) Analysis of endotoxin fever in rabbits by using a monoclonal antibody to tumor necrosis factor (cachectin). *Inf Immun* 57(10): 3131-3135
- Kelliher M.A., Grimm S., Ishida Y., Kuo F., Stranger B.Z., Leder P.** (1998) The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- $\kappa$ B signal. *Immunity* 8: 297-303
- Kielian T.** (2006) Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83: 711-730
- Kirschning C.J., Wesche H., Merrill A.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
- Kiura K., Kataoka H., Nakata T., Into T., Yasuda M., Akira S., Inoue N., Shibata K.** (2005) The synthetic analogue of mycoplasmal lipoprotein FSL-1 induces dendritic cell maturation through Toll-like receptor 2 *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 46: 78-84
- Kluger M.J.** (1991) Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* 71: 93-127

- Kluger M.J., Ringler D.H., Anver M.R.** (1975) Fever and survival. *Science* 188(4184): 166-168
- Kluger M.J. & Vaughn L.K.** (1978) Fever and survival in rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *J Physiol* 282: 243-251
- Konsman J.P., Luheshi G.N., Bluthé R.-M., Dantzer R.** (2000) The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci* 12: 4434-4446
- Kostyal D.A., Butler G.H., Beezhold D.H.** (1994) A 48-kilodalton *Mycoplasma fermentans* membrane protein induces cytokine secretion by human monocytes *Infect Immun* 62(9): 3793-3800
- Kozak W., Conn C.A., Klir J.J., Wong G.H.C., Kluger M.J.** (1995) TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 269: R23-R29
- Kozak W., Wrotek S., Kozak A.** (2006) Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor- $\kappa$ B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R871-R880
- Krippner-Heidenreich A., Tübing F., Bryde S., Willi S., Zimmermann G., Scheurich P.** (2002) Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J Biol Chem* 277(46): 415-441
- Lacroix S., Feinstein D., Rivest S.** (1998) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* 8: 625-640
- Lacroix S. & Rivest S.** (1998) Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J Neurochem* 70: 452-466
- Laflamme N., Echchannaoui H., Landmann R., Rivest S.** (2003) Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol* 33: 1127-1138
- Laflamme N., Lacroix S., Rivest S.** (1999) An essential role of interleukin-1 $\beta$  in mediating NF- $\kappa$ B activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain-barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J Neurosci* 19(24): 10923-10930
- Laflamme N. & Rivest S.** (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 15: 155-163
- 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
- Latz E., Visintin A., Lien E., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Kurt-Jnes E.A., Golenbock D.T., Espevik T.** (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 277(49): 47834-47843
- Lee S.Y., Reichlin A., Santana A., Sokol K.A., Nussenzweig M.C., Choi Y.** (1997) TRAF2 is essential for JNK but not for NF- $\kappa$ B activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7: 703-713
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.-M., Hoffmann J.A.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/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 Regul Integr Comp Physiol* 258: 798-803

- Leon L.R., Kozak W., Peschon J., Kluger M.J.** (1997) Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor knock out mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R332-R337
- 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<sup>-/-</sup>, but not in cyclooxygenase-1<sup>-/-</sup> 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: R332-R337
- Lieberman A.P., Pitha P.M., Shin H.S., Shin M.L.** (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6348-6352
- Liebermeister C.** (1875) Theorie des Fiebers. In: *Handbuch der Pathologie und der Therapie des Fiebers*, ed F.c.W. Vogel, pp. 277-384, Leipzig
- Lien E., Means T.K., Heine H., Yoshimura A., Kusumoto S., Fukase K., Fenton M.J., Oikawa M., Quereshi N., Monks B., Finberg R.W., Ingalls R.R., Golenbock D.T.** (2000) Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 105(4): 497-504
- Liu Z., Hsu H., Goeddel D.V., Karin M.** (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- $\kappa$ B activation prevents cell death. *Cell* 87: 565-576
- Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J.** (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104(4): 487-501
- Lührmann A., Deiters U., Skokowa J., Hanke M., Gessner J.E., Mühlradt P.F., Pabst R., Tschernig T.** (2002) In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of *Mycoplasma fermentans* after pulmonary application *Infect Immun* 70(7): 3785-3792
- Lust J.A., Donovan K.A., Kline M.P., Greipp P.R., Kyle R.A., Maihle N.J.** (1992) Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 4: 96-100
- Mackiewicz A., Schooltink H., Heinrich P.C., Rose-John S.** (1992) Complex of soluble human IL-6 receptor/IL-6 upregulates expression of acute phase proteins. *J Immunol* 149: 2021-2027
- März P., Otten U., Rose-John S.** (1999) Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur J Neurosci* 11: 2995-3004
- Maeger A. & Gaines-Das R.E.** (1994) International collaborative study of the candidate international standards for human tumor necrosis factor alpha (hTNF $\alpha$ ) and beta (hTNF $\beta$ ) and for murine tumor necrosis factor alpha (mTNF $\alpha$ ). *J Immunol Meth* 179: 1-13
- Mancini J.A., Blood K., Guay J., Gordon R., Claveau D., Chan C.C., Riendeau D.** (2001) Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 276: 4469-4475
- Mathison J.C., Wolfson E., Steinemann S., Tobias P., Ulevitch R.** (1993) Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages: Participation of LPS binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages. *J.Clin. Invest.* 92: 2053-2059
- Matsumura K. & Kobayashi S.** (2004) Signaling the brain in systemic inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci* 9:2819-2826
- McKinley M.J., McAllen R.M., Mendelsohn F.A.O., Allen A.M., Chai S.Y., Oldfield B.J.** (1990) Circumventricular organs: Neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Front Neuroendocrinology* 11(2): 91-127

- Medvedev A.E., Henneke P., Schromm A. et al.** (2001) Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 and 4. *J Immunol* 167: 257-267
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway Jr. C.A.** (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 J.A.** (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2: 253-258
- Mengozzi M. & Ghezzi P.** (1993) Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. *Eur Cytokine Netw* 4: 89-98
- Micheau O. & Tschopp J.** (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114(2): 181-190
- Miles R.J., Tylor R.R., Varsani H.** (1991) Oxygen uptake and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by fermentative Mycoplasma spp. *J Med Microbiol* 34(4): 219-223
- Miller S.I., Ernst R.K., Bader M.W.** (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews* 3: 36-46
- Milton A.S.** (1998) Prostaglandins and fever. *Prog Brain Res* 113: 129-139
- Morr M., Takeuchi O., Akira S., Simon M.M., Mührladt P.F.** (2002) Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 32: 3337-3347
- Moss M.L., Jin S.-L.C., Becherer J.D., Bickett D.M., Burkhart W., Chen W.-J., Hassler D., Leesnitzer M.T., McGeehan G., Milla M., Moyer M., Rocque W., Seaton T., Schoenen F., Warner J., Willard D.** (1997) Structural features and biochemical properties of TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) *J Neuroimmun* 72: 127-129
- Mührladt 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 *Inf Immun* 62(9): 3801-3807
- Mührladt P.F., Kieß M., Meyer H., Süßmuth R., Jung G.** (1997) Isolation, structure Elucidation, and Sythesis of a Macrophage Stimulatory Lipopeptide from Mycoplasma fermentans Acting at Picomolar Concentration *J Exp Med.* 185(11): 1951-1958
- Mührladt P.F., Meyer H., Jansen R.** (1996) Identification of S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein in a macrophage-activating lipopeptide from Mycoplasma fermentans. *Biochem* 35(24): 7781-7786
- Mührladt P.F. & Schade U.** (1991) MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro Interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production in rabbits *Infect Immun* 59(11): 3969-3974
- 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
- Murakami M & Kudo I.** (2002) Phospholipase A2. *J Biochem* 131: 285-292
- Nadeau S & Rivest S.** (1999) Effects of circulating tumor necrosis factor (TNF) on the neuronal activity and expression of the genes encoding the TNF receptor (p55 and p75) in the rat brain: A view from the blood brain barrier. *Neuroscience* 93: 1449-1464
- Nadeau S. & Rivest S.** (2000) Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and NF- $\kappa$ B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* 169: 3370-3381

- Naismith J.H., Brandhuber B.J., Devine T.Q., Sprang S.R.** (1996) Seing double: crystal structures of the type I TNF receptor. *J Mol Recognit* 9(2): 113-117
- Nakagawa R., Naka T., Tsutsui H., Fujimoto M., Kimura A., Abe T., Seki E., Sato S, Takeuchi O., Takeda K., Akira S., Yamanishi K., Kawase I., Nakanishi K., Kishimoto T.** (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 17: 677-687
- Nakamura J., Shibata K., Hasebe A., Into T., Watanabe T., Ohata N.** (2002) Signaling pathway induced by lipoproteins derived from *Mycoplasma salivarium* and a synthetic lipopeptide (FSL-1) in normal gingival fibroblasts. *Microbiol Immunol* 46(3): 151-158
- Natsuka S., Akira S., Sugita T., Hashimoto S., Nishio Y., Isshiki H., Kishimoto T.** (1992) Macrophage differentiation specific expression of NF-IL6, a transcription factor for IL-6. *Blood* 79(2): 460-466
- Nauts H.C., Fowler G.A., Bogatko F.H.** (1953) Review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxin) on malignant tumors in man. *Acta Med Scand Suppl* 276
- Neumann H. & Wekerle H.** (1998) Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1-9
- Nicholson S.E. & Hilton D.J.** (1998) The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63: 665-668
- 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 downregulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164(7): 3476-3479
- Okusawa T., Fujita M., Nakamura J., Into T., Yasuda M., Yoshimura A., Hara Y., Hasebe A., Golenbock D.T., Morita M., Kuroki Y., Ogawa T., Shibata K.** (2004) Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6 *Infect Immun* 72(3): 1657-1665
- Oldfield B.J. & McKinley M.J.** (1995) Circumventricular Organs. *The Rat Nervous System*, Second Edition: 391-401
- Oshiumi H., Sasai M., Shida K., Fujita T., Matsumoto M., Seya T.** (2003) TICAM-2: a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278: 49751-49762
- 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 USA* 97(25): 13766-13771
- Pan W. & Kastin A.J.** (2002) TNFalpha transport across blood-brain barrier is abolished in receptor knock out mice. *Exp Neurol* 174: 193-200
- Park J.Y., Pillinger M.H., Abramson S.B.** (2006) Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 199(3): 229-240
- Paul-Clark M.J., McMaster S.K., Belcher E., Sorrentino R., Anandarajah J., Fleet M., Sriskandan S., Mitchell J.A.** (2006) Differential effects of gram-positive versus gram-negative bacteria on NOSII and TNF  $\alpha$  in macrophages: role of TLRs in synergy between the two. *British J Pharmacol* 148: 1067-1075
- Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Seeburg P.H., Derynck 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(5996): 724-729
- Pennica D., Kohr W.J., Fendly B.M., Shire S.J., Raab H.E., Borchardt P.E., Lewis M., Goeddel D.V.** (1992) Characterization of a recombinant extracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor: evidence for tumor necrosis factor-alpha induced receptor aggregation *Biochemistry* 31(4):1134-41



- Plata-Salaman C.R.** (1996) Anorexia during acute and chronic disease. *Nutrition* 12: 69-78
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg m., Riccardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.** (1998) Defective LPS signaling C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088
- Quentmeier H., Schmitt E., Kirchhoff H., Grote W., Mühradt P.F.** (1990) Mycoplasma fermentans-derived high-molecular-weight material induces interleukin-6 release in cultures of murine macrophages and human monocytes. *Infect Immun* 58: 1273-1280
- Raetz C.R.H., 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
- Rakesh K. & Agrawal D.K.** (2005) Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem Pharmacol* 70(5): 649-657
- Rawadi G. & Roman-Roman S.** (1996) Mycoplasma membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of Lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 64: 637-643
- Razin S., Yogev D., Naot Y.** (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Rev* 62(4): 1094-1159
- Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F.** (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8: 217-225
- Rivest S.** (2003) Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 17: 13-19
- Roberts N.J.** (1991) The immunological consequences of fever. In: Mackowiak P. (ed) *Fever: basic mechanisms and management.* Raven Press Ltd., New York, pp 125-142
- Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F.** (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(2): 588-593
- Romanovsky A.A., Simons C.T., Szekely M., Kulchinsky V.A.** (1997) The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R407-R413
- Rose-John S. & Heinrich P.C.** (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 300: 281-290
- 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- $\alpha$ -processing Enzyme from ADAM Family of Zinc Metalloproteases *J Biol Chem* 272: 24588-24593
- Ross G., Hübschle T., Pehl U., Braun H.-A., Voigt k., Gerstberger R., Roth J.** (2003) Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* 94: 1395-1402
- Ross G., Roth J., Störr 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.** (1998) Immunological and neuroendocrine modulation of fever in stress. In: *Progress in Brain Research:* (Sharma H.S. & Westman J., eds). 115: 177-192
- Roth J.** (2002) Fever in acute illness: beneficial or maladaptive? *Wien Klin Wochenschr* 114(3): 82-88
- Roth J.** (2006) Endogenous antipyretics. *Clin Chim Acta* 371:13-24

- Roth J., Aslan T., Störr 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 Regul Integr Comp Physiol* 273: R1529-R1533
- 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 Regul Integr Comp Physiol* 265: R653-R658
- Roth J., De Souza G.E.P.** (2001) Fever induction pathways: evidence from the responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res* 34: 301-314
- Roth J., Goldbach M.J., Störr B., Zeisberger E.** (1996) Studies on the role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the responses to bacterial pyrogenic stimuli. *Ann N Y Acad Sci* 813: 255-263
- Roth J., Harré E.M., Rummel C., Gerstberger R., Hübschle T.** (2004b) Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* 9: 290-300
- Roth J., Hübschle T., Pehl U., Ross G., Gerstberger R.** (2002) Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea pigs. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 443: 411-417
- Roth J., Hopkins S.J., Hoadley M.E., Tripp A., Aslan T., Störr B., Luheshi G.N., Zeisberger E.** (1997b) Fever and production of cytokines in response to repeated injections of muramyl dipeptide in guinea pigs *Pflügers Arch* 434(5): 525-533
- Roth J., Martin D., Störr B., Zeisberger E.** (1998) Neutralisation of pyrogen-induced tumor necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea pigs: effects on fever and interleukin-6 release. *J Physiol* 509: 267-275
- Roth J., McClellan J.L., Kluger M.J., Zeisberger E.** (1994a) Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea pigs. *J Physiol* 477: 177-185
- Roth J., McClellan J.L., Kluger M.J., Zeisberger E.** (1994b) Changes in body temperature and circulating levels of interleukin-6 after intraarterial injections or infusions of tumor necrosis factor  $\alpha$  in guinea-pigs. *Experientia* 50: 815-820
- Roth J., Rummel C., Barth S.W., Gerstberger R., Hübschle T** (2006) Molecular aspect of fever and hypothermia. *Neurol Clin* 24: 421-439
- Roth J. & Zeisberger E.** (1995) Endotoxin tolerance alters thermal response of guinea pigs to systemic infusions of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 268: R514-R519
- Roth J., Zeisberger E., Vybiral S., Jansky L.** (2004a) Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. *Front Biosci* 9: 816-826
- Rothe M., Pan M.G., Henzel W.J., Ayres T.M., Goeddel D.V.** (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis protein. *Cell* 83: 1243-1252
- Rothstein J.L. & Schreiber H.** (1988) Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products cause hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 607-611
- Rottem S.** (2003) Interaction of Mycoplasmas with host cells *Physiol. Rev* 83: 417-432
- Rummel C., Hübschle T., Gerstberger R., Roth J.** (2004) Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *J Physiol* 557: 671-687
- Rummel C., Sachot C., Poole S., Luhshi 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-R1326

- Rummel C., Voss T., Matsumura K., Korte S., Gerstberger R., Roth J., Hübschle T.** (2005) Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Comp Neurol* 491(1): 1-14
- Rutschmann S., Jund A.C., Hertu C., Reichhart J.M., Hoffmann J.A., Ferrandon D.** (2000) The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* 12: 569-580
- Sato S., Nomura F., Kawai T., Takeuchi O., Mühlradt P.F., Takeda K., Akira S.** (2000) Synergy and cross-tolerance between Toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4 mediated signaling pathways. *J Immunol* 165: 7096-7101
- Sato S., Takeuchi O., Fujita T., Tomizawa H., Takeda K., Akira S.** (2002) A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and independent pathways. *Int Immunol* 14: 783-791
- Scammell T.E., Elmquist J.K., Griffin J.D., Scaper C.B.** (1996) Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci* 16(19): 6246-6254
- Scheller J. & Rose-John S.** (2006) Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195: 173-183
- Schlitz J.C. & Sawchenko P.E.** (2003) Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front Biosci* 8: 1321-1329
- Schneider C., Schmidt T., Ziske c., Tiemann k., Uhlinsky V., Behrens P., Sauerbrauch T., Schmidt-Wolf I.G., Mühlradt P.F., Schmidt J., Matren A.** (2004) Tumor suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *Gut* 53(3) 355-361
- Schoebitz B., deKloet E.R., Sutano W., Holsboer F.** (1993) Cellular localization of interleukin-6 mRNA and IL-6 receptor mRNA in the rat brain. *Eur J Neurosci* 5: 1462-1435
- Schuster V.L.** (1998) Molecular mechanism of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60: 221-241
- Sehic E. & Blatteis C.M.** (1996) Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* 726(1-2): 160-166
- Sehic E., Szerkely M., Ungar A.L., Oladehin A., Blatteis C.M.** (1996) Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res Bull* 39(6): 391-399
- Seya T. & Matsumoto M.** (2002) A lipoprotein family from *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Toll-like receptor 2 *J Biochem Cell Biol* 34: 901-906
- Shibata K., Hasebe A., Into T., Yamada M., Watanabe T.** (2000) The N-Terminal Lipopeptide of a 44-kDa Membrane-Bound Lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* Is Responsible for the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on the Cell Surface of Normal Human Gingival Fibroblasts. *J Immunol* 165: 6538-6544
- Shibata K., Hasebe A., Sasaki T., Watanabe T.** (1998) *Mycoplasma salivarium* induces interleukin-6 and interleukin-8 in human gingival fibroblasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19: 275-283
- Smith C.A. & Baglioni C.** (1987) The active form of tumor necrosis factor is a trimer *J Biol Chem* 262(15): 6951-6954
- Solorzano C.C., Kaibara A., Hess P.J., Edwards P.D., Ksontini R., Abouhamze A., McDaniel S., Frazier J., Trujillo D., Kieft G., Seely J., Kohno T., Cosenza M.E., Clare-Salzler M., MacKay S.L.D., Martin S.W., Moldawer L.L., Edwards III C.K.** (1998) Pharmacokinetics, immunogenicity, and efficacy of dimeric TNF binding proteins in healthy and bacteremic baboon. *J Appl Physiol* 84 (4): 1119-1130
- Sharp B.M., Matta S.G., Peterson P.K., Chao C., McAllen K.** (1989) Tumor necrosis factor- $\alpha$  is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 $\beta$ . *Endocrinology* 124: 3131-3133

- 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
- Sugama K., Kuwano K., Furukawa M., Himeno Y., Satoh T., Arai S.** (1990) Mycoplasmas induce transcription and production of tumor necrosis factor in a monocytic cell line, THP-1, by a protein kinase C-independent pathway. *Infect Immun* 58(11): 3564-3567
- Sugimoto N., Simons C.T., Romanovsky A.A.** (1999) Vagotomy does not affect thermal responsiveness to intrabrain prostaglandin E2 and cholecystokinin octapeptide. *Brain Res* 844(1-2): 157-163
- Sundgren-Andersson A., Östlund P., Bartfai T.** (1998) IL-6 is essential in TNF- $\alpha$ -induced fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275: R2028-R2034
- Taga T. & Kishimoto T.** (1992) Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J* 6(15): 3387-3396
- Taga T. & Kishimoto T.** (1997) GP130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15: 797-819
- Takada H. & Kotani S.** (1989) Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. *Crit Rev Microbiol* 16(6): 477-523
- Takeda K. & Akira S.** (2000) STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11: 199-207
- Takeda K & Akira S.** (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17(1): 1-14
- Takeda K., Takeuchi O., Akira S.** (2002) Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 8(6): 459-463
- Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S.** (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451
- Takeuchi O., Kaufmann A., Grote K., Kawai T., Hoshino K., Morr M., Mühlradt P.F., Akira S.** (2000) Cutting edge: Preferentially the R-Stereoisomer of the Mycoplasmal Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activate immune Cells Through a Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *J Immunol* 164: 554-557
- Takeuchi O., Kawai T., Mühlradt P.F., Morr M., Radolf J.D., Zychlinky A., Takeda k., Akira S.** (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 733-742
- Takeuchi O., Rothe M., Goeddel D.V.** (1996) Anatomy of TRAF2: distinct domains for nuclear factor- $\beta$  activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem* 271: 19935-19942
- Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N., Murakami M., Kudo I.** (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 32775-32782
- Tartaglia L.A. & Goeddel D.V.** (1992) Two TNF receptors. *Immunol Today* 13(5): 151-153
- Tartaglia L.A., Pennica D., Goeddel D.V.** (1993) Ligand passing: the 75 kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55 kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268(25): 18542-18548
- 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

- Töllner B., Roth J., Störr B., Martin D., Voigt K.H., 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
- Triantafilou M., Gamper F.G.J., Haston R.M., Mouratis M.A., Morath S., Hartung T., Triantafilou K.** (2006) Membrane sorting of Toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 281(41): 31002-31011
- Tripp An., Roth J., Störr B., Voigt K., Zeisberger E.** (1998) Febrile tolerance develops in response to repeated administration of bacterial lipopolysaccharide but not of interleukin-1 $\beta$  in rats. *J Therm Biol* 23(6): 387-394
- Tschernig T., Lührmann A., Pabst R.** (2003) Recruitment of lymphocytes and dendritic cells from the blood to the bronchoalveolar space and the draining lymph nodes after a single intrabronchial application of the lipopeptide MALP-2 *Pathobiology* 70: 260-265
- Turnbull A.V. & Rivier C.L.** (1999) Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79: 1-71
- Uematsu S & Akira S.** (2006) Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 84(9): 712-725
- 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
- Vallières L. & Rivest S.** (1997) Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$ . *J Neurochem* 69: 1668-1683
- Van Amersfoort E.S., van Berkel T.J.C., Kuiper J** (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16(3): 379-414
- Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M.** (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97-120
- Van der Poll T., Coyle S.M., Moldawer L.L., Lowry S.F.** (1996) Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *J Infect Dis* 174(6): 1356-1360
- Van Wagoner N.J., Oh J-W., Repovic P., Benveniste E.N.** (1999) Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci* 19(13): 5236-5244
- Van Zee K.J., De Forge Y., Hesse D.G., Manogue K.R., Lee A.T., Kuo G.C., Lowry S.F., Cerami A.** (1992) tumor necrosis factor soluble receptors circulating during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro ad in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4845-4849
- Voss T., Barth S.W., Rummel C., Gerstberger R., Hübschle T., Roth J.** (2007) STAT3 and COX-2 in the guinea-pig brain during fever induced by the Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid. *Cell Tissue Res* published online ahead of print DOI 10.1007/s00441-007-0386-6
- 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
- Watanabe T., Matsuura K., Seto K.** (1986) Enumeration, isolation, and species identification of Mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). *J Clin Microbiol* 23: 1034-1038

**Wegenka U.M., Bushman J., Lütticken C., Heinrich P.C., Horn F.** (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 13: 276-288

**Wright S.D.** (1999) Toll, a new puzzle of innate immunity. *J Exp Med* 189: 605-609

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

**Xuan Y.T., Guo Y., Zhu Y., Han H., Langenbach R., Dawn B., Bolli R.** (2003) Mechanisms of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 35: 525-537

**Yamagata K., Matsumura K., Inoue W., Shiraki T., Suzuki K., Yasuda S., Cao C. Watanabe Y., Kobayashi S.** (2001) Coexpression of microsomal-type prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 in the 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.** (2002b) Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420: 324-329

**Yamashiro O., Morimoto A., Sakata Y., Watanabe T., Murakami N.** (1993) Febrile and metabolic tolerance to endotoxin and human recombinant interleukin-1 $\beta$  in rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 264: R1180-R1185

**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

**Yirmiya R., Barak O., Avitsur R., Gallily R., Weidenfeld J.** (1997) Intracerebral administration of *Mycoplasma fermentans* produces sickness behaviour: role of prostaglandins *Brain Research* 749: 71-81

**Yirmiya R., Wiedefeld J., Barak O., Avitsur R., Pollak Y., Gallily R., Wohlman A., Ovadia H., Ben-Hur T.** (1999) The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral *Mycoplasma fermentans*. *Brain Res* 829: 28-38

**You X., Zeng Y., Wu Y.** (2006) Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 7(5):342-350

**Zeisberger E.** (1999) From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol* 24: 287-326

**Zeisberger E. & Roth J.** (1994) Effects of immobilization on febrile, neuroendocrine and immunological responses in guinea pigs In: Zeisberger E., Schönbaum E., Lomax P. (eds) *Thermal Balance in Health and Disease: Recent Basic Research and Clinical Progress*. Birkhäuser, Basel pp 403-408

**Zeisberger E. & Roth J.** (1998) Tolerance to Pyrogens (In: Molecular Mechanisms of Fever) *Ann N Y Acad Sci* 856: 116-131

**Zhang X., Blenis J., Li H.c., Schindler C., Chen-Kiang S.** (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT promoter complexes. *Science* 267(5206): 1990-1994

**Zhang Y.H., Lin J.X., Vilcek J.** (1990) Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa-B-like sequence. *Mol Cell Biol* 10: 3818-3823

**Ziegler-Heitbrock H.W., Wedel A., Schraut W., Strobel M., Wendelgass P., Sternsdorf T., Bauerle P.A., Haas J.G., Riethmuller G.** (1994) Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 269(25): 17001-17004

-Literaturverzeichnis-

---

**Zuckerman S.H. & Evans G.F.** (1992) Endotoxin tolerance: in vivo regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 synthesis at the transcriptional level. *Cell Immunol* 140: 513-519

## 9 ANHANG

### Publikationen

#### (A) Originalarbeiten:

**Greis A., Murgott J., Rafalzik S., Gerstberger R., Hübschle T., Roth R.** (2007) Characterisation of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *American Journal of Physiology: in revision*

**Greis A., Murgott J., Gerstberger R., Hübschle T., Roth J.** (2007) Toll-like receptor 2- and -6 mediated stimulation by FSL-1 induces partial tolerance and LPS cross tolerance in guinea pigs. *Journal of Applied Physiology: prepared for submission*

#### (B) Kongreßmitteilungen:

**Greis A., Hübschle T., Rafalzik S., Gerstberger R., Roth J.** (2006) Fever and circulating tumor necrosis factor (TNF) in response to repeated injections of the Mycoplasma derived pyrogen fibroblast-stimulating lipopeptide-1 (FSL-1) in guinea pigs. *16. Symposium der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft* (Gießen, 19.-21.02.2006)

**Greis A., Hübschle T., Rafalzik S., Gerstberger R., Roth J.** (2006) Fever and circulating tumor necrosis factor in response to repeated injections of fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *Second International Meeting on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation* (Phoenix, USA, 03.-06.03.2006)



## Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim Roth, für die sehr gute Betreuung bedanken. Seine Hilfsbereitschaft, jederzeit für Ratschläge und Anregungen Zeit zu finden, haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Gerstberger danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Dissertation in seinem Institut anzufertigen.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ der JLU Gießen, das mich durch ein Stipendium der DFG finanziell unterstützt hat.

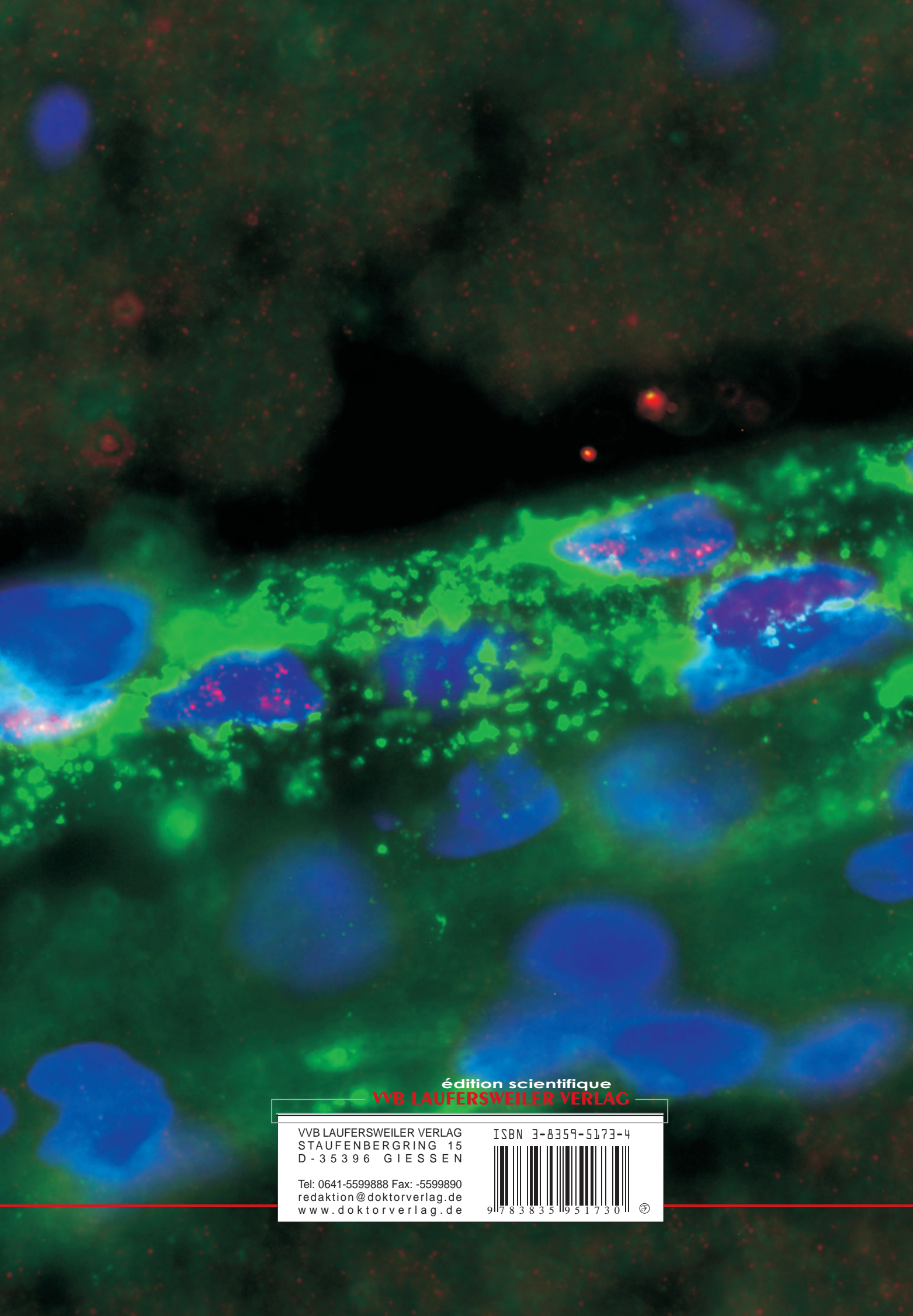
Bei Frau Jolanta Murgott möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Assays bedanken. Janina Welsch danke ich für das Korrektur lesen und Sandra Rafalzik für zahlreiche Tipps zur Arbeit mit Word und anderen Programmen. Thilo Voss und Christoph Rummel danke ich für die Einführung in die OP-Techniken und die Immunhistochemie. Tierpfleger Michael Haas danke ich für das „wochenendliche Wiegen“ der Meerschweinchen und seine sorgfältige Pflege bei der Aufzucht der Tiere.

Bei allen „Mädels“ der AG Gerstberger und AG Diener möchte ich mich für ihre Unterstützung und die abwechslungsreichen Arbeitspausen bedanken – ich werde euch alle sehr vermissen! Allen restlichen Mitarbeitern des Instituts für Veterinärphysiologie möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund Björn für seine Ruhe und Geduld in turbulenten Arbeitsphasen bedanken. Ein großer Dank gilt meiner Familie, die mich während des Studiums und der Promotion in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

## **Erklärung**

*“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“*



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5173-4



9 783835 195173 0

