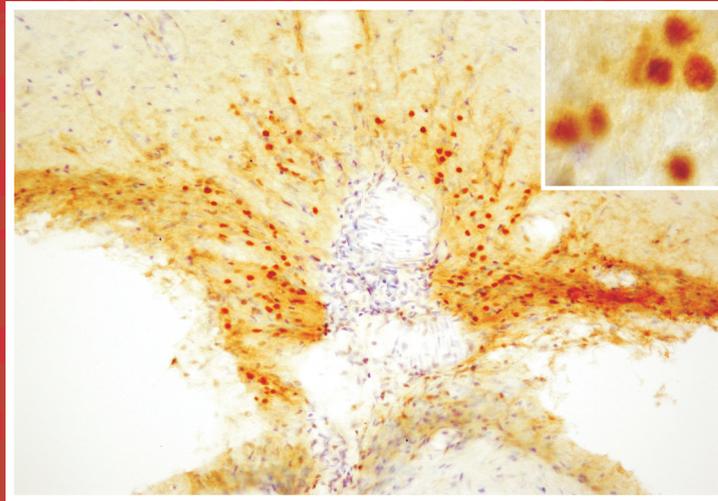


Die Rolle von Interleukin-6 (IL-6) in der zentralnervös vermittelten Fieberentstehung der Ratte



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

Eva-Maria Harré

WB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN: 3-89687-635-X

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 2003

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

1st Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE
www.vvb-ips.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

***Die Rolle von Interleukin-6 (IL-6
in der zentralnervös vermittelten
Fieberentstehung der Ratte***

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

**Eingereicht von
Eva-Maria Harré
Tierärztin aus Ulm (Baden-Württemberg)**

Gießen 2003

***Mit Genehmigung des Fachbereiches für Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen***

Dekan: Professor Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

Gutachter:

Professor Dr. Rüdiger Gerstberger

Professor Dr. Klaus Doll

Tag der Disputation: 30.06.2003

***Gebt mir die Macht, Fieber zu erzeugen,
und ich heile alle Krankheiten.
(Parmenides, 540-480 v. Chr.)***

Meinen Eltern gewidmet.

Kapitel 1: Einleitung

1.1 Fieber und fieberverursachende Substanzen – Ein historischer Überblick..... S.1

1.1.1 Geschichte des Fiebers: Antike Vorstellungen.....S.2

1.1.2 Vom Fühlen zum Messen der Körpertemperatur.....S.3

1.1.3 Klinische Bedeutung der Thermometrie.....S.4

1.1.4 Fieber.....S.4

1.1.4.1 *Unterschied zwischen Hyperthermie und Fieber*.....S.5

1.1.4.2 *Fieber und sein biologischer Nutzen*.....S.6

1.1.2 Entdeckung der fieberverursachenden Substanzen – Die Pyrogene.....S.7

1.1.2.1 *Exogene Pyrogene*.....S.8

1.1.2.2 *Endogene Pyrogene*.....S.9

1.2 Prinzipien der Thermoregulation.....S.12

1.3 Fieber, Teil der Akuten-Phase-Antwort (APR): heutiger Stand der Forschung..S.15

1.4 Lipopolysaccharid (LPS) – ein exogenes Pyrogen.....S.16

1.4.1 Struktur von LPS.....S.16

1.4.2 LPS-induzierte pathophysiologische Vorgänge.....S.18

1.5 Interleukin-6 (IL-6) und das Netzwerk der Zytokine.....S.20

1.6 Eigenschaften von IL-6.....S.22

1.6.1 IL-6 als endogenes Pyrogen in der Fieberentstehung.....S.24

1.6.2 Vorkommen der IL-6-Synthese im ZNS.....S.26

1.6.3 IL-6 und die Signaltransduktion.....S.27

1.6.3.1 *Die Zytokinrezeptoren*.....S.27

1.6.3.2 *Die “Familie“ der Interleukin-6 Rezeptoren (IL-6R)*.....S.28

1.6.3.3 *Der lösliche Interleukin-6 Rezeptor (sIL-6R)*.....S.30

1.6.3.4 *Vorkommen des Interleukin-6 Rezeptors im ZNS*.....S.31

1.6.3.5 *Die intrazelluläre Signaltransduktion durch die gp130-Rezeptoruntereinheit des IL-6R*.....S.32

1.7 Theorien zum fieberinduzierenden Signaltransfer.....S.36

1.7.1 Die Bluthirnschranke (BHS).....S.37

1.7.2 Die zirkumventrikulären Organe (CVOs).....S.37

1.7.3 Die sensorischen CVOs.....S.39

1.7.4 Die Hypothesen.....S.40

1.8 Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit.....S.43

Kapitel 2: Material & Methoden

2.1 Versuchstiere.....S.46

2.2 Operationen.....S.47

2.2.1 Narkose.....S.47

2.2.2 Vorbereitung des Operationsfeldes.....S.47

2.2.3 Intrazerebroventrikuläre Kanülierung.....S.48

2.2.3.1 *Angiotensin-II Trinktest*.....S.50

2.2.4 Implantation des Transmitters.....S.50

2.3 Telemetrische Erfassung der Körperkerntemperatur.....S.51

2.4 Verwendete Substanzen.....S.52

2.4.1 Lipopolysaccharide (LPS).....S.53

Inhaltsverzeichnis

2.4.2	Rekombinantes rattenspezifisches Interleukin-6 (<i>rrIL-6</i>).....	S.54
2.4.3	Pyrogenfreie physiologische Kochsalzlösung.....	S.54
2.5	Verwendete Lösungen und Puffer.....	S.54
2.5.1	Phosphatpuffer.....	S.55
2.5.2	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung.....	S.55
2.5.3	Paraformaldehydlösung.....	S.55
2.5.4	Saccharoselösung.....	S.55
2.6	Durchführung der Versuche.....	S.56
2.6.1	Stimulation der Versuchstiere.....	S.56
2.6.1.1	<i>Periphere Stimulation (intraperitoneal)</i>	S.56
2.6.1.2	<i>Zentrale Stimulation (intraazerebroventrikulär)</i>	S.56
2.6.2	Aufzeichnung der Körperkerntemperatur.....	S.56
2.6.3	Perfusion.....	S.57
2.6.4	Entnahme der Proben.....	S.57
2.6.4.1	<i>Blutentnahme nach systemischer Applikation</i>	S.57
2.6.4.2	<i>Entnahme der Gehirnproben</i>	S.58
2.7	Analyse der Proben.....	S.58
2.7.1	IL-6 Bioassay.....	S.58
2.7.1.1	<i>Prinzip des IL-6 Bioassays</i>	S.58
2.7.1.2	<i>Verwendete Zelllinie</i>	S.59
2.7.1.3	<i>Durchführung des IL-6 Bioassays</i>	S.60
2.7.2	Immunhistochemische Analyse der Rattengehirne.....	S.62
2.7.2.1	<i>Schneiden der Gehirne am Gefriermikrotom</i>	S.62
2.7.2.2	<i>Immunhistochemischer Nachweis der nukleären STAT3- Translokation</i>	S.63
2.7.2.2.1	<i>Grundlage der Immunhistochemie</i>	S.63
2.7.2.2.2	<i>Avidin-Biotin-Methode</i>	S.63
2.7.2.2.3	<i>Der STAT3 Antikörper</i>	S.64
2.7.2.2.4	<i>Immunhistochemisches Protokoll</i>	S.66
2.7.2.3	<i>Bestimmung des zellulären Ursprungs der nukleären STAT3- Translokation durch indirekte Immunfluoreszenz</i>	S.71
2.8	Graphische Auswertung und Statistik.....	S.77
2.8.1	Telemetriedaten.....	S.77
2.8.2	IL-6-Biossay.....	S.77
2.8.3	Mikroskopisch-histologische Auswertung.....	S.78
2.8.3.1	<i>Durchlichtverfahren</i>	S.78
2.8.3.2	<i>Immunfluoreszenzverfahren</i>	S.79
2.9	Versuchsprotokolle.....	S.80
2.9.1	Periphere Stimulation durch intraperitoneale Applikation der Substanzen...S.80	
2.9.1.1	<i>LPS-induziertes zirkulierendes IL-6</i>	S.81
2.9.1.2	<i>LPS-induziertes Fieber</i>	S.81
2.9.1.3	<i>rrIL-6-induziertes zirkulierendes IL-6</i>	S.81
2.9.1.4	<i>rrIL-6-induziertes Fieber</i>	S.81
2.9.1.5	<i>LPS- oder IL-6-induzierte nukleäre STAT3 Translokation im Gehirn</i> ...S.81	
2.9.1.6	<i>Charakterisierung des zellulären Ursprung der nukleären STAT3- Translokation nach systemischer Pyrogenstimulation</i>	S.82

Inhaltsverzeichnis

2.9.2 Zentrale Stimulation durch intrazerebroventrikuläre Applikation der Substanzen.....	S.82
2.9.2.1 <i>rrIL-6-induziertes Fieber</i>	S.82
2.9.2.2 <i>rrIL-6 induzierte nukleäre STAT3 Translokation</i>	S.82
<u>Kapitel 3: Ergebnisse</u>	S.84
3.1 Systemische Applikation (i.p.) von LPS im Vergleich zur systemischen Applikation (i.p.) von 0.9% NaCl bei Ratten.....	S.85
3.1.1 Verlauf der Körpertemperatur nach intraperitonealer Applikation von LPS oder eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl.....	S.85
3.1.2 Plasmakonzentration von bioaktivem IL-6 nach intraperitonealer Applikation von LPS bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl.....	S.86
3.1.3 Neuroanatomische Analyse des Rattengehirns nach intraperitonealer Applikation von LPS bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl.....	S.88
3.2 Systemische Applikation (i.p.) von <i>rrIL-6</i> im Vergleich zur systemischen Applikation (i.p.) von 0.9%iger NaCl bei Ratten.....	S.94
3.2.1 Verlauf der Körpertemperatur nach intraperitonealer Applikation von <i>rrIL-6</i> bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl.....	S.94
3.2.2 Plasmakonzentration von bioaktivem IL-6 nach intraperitonealer Applikation von <i>rrIL-6</i> oder eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl.....	S.95
3.2.3 Neuroanatomische Analyse der Rattenhirne nach intraperitonealer Applikation von <i>rrIL-6</i> bzw. 0.9%iger NaCl.....	S.97
3.3 Systemische Applikation (i.p.) von LPS im Vergleich zur systemischen Applikation (i.p.) von <i>rrIL-6</i>	S.102
3.3.1 Verlauf der Körpertemperatur nach intraperitonealer Applikation von LPS bzw. <i>rrIL-6</i> bei Ratten.....	S.102
3.3.2 Vergleich der Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 nach intraperitonealer Applikation von <i>rrIL-6</i> bzw. LPS.....	S.104
3.3.3 Quantitative Analyse der Anzahl nukleärer STAT3 Signale 60min bzw. 120min nach intraperitonealer Applikation von <i>rrIL-6</i> bzw. LPS.....	S.105
3.4 Neuroanatomische Charakterisierung des zellulären Ursprungs der nukleären STAT3 Signale im OVLT und SFO 60min nach systemischer Applikation von <i>rrIL-6</i> sowie 120min nach systemischer Applikation (i.p.) von LPS.....	S.109
3.5 Zentrale Applikation (i.c.v.) von <i>rrIL-6</i>	S.113
3.5.1 Verlauf der abdominalen Körpertemperatur nach intrazerebroventrikulärer Injektion von <i>rrIL-6</i> bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl.....	S.113
3.5.2 Die intrazerebroventrikuläre Applikation von <i>rrIL-6</i> induziert eine zeitabhängige nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 in verschiedenen Gehirnstrukturen.....	S.114
3.5.3 Nachweis des nukleären Ursprungs der STAT3-Signale durch Markierung der Zellkerne mit DAPI.....	S.117

Inhaltsverzeichnis

3.5.4 Vergleich der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 60min bzw. 30min nach intraperitonealer bzw. intrazerebroventrikulärer Applikation von <i>rrIL-6</i>	S.118
--	-------

Kapitel 4: Diskussion

Diskussion.....	S.120
-----------------	-------

Kapitel 5: Zusammenfassung

Zusammenfassung.....	S.139
----------------------	-------

Kapitel 6: Summary

Summary.....	S.141
--------------	-------

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis.....	S.143
---------------------------	-------

Anhang

Publikationen.....	S.165
Danksagung.....	S.167
Eidesstattliche Erklärung.....	S.168

Kapitel 1: Einleitung

1.1. Fieber und fieberverursachende Substanzen: Ein historischer Überblick

Eines der ältesten und bekanntesten Zeichen im Rahmen von Erkrankungen ist Fieber. Die Ägypter nahmen an, daß sich die für Krankheit und Fieber verantwortlichen Substanzen im Darminhalt befänden. Die Griechen hingegen sahen in einem gestörten Verhältnis der Körpersäfte, vor allem im Überschuß eines Körpersaftes, die Ursache der Fieberentstehung.

Ende des 19. Jahrhunderts begann man, den Zusammenhang zwischen Fieber und bakteriellen Zellwandbestandteilen etwa von *Escherichia coli* als einem ubiquitär im Darm vorkommenden Bakterium zu verstehen. Diese sogenannten exogenen (körperfremden) Pyrogene (siehe Kapitel 1.1.2.1) lösen mitunter die Freisetzung von endogenen (körpereigenen) Pyrogenen (siehe Kapitel 1.1.2.2) aus. Zu diesen gehören auch Zytokine, die im klassischen Körpersaft Blut nachgewiesen werden können.

Das durch die Zytokinkaskade ausgelöste Fieber ist kein willkürliches und unkontrolliertes Ereignis, sondern ein streng regulierter Mechanismus, durch den eine erhöhte Körpertemperatur in einem engen Bereich aktiv aufrechterhalten wird.

Innerhalb der Zytokinkaskade scheint Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle einzunehmen. Die Beteiligung an der Fieberentstehung war jedoch nicht die erste Eigenschaft dieses Zytokins, die man entdeckte, sondern seine Beteiligung als "Hepatozyten-stimulierender-Faktor" (HSF) an der Akuten-Phase-Reaktion (APR). Inzwischen wird Interleukin-6 für zahlreiche biologische Reaktionen bzw. Funktionen verantwortlich gemacht und als wichtiger Mediator des Organismus, insbesondere im Hinblick auf die Entstehung von Fieber, gesehen.

Ob Interleukin-6 bei der Fieberentstehung eine entscheidende Bedeutung besitzt, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.1.1 *Geschichte des Fiebers: Antike Vorstellungen*

Fieber als pathophysiologische Erhöhung der Körperkerntemperatur, zumeist ausgelöst durch Abwehrvorgänge infolge eingedrungener Bakterien, Viren oder anderer körperfremder Substanzen, ist eines der ältesten und bekanntesten Krankheitszeichen bei Säugetieren inklusive des Menschen. Fieberähnliche Prozesse lassen sich schon bei phylogenetisch primitiven Arten wie Reptilien nachweisen (Kluger 1991a). Schon mehrere tausend Jahre vor Christi Geburt zeigten sumerische Piktogramme, daß Fieber als eine klinische Entität (mittelalterlicher Begriff für die *“Seiendheit“* von etwas, daß etwas ist) betrachtet wurde (Majno 1975).

Erste bekannte Vorstellungen über die Entstehung von Fieber stammen aus der Zeit der Pharaonen. Die ägyptischen Ärzte vermuteten, daß ein schädigendes Agens (*“whdw“*), das bei der Verwesung des Darminhaltes bzw. Stuhls – im heutigen Terminus: bei intestinaler Autointoxikation – entsteht, die Ursache von Krankheit sein kann (Steuer & Saunders 1959). Die Aufnahme von *“whdw“* aus dem Stuhl in den Kreislauf resultiere u.a. in einer Verklumpung des Blutes, einem Pulsanstieg sowie einer gesteigerten Wärmeproduktion bzw. Fieberauslösung. Diese Sichtweise war eine bemerkenswerte Vision des heutigen Verständnisses von Endotoxinen und ihren systemischen Effekten. Sie entwickelte sich wahrscheinlich aus den Beobachtungen der ägyptischen Priester bei der religiösen Handlung des Mumifizierens. Der vom Darm ausgehende, üble Geruch Verstorbener ließ auf eine Verbindung zwischen Darminhalt und Verwesung und damit Krankheit schließen. Die ägyptische Medizin beeinflusste die Theorien ihrer griechischen Nachbarn. So übernahm die Schule des Cnidian das Verwesungsprinzip, welches besagt, daß Krankheiten aus den Resten bzw. Flüssigkeitsüberständen nicht komplett verdauter Nahrung entstünden. Zur selben Zeit, im 5. Jahrhundert vor Christi Geburt, vertrat die Schule des Hippokrates auf Kos eine andere, aber ebenfalls auf Körperflüssigkeiten basierende Auffassung:

„Die Gesundheit sowie deren Abwesenheit sei als unmittelbare Folge aus den Beziehungen der Körpersäfte – Blut, Schleim, gelbe und schwarze Galle – zueinander anzusehen“.

700 Jahre später entwickelte Galen, der als Begründer der experimentellen Physiologie angesehen wird, aus der Theorie der Humoralpathologen eine konkretere These: *„Fieber beruhe auf einem Ungleichgewicht der Körpersäfte, insbesondere auf einem Überschuß an gelber Galle“.*

Kapitel 1: Einleitung

Diese Ansicht ist besser vor dem Hintergrund der damaligen Zeit zu verstehen, da alle größeren und fieberhaften infektiösen Erkrankungen, wie z.B. Hepatitis, Malaria, Tuberkulose und Typhus, mit Gelbsucht einhergingen (Siegel 1968). Fieber wurde hierbei als die Reaktion des Körpers angesehen, den Überschuß des schädigenden und im Übermaß vorhandenen Körpersaftes zu “verkochen“ und somit aus dem Körper zu entfernen (Yost 1950). Anzumerken ist, daß die damaligen Naturforscher als Quelle der Körperwärme ein “calor innatus“ (wörtlich: das hineingeborene Feuer) mit seinem Sitz in der Herzscheidewand vermuteten. Nach ihrer Ansicht hing die Körperwärme stark von der Atmung bzw. der Lunge ab, deren Hauptaufgabe die Kühlung dieses “Feuerofens“ sei. Diese Vorstellung über die Funktion der Lunge und des Körperkreislaufs wurde im späten 14. Jahrhunderts durch Miguel Serveto aufgeklärt, der von der Inquisition wegen seiner “ketzerischen“ Enthüllungen hingerichtet wurde und dessen Befunde dadurch in Vergessenheit gerieten. Deshalb wird diese Entdeckung William Harvey zuerkannt, der diese erst 50 Jahre später als Serveto machte.

Auch wenn es im Laufe der Jahrhunderte zahlreiche unterschiedliche, irrierte Anschauungen (u.a. Fieber als “Gottesstrafe“) über die Ursache von Fieber gegeben hat, überdauerte jedoch die Theorie der Humoralpathologen über die Entstehung von Krankheiten diese Zeit bis zum Beginn moderner Wissenschaften wie Pathologie und Mikrobiologie in der Mitte des 19. Jahrhunderts (zur Übersicht Atkins 1984).

1.1.2 Vom Fühlen zum Messen der Körpertemperatur

Vor der Erfindung des Fieberthermometers konnte Fieber nicht direkt gemessen werden. Die “calor preaternaturalis“ (außergewöhnliche Wärme – Galen) bewertete der Arzt anhand des äußeren Erscheinungsbildes des Patienten, dessen Angaben zu seinem Temperaturempfinden, sowie “de tactu“ (vom Gefühl) mit seinen “*musici digiti*“ (mühsam, d.h. begabten Fingern – nach Albrecht von Haller 17. Jhd.). Hippokrates von Kos beschreibt kalt und warm, indem er dies wahrscheinlich aus den taktilen Beobachtungen der Hauttemperaturänderungen bei den zahlreich und ausführlich von ihm beobachteten fieberhaften Erkrankungen ableitete (Benzinger 1977).

Herophilus von Alexandria objektivierte im 3. Jahrhundert vor Christi Geburt erstmalig das bisherige “Wärmeempfinden“. Er setzte mittels einer Wasseruhr die Pulsfrequenz in Korrelation zur Körpertemperatur. Überstieg die Zahl der Pulsschläge die “Norm des

Kapitel 1: Einleitung

Lebensalters“, ergab dies einen Hinweis auf die Höhe des Fiebers (von Staden 1989). Die ersten Bestimmungen der Körpertemperatur des Menschen mittels eines noch unförmigen Meßinstrumentes von Galileo Galilei unternahm Sanctorius Justipolitanus in Venedig 1612. Sanctorius prägte den Begriff “Thermometer“ (Sanctorius 1614).

1.1.3 *Klinische Bedeutung der Thermometrie*

Die klinische Bedeutung der Thermometrie erkannte und lehrte als erster Anton de Haen. In 15 Bänden schilderte er detailliert seine Temperaturuntersuchungen an Gesunden und unterschiedlich erkrankten Menschen, die jedoch kaum Beachtung fanden (de Haen 1757-1773). Mit der Verfügbarkeit exakterer Instrumente konnten 1835 37°C als mittlere Körpertemperatur eines gesunden Erwachsenen bestimmt werden (Bequerel & Breschet 1839).

Den Einzug der Thermometrie in die Klinik, sowie deren Etablierung als wichtiges diagnostisches Kriterium, bewirkte Carl August Wunderlich 1851 in Württemberg. Bei mehrfachen täglichen Messungen an über 25.000 spezifischen Fällen in seiner Klinik, stellte er fest, daß die Temperatur bei Gesunden konstant war und bei Kranken variierte. Hieraus leitete er 1868 etwa 40 Thesen zum “Verhalten der Eigenwärme in Krankheiten“ ab (Wunderlich 1868). Zur Temperaturmessung wurden ca. 30cm lange Thermometer verwendet, die für 20min in der Achselhöhle zu halten waren. Wunderlich sah in der Thermometrie eine exakte, objektive Methode, die den in der Heilkunst Tätigen erlaube, ein “Phänomen“ zu messen, welches von der Gesamtsumme der organischen Veränderungen abhing.

1.1.4 *Fieber*

Bereits 1780 hatten Lavoisier und Laplace die Ursache für dieses “Phänomen“ in einem metabolischen Prozeß vermutet, bei dem Sauerstoff mit Wasserstoff und Kohlenstoff reagiert (Lavoisier 1793). Diese Erkenntnisse berücksichtigend, beschreibt der Franzose Claude Bernard etwa 100 Jahre später die Thermoregulation als eines der wichtigsten Beispiele zu seiner Theorie der Homöostase: die Aufrechterhaltung des “*milieu*

Kapitel 1: Einleitung

intérieure“ in Bezug auf die Körpertemperatur sei bei warmblütigen Lebewesen eine Balance zwischen Wärmeproduktion und Wärmeabgabe bzw. –verlust.

Er zeigte, daß der Wärmeverlust vom autonomen Nervensystem über die Regulation der Hautdurchblutung gesteuert wird (Bernard 1876). Etwa gleichzeitig formulierte der deutsche Pathologe und Kliniker Liebermeister eine ähnliche, aber weitreichendere Hypothese zur Erklärung der Fieberentstehung:

“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).

Damit hatte Liebermeister nicht nur eine erste fundamentale Definition von Fieber und eine Vorstellung über einen zu regulierenden Sollwert gegeben, sondern gleichzeitig auch den Unterschied zwischen einer passiv und einer aktiv erhöhten Körpertemperatur beschrieben.

1.1.4.1 Unterschied zwischen Hyperthermie und Fieber

Heute wird für den Zustand einer passiv erhöhten Körperkerntemperatur, der durch ein Missverhältnis zwischen Wärmeaufnahme, -produktion und -abgabe infolge von Hitzeeinwirkung oder körperliche Arbeit hervorgerufen wird, der Begriff der Hyperthermie (gr.: *hyper*: zuviel, mehr / *thermos*: Wärme) verwendet. Die Hyperthermie ist somit das Ergebnis einer gestörten Thermoregulation (Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission) 2001).

Der Begriff des Fiebers beschreibt im Gegensatz dazu die aktive Verstellung des thermoregulatorischen Sollwertes und das Bestreben des Organismus, diesen erhöhten Sollwert aufrechtzuerhalten. Dies resultiert letztendlich ebenfalls in einer erhöhten Körperkerntemperatur und ist oft als eine Begleiterscheinung der Immunabwehr eines Organismus gegenüber eingedrungenen, pathogen wirkenden Substanzen anzusehen. Die Erhöhung des Sollwertes der Körperkerntemperatur führt zu einer Aktivierung von Thermoeffektoren, die durch verschiedene Mechanismen die Körpertemperatur aktiv

Kapitel 1: Einleitung

erhöhen. Zeitdauer und Ausmaß des Fiebers sind von Spezies zu Spezies unterschiedlich, wobei ein festgelegter oberer Temperaturgrenzwert (z.B. 41°C beim Menschen) jedoch selten überschritten wird. Nach dieser zeitweiligen Erhöhung des Sollwertes führen andere Mechanismen wieder zu dessen Herabsetzung auf den Normwert. Die Entstehung von Fieber beruht auf verschiedenen Mechanismen, die zu einer Veränderung der neuronalen Kontrolle der Körperkerntemperatur führen. Die Substanzen, die zu dieser Veränderung führen, werden als Pyrogene bezeichnet. Dabei werden exogene (körperfremde) und endogene (körpereigene) Pyrogene unterschieden. Limitierte Anstiege der Körperkerntemperatur sind für den Organismus unschädlich, solange keine anderen Körperfunktionen beeinträchtigt werden. Fieber kann bei Infektionen zu den vorteilhaften Effekten der humoralen Abwehr beitragen (IUPS Thermal Commission 2001).

1.1.4.2 Fieber und sein biologischer Nutzen

Das Phänomen Fieber besitzt eine phylogenetisch lange Geschichte (Vaughn et al. 1974). Fieber ist nicht nur auf Organismen wie Säugetiere oder Vögel beschränkt, die ihre Körperkerntemperatur innerhalb einer engen Schwankungsbreite aufrechterhalten können (homöotherme oder gleichwarme Organismen). Auch sogenannte wechselwarme (poikilotherme) Organismen wie Amphibien, Fische, Reptilien und Insekten sind in der Lage, eine erhöhte Körpertemperatur im Sinne von Fieber zu entwickeln (Kluger 1991b). Bei einer Erhöhung des hypothalamischen Sollwertes, wie z.B. durch eine fieberhafte Infektion, suchen wechselwarme Tiere eine wärmere Umgebung zur Erhöhung ihrer Körpertemperatur auf. Infizierte Tiere, denen es versuchsbedingt verwehrt wurde, eine wärmere Umgebung aufzusuchen (Kluger et al. 1975) oder bei denen die Fieberentwicklung durch Applikation von fieberhemmenden Mitteln (Salizylaten) unterdrückt wurde (Bernheim & Kluger 1976), wiesen einen schwereren Krankheitsverlauf und eine höhere Sterblichkeitsrate auf. Daher kann das Phänomen Fieber aus evolutionärer Sicht als eine nützliche Anpassung bzw. Adaptation angesehen werden, die sich begünstigend auf die Überlebensrate im Rahmen einer Infektion auswirkt (Kluger 1979). Die Steigerung der Überlebensrate durch Fieber kann auf verschiedene Ursachen (Kluger et al. 1975) zurückgeführt werden.

Kapitel 1: Einleitung

Zum einen führt eine erhöhte Körperkerntemperatur zu einer Steigerung der Immunabwehr, zum anderen setzt sie die Toxizität der Bakterientoxine herab und hemmt das Bakterienwachstum.

1.1.5 *Entdeckung der fieberverursachenden Substanzen – Die Pyrogene*

Als Pyrogene (gr.: *pyro*: warm / *gen(-ese)*: erzeugen) werden Substanzen bezeichnet, die, wenn sie in den Körperkreislauf bzw. in die Zirkulation oder direkt intrazerebral appliziert werden, die Möglichkeit besitzen, Fieber mit seinen Begleitsymptomen und Folgen auszulösen. Dabei kann man exogene Pyrogene – außerhalb des Körpers gebildete Pyrogene – und endogene Pyrogene – von körpereigenen Zellen synthetisierte und freigesetzte pyrogene Substanzen – unterscheiden.

Das heute gültige Verständnis für den Pathomechanismus der Pyrogene reicht in seinen Anfängen in das frühe 18. Jahrhundert zurück. Der französische Arzt Broussais verglich verschiedene Manifestationen von fieberhaften Erkrankungen mit postmortal eingetretenen Gewebsveränderungen. Er schloß auf ein "*agens irritans sive inflammans*" (einen reizenden oder entzündlichen Stoff) als den ursächlichen Grund für die beobachtbaren pathologischen Veränderungen (Foucault 1975). In einer detaillierten Abhandlung über Fieber – größtenteils auf eigenen Experimenten beruhend – postulierte der englische Pathologe und Mikrobiologe William H. Welch 1888 sinngemäß:

“Eine heterogene Gruppe pyrogener Substanzen wie Gewebsfragmente (bei nicht-infektiösen Erkrankungen) sowie Toxine von Mikroben rufen offensichtlich Fieber indirekt über einen gemeinsamen Mechanismus hervor, möglicherweise durch Freisetzung von “Fibrin-Fermenten“.

Diese sollten ihrerseits direkt am thermoregulatorischen Zentrum im Gehirn wirken, welches er in subkortikalen Bereichen in Nähe des Thalamus vermutete. Dieses Zentrum wiederum löse die für den Temperaturanstieg verantwortlichen peripheren Veränderungen aus. Zusammenfassend wies er dem Fieber einen nützlichen Effekt zu, sei es direkt in der Zerstörung der Mikroben oder indirekt durch Erhöhung der Immunresistenz bzw. Infektabwehr. Erst 1953 konnte die Richtigkeit seiner Annahme teilweise von Bennett und Beeson gezeigt werden: nicht die Toxine der Mikroorganismen induzieren Fieber, sondern vielmehr Bestandteile ihrer Zellwände.

Kapitel 1: Einleitung

Diese werden als sogenannte "Endotoxine" bezeichnet, zu denen vor allem Lipopolysaccharide (siehe Kapitel 1.4) und Peptidoglykane, wie Muramyl-dipeptid (MDP) der bakteriellen Zellwand gehören. Diese auch als "exogene Pyrogene" bezeichneten Endotoxine induzieren bei polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen die Synthese eines oder mehrerer körpereigener "endogener Pyrogene" (Beeson 1948, Bennett & Beeson 1953a & 1953b). In der älteren Literatur finden sich für das endogene bzw. "Leukozyten-Antigen" verschiedene Namen wie beispielsweise "Mononuclear Cell Factor (MCF), Leukocytic Endogenous Mediator (LEM) oder Lymphocyte Activating Factor (LAF)". Inzwischen ist gezeigt worden, daß durch exogene Pyrogene ein "biologischer Cocktail" aus mehreren endogenen Pyrogenen bzw. verschiedenen, pleiotropen Faktoren freigesetzt wird, die als Klasse der Zytokine bezeichnet werden (Kluger 1991a). Als erste pyrogene Zytokine konnten Interleukin-1 (IL-1) (Dinarello et al. 1984) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) (Beutler & Cerami 1986, Dinarello et al. 1986) identifiziert werden. Hinzu kam Interleukin-6 (IL-6) (Yasukawa et al. 1987, Van Snick 1990). Hierbei zeigte sich, daß TNF- α und IL-1 β die Synthese von IL-6 induzieren können (Benveniste et al. 1990). Durch Analyse von Push-Pull-Perfusaten konnte die Freisetzung und Kinetik von TNF α und IL-6 während der LPS-induzierten Fieberreaktion im Gehirn gezeigt werden (Roth et al. 1993).

Zum besseren Verständnis sollen die Definitionen für die Pyrogene aufgeführt werden, die von der "IUPS Thermal Commission 2001" festgelegt worden sind:

1.1.5.1 Exogene Pyrogene

Definition Exogenes Pyrogen (IUPS Thermal Commission 2001):

Bei exogenen Pyrogenen handelt es sich um Substanzen, die beim Eindringen in einen vielzelligen Organismus eine Fieberantwort induzieren können. Nicht das exogene Pyrogen selbst ist fieberauslösend, sondern die endogenen Pyrogene, deren Produktion und Freisetzung durch dessen Anwesenheit induziert wird. Die in diesem Zusammenhang bedeutendsten exogenen Pyrogene sind die von gram-negativen Bakterien stammenden Lipopolysaccharide (LPS). Diese hitzestabilen Moleküle stammen aus der Bakterienzellwand und werden auch als Endotoxine bezeichnet. Neben LPS existiert eine Reihe weiterer exogener Pyrogene von anderer molekularer Struktur.

Kapitel 1: Einleitung

Somit können auch andere Komponenten von Bakterien, Pilzen, Viren, Mykobakterien und Protozoen oder einfach Fremdproteine oder –steroide Fieber auslösen (IUPS Thermal Commission 2001).

Als exogenes Pyrogen besitzt LPS ein hohes Molekulargewicht von ca. 1000kDa. Durch verschiedene Methoden kann es aus der Membran gram-negativer Bakterien extrahiert werden (Work 1971), wobei die Methode nach Westphal & Luderitz (1954) ein besonders reines Produkt ergibt. Das so gewonnene LPS besteht aus verschiedenen Komponenten, wobei das Lipid-A (siehe Kapitel 1.4 und 2.4.1) für die pyrogenen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich ist (Luderitz et al. 1973). Die Zellwand gram-positiver Bakterien besteht aus Peptidoglykanen, deren biologisch aktive Komponente das Muramyl-dipeptid (MDP, siehe Kapitel 1.4) ist (Krueger 1990). Es besitzt eine ähnlich biologische Aktivität wie LPS, jedoch eine geringere Potenz (Zeisberger & Roth 1998). Bei den fiebererzeugenden viralen Komponenten handelt es sich um doppelsträngige Polyribonukleotide (Cooper et al. 1988).

1.1.5.2 Endogene Pyrogene

Definition Endogenes Pyrogen (IUPS Thermal Commission 2001):

Ein endogenes (körpereigenes) Pyrogen ist ein hitzelabiles körpereigenes Polypeptid (Hanson et al. 1980), das von spezifischen Zellen eines mehrzelligen Organismus produziert wird und in diesem Fieber induzieren kann. Die Produktion kann durch exogene Pyrogene und durch pathologische endogene Komponenten (Antigen-Antikörper-Komplexe) stimuliert werden. Das in diesem Zusammenhang bestuntersuchtete endogene Pyrogen ist Interleukin-1 (IL-1). Es ist ein Bestandteil der Akute-Phase-Reaktion (APR) und wird von mononukleären Phagozyten (inklusive Makrophagen) produziert und freigesetzt. Eine Vielzahl von Zellen wird als Ursprung endogener pyrogenen Substanzen erachtet, wie z.B. Microglia, Astrozyten, Tumorzellen, Langerhans-Zellen, Keratinozyten, Gingival- und Korneaepithelzellen. Neben IL-1 gelten verschiedene andere Substanzen (Tabelle 1), wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interferon (INF, IFN- α und IFN- γ) oder Interleukin-6 (IL-6) als endogene Pyrogene (IUPS Thermal Commission 2001).

Kapitel 1: Einleitung

Zur Vereinheitlichung der Wirkspektren endogener Pyrogene postulierte Kluger (1991a) fünf Kriterien, die ein endogenes Pyrogen erfüllen sollte:

Kriterium 1:

Die Applikation eines potentiellen endogenen Pyrogens an seinen vermuteten Wirkungsort resultiert in einem Anstieg der Körperkerntemperatur.

Kriterium 2:

Induziert ein exogenes Pyrogen Fieber, so steht das daraufhin freigesetzte potentielle endogene Pyrogen in einem quantitativen Zusammenhang zur Höhe des Anstiegs der Körperkerntemperatur. Die Menge des freigesetzten endogenen Pyrogens entspricht der Menge des Pyrogens, die benötigt wird, um denselben Fieberanstieg nach der Applikation an den vermuteten Wirkungsort zu erreichen.

Kriterium 3:

Der Anstieg der Körperkerntemperatur nach der Applikation eines potentiellen endogenen Pyrogens sollte auch mit einer entsprechenden thermoregulatorischen Antwort verbunden sein, wie sie bei einer Erhöhung des thermoregulatorischen Sollwertes beobachtet werden kann (Vasokonstriktion, Kältegefühl, Verhaltensänderung, gesteigerte Wärmeproduktion).

Kriterium 4:

Substanzen, die die Produktion eines potentiellen endogenen Pyrogens blockieren, sollten auch einen Anstieg der Körperkerntemperatur verhindern. Sollte die Substanz die Produktion des potentiellen endogenen Pyrogens zwar blockieren, aber die Fieberentstehung nicht ganz bzw. nur unvollständig hemmen, so kann vermutet werden, daß noch andere Pyrogene an der Fieberinduzierung beteiligt sind.

Kriterium 5:

Substanzen, die die Wirkung eines potentiellen endogenen Pyrogens blockieren, sollten auch einen Anstieg der Körperkerntemperatur verhindern. Sollte die Substanz die Wirkung des potentiellen endogenen Pyrogens zwar blockieren, aber die Fieberentstehung nicht ganz bzw. nur unvollständig hemmen, so kann vermutet werden, daß noch andere Pyrogene an der Fieberinduzierung beteiligt sind.

Bereits 1948 beschreibt Beeson erstmalig die mögliche Existenz von endogenen Pyrogenen (Beeson 1948). Er entdeckte, daß Granulozyten, die aus einem pyrogenfreien Bauchhöhlenpunktat gewonnen wurden, eine pyrogene Substanz freisetzen. Weitere

Kapitel 1: Einleitung

Studien bestätigten diese Beobachtung und zeigten, daß dieses Pyrogen hitzelabil war. Seitdem wurden Begriffe wie “Leukozyten-Pyrogen“ und “Endogenes Pyrogen“ synonym verwendet. Weitere Substanzen wurden entdeckt, die verschiedene Komponenten der Immunabwehr stimulieren können (Tabelle 1). In diesem Zusammenhang muß einer weiteren pyrogen-wirkenden Substanz, dem Interleukin-6 (IL-6) – erstmalig als Interferon- β_2 bezeichnet – eine bedeutende Rolle eingeräumt werden (Genauerer siehe Kapitel 1.3.1.3 – Interleukin-6).

Pyrogen	Funktion	Entdeckung
Leukozyten-Endogener-Mediator (LEM)	Stimulation der Akuten-Phase-Reaktion (APR)	Kampschmidt 1978
Lymphozyten-Aktivierender-Faktor (LAF)	Stimulation von T-Lymphozyten	Gery & Waksman 1972
<i>heute</i> Interleukin-1 (IL-1)	Induktion der Synthese und Freisetzung von IL-6 aus Makrophagen	Dinarello et al. 1984
Interferon-α (IFN-α) und Interferon-γ (IFN-γ)	Induktion der Synthese und Freisetzung von IL-1 aus Makrophagen	Dinarello et al. 1984, Morimoto et al. 1987
Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α)	Induktion der Synthese und Freisetzung von IL-1 aus Makrophagen	Beutler & Cerami 1986
B-Zell-stimulierender-Faktor-2 (BSF-2)	Aktivierung der APR, Differenzierungs- und Wachstumsfaktor	Hirano et al. 1985,
<i>heute</i> Interleukin-6 (IL-6)		Yasukawa et al. 1987, Van Snick 1990
Makrophagen-Inflammatorisches-Protein (MIP1)	Induktion von Fieber	Wolpe et al. 1989, Davatelis et al. 1989

Tabelle 1:
Tabellarische Übersicht pyrogen wirkender Substanzen bzw. endogener Pyrogene und einiger ihrer Funktionen.

1.2 Prinzipien der Thermoregulation

Das Prinzip der Homöostase des Organismus, d.h. das Aufrechterhalten des Gleichgewichtes lebensnotwendiger Funktionen bzw. Prozesse, beinhaltet auch die Regulation der Körpertemperatur, die Homöothermie.

Bei homöothermen Organismen wie den Säugetieren wird durch körpereigene Prozesse die Wärmeabgabe so reguliert, daß sie mit der Wärmebildung und einer möglichen Wärmeaufnahme im Gleichgewicht steht. Die Körperkerntemperatur wird dabei in einem speziesspezifischen engen Temperaturbereich (Cooper 1995) konstant gehalten, wobei tägliche sowie monatliche zyklische Schwankungen von $\pm 2^{\circ}\text{C}$ auftreten können. Poikilotherme Organismen verfügen nicht über die Möglichkeit ihre Körperkerntemperatur aktiv zu verändern. Sie halten ihre relativ stabile Körperkerntemperatur aufrecht, indem sie ihren Bedürfnissen entsprechend wärmere oder kältere Regionen aufsuchen (Definitionen siehe IUPS Thermal Commission 2001).

Die zentrale Kontrolle und Regulation der Körperkerntemperatur Körperkerntemperatur setzt drei Dinge voraus:

1. Systeme, die die Temperatur des Kerns, der Oberfläche und anderer innerer Organe erfassen,
2. Efferente Systeme, die die Wärmeproduktion und den Wärmeaustausch mit der Umwelt modifizieren können,
3. Systeme, die eine Antwort auf eine Temperaturverschiebung einleiten und darauf einwirken können.

Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur bedarf es eines übergeordneten zentralen Kontrollmechanismus, dessen Sitz im Hypothalamus vermutet wird. Hier werden alle eingehenden Informationen von kutanen, inneren und zentralen Thermosensoren erfaßt (Istwert) und mit dem Sollwert verrechnet, um bei einer Differenz efferente Regelmechanismen zu aktivieren (Abbildung 1).

Thermosensoren oder -rezeptoren sind in verschiedenen Bereichen des Organismus anzutreffen. Die Veränderungen der Körperkerntemperatur werden von zwei unterschiedlichen Rezeptortypen erfaßt. Im Körperkern dominieren die

Kapitel 1: Einleitung

Warmrezeptoren, d.h. Rezeptoren, die auf Wärme und in der Peripherie die Kaltrezeptoren, d.h. Rezeptoren, die auf Kälte reagieren. Mit steigender Temperatur nimmt die Aktivität der Warmrezeptoren zu und die der Kaltrezeptoren ab. Bei sinkender Temperatur verhält es sich genau umgekehrt. Die peripheren Thermorezeptoren stellen die "Meßfühler" dar. Zentral erfolgt die Regulation mit Hilfe von Thermosensoren des vorderen Hypothalamus (Hypothalamus anterioris) und der Präoptischen Region (Area praeoptica), die sich aus dem medialen und lateralen Anteil der Area praeoptica und dem Septum zusammensetzt.

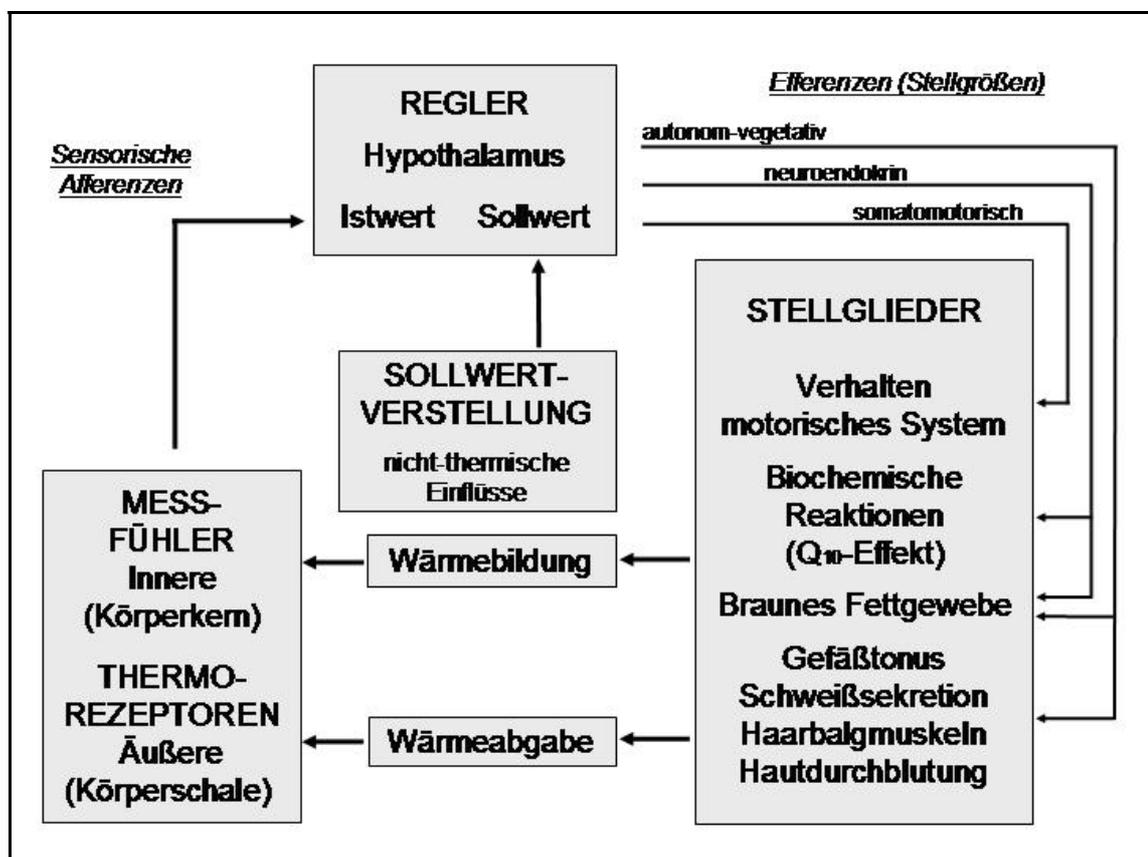


Abbildung 1:
Regelkreis der Körpertemperatur.

Prinzipiell findet man überall im Gehirn und Rückenmark thermoresponsive Neurone. Der vordere Hypothalamus und die Präoptische Region gelten als wichtigste zentrale Einheit der Temperaturregulation. Diese beiden Regionen besitzen eine hohe Dichte an thermosensitiven Neuronen und erzeugen auf lokale Temperaturveränderungen die größte thermoregulatorische Antwort. Unter normalen Bedingungen führt eine

Kapitel 1: Einleitung

Verschiebung der Körperkerntemperatur durch Hitzeeinwirkung, Kälteeinwirkung oder Muskelarbeit zu einer Aktivierung efferenter Systeme, die die Körperkerntemperatur auf ihren Ausgangswert zurücksetzen sollen. Es wird angenommen, daß eine bestimmte Temperatureinstellung oder ein sogenannter Sollwert, exakter ein Temperaturbereich vorgegeben ist, der unter allen Umständen durch spezielle zentralnervöse Mechanismen aufrechterhalten werden soll.

Studien mit Hilfe von Thermoelektroden zeigten, daß Regionen im vorderen Hypothalamus und der Präoptischen Region auf Erwärmung oder Kühlung unterschiedlich reagieren (Magoun et al. 1938, Hammel et al. 1960, Andersson & Larsson 1961, Ingram et al. 1963, Bligh 1972). In weiteren Studien wurden drei Arten zufällig verteilter hypothalamischer Neuronenpopulationen entdeckt (Eisenman 1972, Hellon 1972), wovon 60% thermoinsensitiv, 30% warmsensitiv und 10% kaltsensitiv sind. Diese kontrollieren wiederum getrennte Effektorneurone (Boulant 1991) und vermitteln über diese verschiedene thermoregulatorische Reaktionen. In diesen neuronalen Gebieten konvergieren die afferenten Temperatursignale aus verschiedenen Teilen des Körperkerns und auch des Hypothalamus. Der antagonistische synaptische Einfluß der warmsensitiven und der kaltsensitiven Neurone auf die Effektorneurone könnte die zelluläre Basis der Kontrolle der Körperkerntemperatur oder des Sollwertes darstellen. Ist der synaptische Input sowohl der warmsensitiven als auch der kaltsensitiven Neurone betragsmäßig gleich bzw. ausgeglichen, unterbleibt eine Aktivierung ihrer jeweiligen Effektorneurone. Die Aktivierung warmsensitiver Neurone des Hypothalamus infolge eines Temperaturanstiegs fördert durch Steigerung der Impulsrate die Wärmeabgabe und hemmt die Wärmeproduktion. Da die Impulsrate kaltsensitiver Neurone nicht beeinflußt wird, ist der Input nicht mehr deckungsgleich, so daß durch die entstehende Differenz die für die Wärmeabgabe verantwortlichen Effektorneurone aktiviert werden. Dadurch kommt es neben einem Abfall der Körperkerntemperatur auch zu einem Abfall der Impulsrate warmsensitiver Neurone. Deren Input sinkt so lange, bis dieser wieder dem Input kaltsensitiver Neurone entspricht. Ein umgekehrtes Schema gilt für die wärmebildenden Effektorneurone. Durch die reziproke Verschaltung der Warm- und Kaltrezeptoren wird die Hemmung der jeweils nicht stimulierten Neurone unterstützt (stark vereinfachtes Modell nach Hammel et al. 1963 & 1965).

Kapitel 1: Einleitung

Durch Stimulation der Warmrezeptoren werden die wärmeabgebenden Effektoren aktiviert und gleichzeitig über Zwischenneurone die wärmebildenden Effektoren gehemmt.

1.3 Fieber, Teil der Akuten-Phase-Reaktion (APR): Stand der Forschung

Fieber ist ein Bestandteil des komplexen Abwehrmechanismus des Wirtsorganismus gegen eingedrungene Mikroorganismen, deren Komponenten oder gegen als körperfremd erkannte Molekülstrukturen (Fremdeiweiße). Die Immunantwort des Organismus ist unter anderem abhängig von der Art und Konzentration des Pathogens und ob ein früherer Kontakt bestanden hat. Sie kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der ersten oder frühen Phase werden die Mikroorganismen in ihrer Vermehrung gehemmt oder ganz gestoppt. In der darauffolgenden zweiten Phase werden die Mikroorganismen von spezifischen Antikörpern markiert und anschließend von spezifischen Abwehrzellen zerstört. In der frühen Phase läuft eine Vielzahl komplexer systemischer Reaktionen ab, die als APR zusammengefaßt werden. Die APR wird unter anderem durch eine Vielzahl von sogenannten Zytokinen (siehe Kapitel 1.5) initiiert und gesteuert. Zusammengefaßt ist die APR die Antwort des Organismus auf Schwankungen der Körperhomöostase, Gewebeschädigungen, neoplastisches Wachstum und auf ein immunologisches Ungleichgewicht. Sie besitzt dem Organismus gegenüber positive Eigenschaften, weil sie die aus dem Gleichgewicht geratene physiologische Homöostase wiederherstellt. In der Frühphase der APR wird in der Leber die Synthese von speziesspezifischen Akute-Phase-Proteinen (APP) induziert, die eine Gruppe von 30 verschiedenen Proteinen umfaßt. Diese Proteine fungieren unter anderem als Mediatoren. Dadurch sind sie an verschiedensten Reaktionen und der Vermittlung unterschiedlicher Prozesse, wie z.B. der Regulation der Immunantwort und der Stimulation oder Hemmung von Entzündungsprozessen beteiligt (Zur Übersicht: Kushner 1982, Heinrich et al. 1990). Weiterhin werden verschiedene Zelltypen aktiviert, die wiederum Botenstoffe, wie z.B. die inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und Interferon freisetzen. Die APR beeinflusst dadurch eine Reihe von Körperfunktionen, wie z.B. das endokrine System, die Nahrungsaufnahme, das Schlafbedürfnis und die Thermoregulation. Die Fieberreaktion ist somit ein wichtiges

Kapitel 1: Einleitung

Element aus einem Repertoire von Abwehrstrategien des Organismus gegen eingedrungene Mikroorganismen oder körperfremde Eiweiße. Die immunologischen Folgen bei einer Temperaturerhöhung (Roberts 1991) sind eine gesteigerte Immunabwehr, eine verstärkte Antigenerkennung, eine erhöhte Mobilität und Aktivität der Leukozyten mit vermehrter Phagozytose und Produktion von Zytokinen. Die Freisetzung eisenbindender Eiweiße (Weinberg 1984) führt zur Verminderung der Eisenkonzentration im Plasma. Dies, zusammen mit einer erhöhten Körperkerntemperatur, ist die Ursache für eine Reduktion des eisenabhängigen Bakterienwachstums, da viele Bakterien auf Grund der fieberhaften Temperatur selbst nur wenig Chelate zur Eisenbindung bilden können (Kluger 1991a). Darüber hinaus hemmt eine erhöhte Körpertemperatur die bakterielle LPS-Synthese, so daß das LPS zum Aufbau der Bakterienzellwand fehlt. Dadurch wird es dem Serum-Komplement-System ermöglicht, die Bakterien leichter zu perforieren und abzutöten und zwar noch bevor die Antikörperproduktion des Organismus aktiviert wird (Green & Vermeulen 1994). Weiterhin sind direkte Effekte physiologischer Temperaturveränderungen auf pathogene Mechanismen bekannt (Mackowiak 1991).

1.4 Lipopolysaccharid (LPS) – ein exogenes Pyrogen

1.4.1 Struktur von LPS

Bakterien sind von einer Hülle umgeben, die ihnen ihre Form und Integrität verleiht. Diese Hülle ist jedoch nicht bei allen Bakterienarten identisch. Mittels der Färbemethode nach Gram können gram-positive (z.B. *Staphylococcus aureus*, Abbildung 2) und gram-negative (z.B. *Escherichia coli*, Abbildung 2) Bakterien unterschieden werden. Die Membran gram-positiver Bakterien besteht aus einer "inneren Membran", dem Mureingerüst, bzw. dem Peptidoglykan (zu 90%) und einer Schleimkapsel (Abbildung 2). Die Membran gram-negativer Bakterien besteht ebenfalls aus einer "inneren Membran", dem periplasmatischen Raum, dem Mureingerüst (zu 20%), einer "äußeren organischen Membran" (Rietschel et al. 1994) und einer Schleimkapsel (Abbildung 2).

Die äußere organische Membran gram-negativer Bakterien enthält neben Phospholipiden (PL) und Phospholipoproteinen (PLP) die Lipopolysaccharide (LPS).

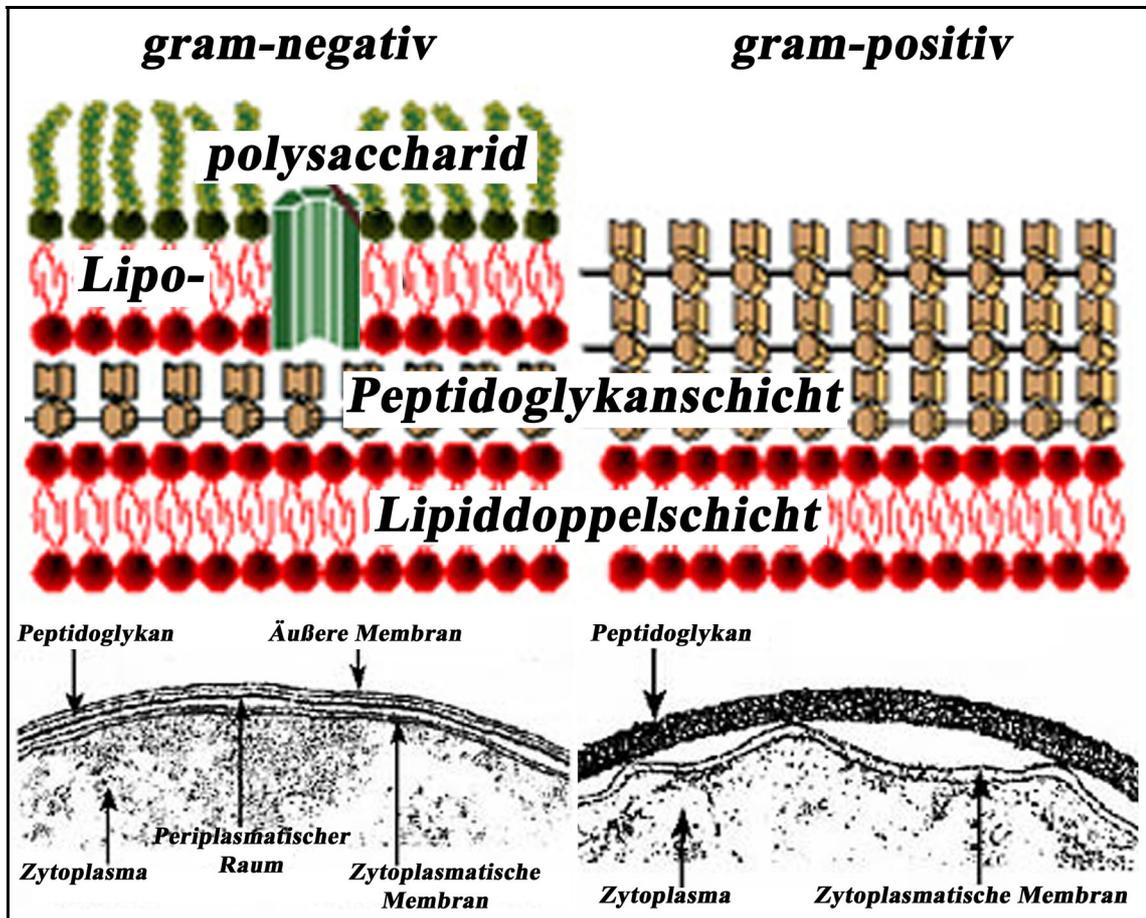


Abbildung 2: Schematischer Aufbau (oben) und elektronenmikroskopischer Ausschnitt der Bakterienmembran von gram-negativen Bakterien (links) und gram-positiven (rechts). Während die Membran bei gram-positiven von innen nach außen aus einer Lipiddoppelschicht und einer Peptidoglykanschicht aufgebaut ist, folgt bei gram-negativen Bakterien auf diese Peptidoglykanschicht eine zweite Lipiddoppelschicht mit ein- bzw. aufgelagerten Lipopolysacchariden.

LPS ist mit 75% der größte Bestandteil dieser Membran und besteht aus zwei unterschiedlichen Strukturen. Zum einen aus einem hydrophilen Kohlenhydratanteil, dem Polysaccharid, zum anderen aus einem hydrophoben Lipidanteil, dem Lipid A (Rietschel et al. 1994, Freudenberg & Galanos 1990). Das Lipid-A (Kapitel 2.4.1, Abbildung 11) ist der biologisch aktive Teil des LPS. Dieses Phosphoglykopeptid ist kovalent an das Polysaccharid gebunden und vermittelt neben den PL und PLP die Verankerung des gesamten LPS-Moleküls mit der Peptidoglykanschicht.

Kapitel 1: Einleitung

An das Lipid A ist nach außen das Kernoligosaccharid kovalent gebunden. Diesem wiederum aufgelagert ist das "O-spezifische Polysaccharid", auch "O-Antigen" genannt. Letzteres bedeutet „ohne Hauch“, was ein Unterscheidungskriterium für das Wachstum von Bakterienkolonien darstellt. Im Gegensatz dazu gibt es Bakterien, die einen feinen grauen Film bzw. „Hauch“ um ihre Kolonien bilden. Diese sind immer begeißelt, so daß Geißelantigene als „H-Antigene“ und Zellwandantigene als „O-Antigene“ bezeichnet werden. Dieses „O-Antigen“, besser „O-spezifisches Polysaccharid“, ist aus sich wiederholenden Oligosaccharidabschnitten zusammengesetzt, die in Anzahl und Struktur variieren und somit auf Grund ihrer Variabilität für die Antigenität des jeweiligen Bakteriums bzw. der jeweiligen LPS-Struktur verantwortlich sind. Durch die variierende Antigenität können die verschiedenen Bakterienstämme klassifiziert werden.

1.4.2 LPS-induzierte pathophysiologische Vorgänge

LPS wird auch oft als Endotoxin bezeichnet. Dies beruht auf der damaligen Vermutung, daß Toxine ausschließlich bei bakteriellem Zerfall freigesetzt werden. LPS kann aber ebenso von intakten Bakterien abgegeben werden und damit dosisabhängig seine pathophysiologischen Effekte im Wirtsorganismus (Tabelle 2) entfalten.

Aktivierung des Immunsystems
Aktivierung von Makrophagen
Freisetzung endogener Mediatoren (Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-1 β und IL-6)
Induktion der Synthese von Akute-Phase-Proteinen
Komplementaktivierung
Induktion von Fieber
Beeinflussung der Blutgerinnung
Septikämie
Tödlicher Schock

Tabelle 2:
Übersicht über einige biologische Eigenschaften von LPS und freiem Lipid A (modifiziert nach Freudenberg & Galanos 1990).

Kapitel 1: Einleitung

Diese werden durch das Lipid A, dem biologisch aktiven Teil des LPS-Moleküls, vermittelt (Zähringer et al. 1994).

LPS gilt unter anderem als exogenes Pyrogen, d.h. fieberauslösender Faktor (Tabelle 2). Diese Effekte werden jedoch nicht direkt durch LPS hervorgerufen, sondern über Mediatoren wie die Zytokine (Raetz et al. 1991), z.B. TNF- α , IL-1 β und IL-6, vermittelt. Dabei wird vermutet, daß die hydrophobe Fettsäurenregion des Lipid A bei der Zytokininduktion und Zellaktivierung eine Rolle spielt (Rietschel et al. 1993). Makrophagen, Monozyten, Granulozyten sowie Endothel- und Epithelzellen können auf die LPS-Komponente Lipid A reagieren (Ulevitch & Tobias 1994).

Ist LPS im Kreislauf anwesend, kann es auf verschiedene Weise gebunden werden. Die Bindung an High-Density-Lipoproteins (HDL) führt zur Neutralisation von LPS (Freundenberg & Galanos 1990). Dadurch wird bis zu dessen Metabolisierung durch Hepatozyten und Makrophagen von Leber, Milz und Nebennieren eine Bindung an andere Zellen des Körpers und entsprechende Reaktionen verhindert. Die Ausscheidung der LPS-Abbauprodukte erfolgt über die Galle und zum kleinen Teil auch über den Urin. Erfolgt die Bindung jedoch an ein spezifisch LPS-bindendes Glykoprotein (LBP), kann es zur Zellaktivierung kommen und die Endotoxinkaskade aktiviert werden. LBP ist ein Glykoprotein von 60kDa, das von Hepatozyten gebildet wird und zu den Akute-Phase-Proteinen gezählt wird (Tobias et al. 1986, Roth 1996). Das LBP bindet mit einer hohen Affinität die Lipid A Region (Tobias et al. 1989). Dieser LBP-LPS-Komplex kann wiederum hoch affin an das CD14 Oberflächenantigen (mCD14) von Monozyten und Makrophagen oder an einen im Plasma gelösten Rezeptor (sCD14) binden. Dieser LPS-LBP-CD14-Komplex aktiviert über ein transmembranär verankertes, noch nicht näher identifiziertes Signaltransduktionsmolekül, Proteinkinasen und Phosphorylierungen. Diese führen zur Transkription und Translation sowie Freisetzung verschiedenster Mediatoren (Tobias et al. 1993, Pugin et al. 1993, Ulevitch & Tobias 1994), zu denen unter anderem IL-1 β , TNF- α und IL-6 (Roth 1998) gehören. Auch Zelltypen, die keinen CD14 Rezeptor (CD14R) besitzen, reagieren auf LPS Stimulation. Es wird vermutet, daß LPS auch alleine eine Aktivierung über LPS-Rezeptoren der Zelle hervorrufen kann (Rietschel et al. 1994) oder daß noch andere Rezeptoren (z.B. "Toll-like receptors" wie TLR-2) die Wirkung von LPS vermitteln können, die von nicht so großer Bedeutung wie der CD14R sind (Chaby & Girard 1993).

1.5 Interleukin-6 (IL-6) und das Netzwerk der Zytokine

Das "Orchester" der Immunantwort auf mikrobielle Infektionen, Fremdkörper und Gewebsverletzungen wird von einem komplexen Netzwerk endogener Mediatoren (Beutler 1989, Beutler & Cerami 1989, Old 1987) dirigiert. Sie stellen eine Klasse hormonähnlicher, löslicher Faktoren, "Zytokine" genannt (Cohen et al. 1974) dar, die sich in folgende Untergruppen gliedern lassen (Tabellarische Übersicht siehe auch Liles & van Voorhis 1995):

Interleukine

Interferone

Zytotoxine

Koloniestimulierende Faktoren (CSF) sowie

Wachstumsfaktoren

Lymphokine und Monokine.

Sie koordinieren als extrazelluläre Signalmoleküle neben der Entzündungsreaktion und Immunantwort der einzelnen Zellen weitere Effekte in Hinblick auf Wachstum, Regeneration und Differenzierung. Sie werden vor allem in Leukozyten, aber auch in anderen Körperzellen, wie z.B. Endothelzellen, synthetisiert. Entsprechend ihres Produktionsortes kann man ebenfalls eine Differenzierung vornehmen. So werden z.B. Lymphokine von Lymphozyten und Monokine von Monozyten gebildet. Außer dieser Charakterisierung läßt sich derzeit eine allgemeingültige Definition des breiten biologischen Spektrums der Moleküle nicht ableiten (Vilcék & Le 1994). Zytokine sind wichtige Vermittler zwischen den immunen, nervalen und endokrinen Systemen. Ihrer Struktur nach Polypeptide oder auch Glykoproteine, entfalten sie ihre Wirkung ähnlich den Hormonen nur über spezifische Rezeptoren in äußerst geringen, aber äußerst wirksamen Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-15} Mol. Sie besitzen Unterschiede in Bezug auf ihre Produktionsquelle, ihres Wirkspektrums, ihrer Zielzellen und ihre Reichweite (Tabelle 3).

Die Zytokine, insbesondere IL-6, induzieren ein weites Spektrum von Aktivitäten an einer Vielzahl von Zelltypen "in vitro". Sie überschneiden sich "in vivo" in Bezug auf ihre biologischen Effekte, so daß sie allein aus diesem Grund nicht immer unterschieden werden können.

	Zytokine	Hormone
Produzierende Zellen	mehrere, verschiedene Zelltypen	ein spezialisierter Zelltyp
Wirkungsspektrum	redundant	einzigartig, charakteristisch
Zielzellen	verschiedene Zellen mit entsprechend mannigfaltiger Wirkung (Ambiguität)	spezifische Zellen mit einem entsprechend limitierten Wirkspektrum
Reichweite	lokal, autokrin oder parakrin systemisch, endokrin	systemisch, endokrin

Tabelle 3:
Unterschiede zwischen Zytokinen und Hormonen

Diese offensichtliche Redundanz (Tabelle 4) ist verwirrend, denn Zytokine sind an sich strukturell sehr verschieden und agieren an nicht miteinander verwandten Zellmembranrezeptoren.

Ambiguität	Ein Zytokin kann an mehreren Zielzellen mehrfache Wirkungen entfalten.
Redundanz	Strukturell verschiedene Zytokine können gleiche, sich überlappende Wirkungen besitzen.
Synergismus bzw. Antagonismus	Die Exposition von Zellen gegenüber zwei oder mehreren Zytokinen zur selben Zeit kann zu qualitativ verschiedenen Reaktionen führen.
Zytokinkaskade	Ein Zytokin kann die Produktion eines anderen Zytokins steigern oder vermindern.
Rezeptormodulation	Ein Zytokin kann die Rezeptorexpression eines anderen Zytokins steigern oder vermindern.

Tabelle 4:
Zytokinspezifische Eigenschaften.

Kapitel 1: Einleitung

Andererseits gibt es das Beispiel der IL-6-Zytokinfamilie. Nicht nur deren Mitglieder, sondern auch deren Rezeptoren besitzen eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit (siehe Kapitel 1.6.1). Auch bedienen sie sich teilweise eines gemeinsamen Rezeptors, um über diesen ihre Effekte an eine Vielzahl von Zellen und Geweben zu vermitteln (Cosman 1993, Kishimoto et al. 1994). In diesem Fall wäre die Redundanz eine erklärbare Folgeerscheinung.

Welche Zytokine und weitere Mediatoren im Verlauf nicht-spezifischer oder immunvermittelter Ereignisse produziert werden, wie sie sich durch gegenseitige Konkurrenz, Interaktion und Induktion innerhalb einer Serie von Kaskaden und Regelkreisen mit positiver und negativer Rückkopplung regulieren, oder kurz, welcher biologische Nettoeffekt sich letztlich einstellt, ist abhängig von dem jeweils herrschenden "Zytokin-Milieu". Daher ist es im Allgemeinen sehr schwer vorherzusagen, wie einzigartig und essentiell einzelne Zytokine im intakten Organismus agieren (Vilcék & Le 1994).

1.6 Eigenschaften von IL-6

Das Zytokin IL-6, als Produkt von Blutmonozyten isoliert, war ursprünglich als "B-Zell-stimulierender-Faktor-2" bekannt (BSF-2) (Hirano et al. 1985). Durch molekulares Klonieren stellte sich heraus, daß BSF-2 mit dem Hepatozyten-Stimulierenden-Faktor (HSF), dem Hybridom- (Plastizytom) Wachstumsfaktor (HGF) und dem β_2 -Interferon (IFN- β_2) identisch ist (Yasukawa et al. 1987, Van Snick 1990).

Interleukin-6 ist ein lösliches Glykoprotein mit 184 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 23kDa in seiner nicht-glykolysierten bzw. 26kDa in seiner glykolysierten Form. Es wird aus einem Vorläufermolekül mit 212kDa gebildet und freigesetzt (Hirano et al. 1989). Ein wichtiges Merkmal dieses Zytokins ist seine Pluripotenz, d.h. seine Beteiligung an verschiedensten biologischen Prozessen. Es ist sowohl unter physiologischen Bedingungen und im intakten Nervensystem als auch unter pathologischen Gegebenheiten, wie Infektion, Entzündung oder zentraler Dysfunktion anwesend, um als Vermittler tätig zu werden.

Im Zusammenhang mit der APR wurde 1987 IL-6 als wichtigster Mediator der peripheren Immunantwort "in vitro" (Gauldie et al. 1987, Andus et al. 1987 & 1988,

Kapitel 1: Einleitung

Castell et al. 1988 & 1990) und “in vivo“ identifiziert (Geiger et al. 1988). IL-6 ist als proinflammatorisches Zytokin in die Aktivierung und Koordination verschiedener Elemente der APR involviert. Darüber hinaus spielt es eine große Rolle als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor im Blutbildungs- und Nervensystem (Kishimoto 1989, Richards & Gauldie 1994, Heinrich et al. 1998). In Immunzellen induziert IL-6 die Produktion von Immunglobulinen (Akira et al. 1990, Tanner & Tesato 1992). Auf Grund dieser vorgenannten Funktionen werden IL-6 und weitere Mitglieder der IL-6-Familie als neuropoetische bzw. hämatopoetische Zytokine bezeichnet (Bazan 1991, Fann & Patterson 1994).

IL-6 wird von verschiedenen Zelltypen peripher sowie im Zentralnervensystem (ZNS) (siehe Kapitel 1.6.2) synthetisiert. Im letzteren Fall ist es an einer Vielzahl zentralnervöser Funktionen, wie z.B. der Signalvermittlung zwischen Zellen, der Koordination neuroimmuner Antworten, beim Schutz von Neuronen, bei der neuronalen Differenzierung, dem neuronalen Wachstum und Überleben beteiligt. IL-6 spielt ebenfalls eine Rolle in Bezug auf neuropathologische Dysfunktionen. Bei den verschiedensten neurologischen Erkrankungen (wie z.B. Multiple Sklerose, Lupus erythematoses, bakterielle und virale Meningitis oder Alzheimer) wurden erhöhte IL-6 Konzentrationen in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF “Cerebrospinal Fluid“) gefunden. Eine chronische Überproduktion von IL-6, wie z.B. in transgenen Mäusen, resultiert in signifikant neuropathologischen Veränderungen des ZNS, die sich durch verschiedene neurologische Erkrankungen bemerkbar machen (Schindler & Darnell Jr. 1995, Gruol & Nelson 1997).

Im Folgenden soll eine ausführliche Beschreibung von IL-6 als endogenes Pyrogen in der Fiebermediation erfolgen, da sich die vorliegende Arbeit explizit damit beschäftigt.

1.6.1 IL-6 als endogenes Pyrogen in der Fieberentstehung

Infektionen oder Entzündungen in der Körperperipherie gehen mit charakteristischen zentral vermittelten Krankheitserscheinungen einher. Dazu gehören Fieber (Kluger 1991a, Lee et al. 1998), die Aktivierung der HPA-Achse (Besedovsky et al. 1995, Dunn & Wang 1995, Turnbull & Rivier 1999), Appetitverlust und eine Reihe von Verhaltensänderungen, die insgesamt als gestörtes Allgemeinbefinden bezeichnet werden (Dantzer 1998).

Kapitel 1: Einleitung

Im Zusammenhang mit diesen zentral kontrollierten Funktionen besitzt neben $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ vor allem IL-6 in der Fieberentstehung eine bedeutende Rolle. Ein kurzer Überblick soll die allgemein vertretene Hypothese der Fieberentstehung veranschaulichen (Abbildung 3).

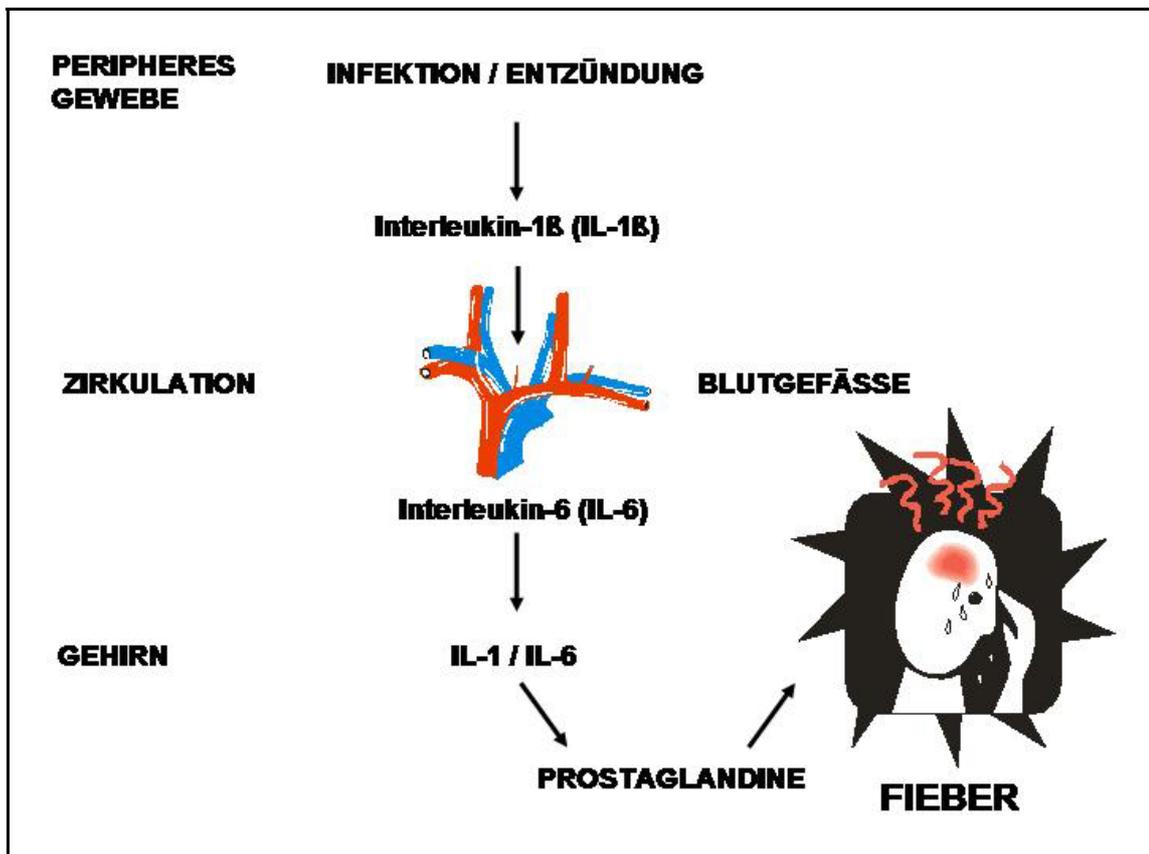


Abbildung 3:
Schematische Darstellung der allgemein vertretenen Hypothese zur Fieberentstehung (Erläuterungen im Text).

Ein entzündlicher oder infektiöser Stimulus in der Peripherie, z.B. vermittelt durch das exogene Pyrogen LPS, induziert in mononukleären Zellen wie Makrophagen und Monozyten die Synthese und Freisetzung verschiedener Zytokine, wie z.B. $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, die im weiteren Verlauf unter anderem in die Blutbahn gelangen. Diese beiden Zytokine induzieren ihrerseits in Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen die Synthese und Freisetzung von IL-6 , das anschließend in der Blutbahn zirkuliert. Durch die Zirkulation gelangen die Zytokine zum Gehirn, wo sie die zentrale Synthese von Prostaglandinen induzieren.

Kapitel 1: Einleitung

Die Prostaglandine bewirken nun die Verstellung des Temperatur-Sollwertes, was in einer Fieberreaktion resultiert. Das Auftreten von Fieber als allgemeine Begleiterscheinung während infektiöser und entzündlicher Prozesse geht mit einer erhöhten Plasmakonzentration von IL-6 einher (Luheshi & Rothwell 1996). Die systemische Applikation von LPS induziert neben einer Fieberantwort auch eine Erhöhung der IL-6 Konzentration im Blutplasma (LeMay et al. 1990a & 1990b, Roth et al. 1993) und im ZNS (LeMay et al. 1990, Klir et al. 1993, Roth et al. 1993), wobei die Höhe der Fieberantwort und die Höhe der IL-6 Konzentration im Blutplasma (Hopkins & Rothwell 1995, Luheshi & Rothwell 1996) und im ZNS (LeMay et al. 1990, Roth et al. 1993) miteinander korrelieren. Die systemische (Blatteis et al. 1990, Dinarello et al. 1991, Rothwell et al. 1991), die intrazerebroventrikuläre (Opp et al. 1989, Rothwell et al. 1991, Dinarello et al. 1991, Strijbos et al. 1992, Roth et al. 1993) oder die direkte Infusion von IL-6 in die präoptische Region des Hypothalamus (Blatteis et al. 1990, Lesnikov et al. 1991) induziert ebenfalls eine Fieberantwort in einer Vielzahl von Tiermodellen. Die zentrale Applikation eines IL-6-Antikörpers verhindert eine Fieberantwort nach systemischer Applikation von LPS oder IL-1 (Rothwell et al. 1991). Sowohl LPS induziertes Fieber als auch die Erhöhung der IL-6 Konzentrationen im ZNS (Hypothalamus) kann durch den Einsatz eines IL-1 β Antikörpers oder eines IL-1 β Rezeptorantagonisten (IL-1ra) inhibiert werden, so daß IL-1 β ebenfalls für die IL-6-vermittelte Fieberentstehung von Bedeutung ist (LeMay et al. 1990a & 1990b, Klir et al. 1994, Luheshi et al. 1996).

Eine weitere wichtige Möglichkeit, um die Rolle von IL-6 in der Fiebermediation zu ermitteln, ist die Verwendung transgener IL-6-defizienter Mäuse. Diese IL-6-defizienten Mäuse sind nicht in der Lage, auf die systemische Gabe von LPS sowie periphere oder zentrale Applikation von IL-1 β Fieber zu erzeugen (Chai et al. 1996). Die zentrale Applikation von IL-6 jedoch induziert in diesen Mäusen eine Fieberantwort, so daß die Fieberinduktion in diesem Fall abhängig von der Vermittlung durch IL-6 ist (Chai et al. 1996).

Eine weitere Hypothese im Zusammenhang mit der Fiebermediation ist die Möglichkeit, daß IL-6 direkt eine Fieberantwort erzeugen kann. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, daß IL-6 die Aktivität thermosensitiver Neurone in der präoptischen Region des Hypothalamus verändern kann. Dabei hemmt IL-6 die spontane Entladungsrate warmsensitiver Neurone (Neurone, die auf eine erhöhte Körpertemperatur mit einer erhöhten Entladungsrate reagieren) und steigert die

Kapitel 1: Einleitung

spontane Feuerungsrate kaltsensitiver Neurone (Neurone, die auf eine verminderte Körpertemperatur mit einer erhöhten Entladungsrate reagieren) (Xin & Blatteis 1992).

1.6.2 Vorkommen der IL-6-Synthese im ZNS

Unter normalen physiologischen Bedingungen sind nur geringe oder keine IL-6-Konzentrationen im ZNS nachweisbar, die jedoch unmittelbar bei Verletzungen, Entzündungen oder ZNS Erkrankungen ansteigen (Minami et al. 1991).

Unter pathologischen Bedingungen stellen die Astrozyten die größte IL-6-Quelle dar. Sie vertreten den häufigsten Zelltyp im ZNS und unterstützen die Neurone strukturell und funktional (Eddleston & Mucke 1993). Unter physiologischen Bedingungen ist IL-6 in Astrozyten kaum nachzuweisen. Die Stimulation mit anderen Zytokinen oder Neurotransmittern lassen die IL-6-Konzentration in Astrozyten stark ansteigen. Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) sind die wichtigsten und potentesten Zytokine, um die Synthese von IL-6 in Astrozyten zu induzieren (Benveniste et al. 1990, Wesselingh et al. 1990, Sawada et al. 1992, Lee et al. 1993, Norris et al. 1994). Diese beiden Zytokine besitzen darüber hinaus einen synergistischen bzw. additiven Effekt bezüglich der Stimulation der IL-6-Synthese (Benveniste et al. 1990). Auch Neurotransmitter besitzen die Fähigkeit, in Astrozyten die IL-6-Synthese zu induzieren (Zur Übersicht siehe Gadiant & Otten 1997, Gruol & Nelson 1997), wobei die Regulation der IL-6-Synthese in Astrozyten durch Neurotransmitter und Zytokine möglicherweise die Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten reflektiert. Bakteriellendes Endotoxin bzw. LPS wird benutzt, um experimentell zelluläre Veränderungen zu induzieren, die während einer normalen Infektion oder Entzündung auftreten. LPS steigert dabei die IL-6-Synthese in Astrozyten, so daß die Rolle der Astrozyten für die IL-6-Synthese unter pathologischen Bedingungen bestätigt werden kann (Benveniste et al. 1990, Wesselingh et al. 1990, Sawada et al. 1992, Lee et al. 1993). Mikrogliale Zellen im ZNS sind eine weitere wichtige Produktionsquelle inflammatorischer Zytokine wie IL-6. Sie werden als ortsständige Gehirnmakrophagen angesehen, die in der frühen embryonalen Entwicklung aus dem Knochenmark in das ZNS einwandern (Hickey & Kimura 1988, Thomas 1992, Perry et al. 1993, Gehrman et al. 1995) und eine regulatorische Funktion im ZNS ausüben (Giulian & Baker 1986, Giulian 1987). Die in den mikroglialen Zellen unter basalen Bedingungen geringe IL-6-

Kapitel 1: Einleitung

Konzentration wird durch verschiedene Faktoren stark erhöht. LPS ist einer der stärksten Stimuli, um die IL-6-Synthese zu induzieren. Ein weiterer Ort der IL-6-Synthese im ZNS während entzündlicher und infektiöser Prozesse sind die Endothelzellen des Gefäßsystems (Fabry et al. 1993) und der Bluthirnschranke (Rott et al. 1993) sowie die mononukleären Blutzellen (T-Helferzellen und Makrophagen). Letztere gelten unter inflammatorischen Bedingungen als Hauptquelle der IL-6-Synthese (Benveniste 1992). Neurone sind ebenfalls zur IL-6-Synthese fähig, die in erster Linie durch die Zytokine IL-1 β und TNF- α induziert wird. Die simultane Applikation beider Zytokine verstärkt diesen Effekt (Ringheim et al. 1995).

1.6.3 IL-6 und die Signaltransduktion

1.6.3.1 Die Zytokinrezeptoren

Rezeptoren, die Zytokine binden, umfassen eine große heterogene Familie, die in zwei Gruppen unterteilt werden kann (Bazan 1989 & 1990a, Miyajima 1992, Cosman 1993). Mitglieder der IL-6-Familie gehören neben vielen anderen Zytokinen (Schindler & Darnell Jr. 1995, Hibi et al. 1996) zu einer "Zytokin-Rezeptor-Superfamilie" (Bazan 1989, Pennica et al. 1995), die sich an Zytokinrezeptoren der Klasse 1 binden (Bazan 1990a & 1990b, Sprang & Bazan 1993). Die Besonderheit dieser Rezeptoren liegt darin, daß ihre zytokinbindende Domäne eine konservierte Zysteinstruktur (bestehend aus vier konservierten Zysteinen und einem Tryptophan) und eine proximale Membranstruktur "WSXWS" (Tryptophan-Serin-Xxx-Tryptophan-Serin) besitzt (Abbildung 4).

Die Mehrheit der Zytokinrezeptoren setzt sich aus einer ligandenbindenden und einer signalvermittelnden Einheit zusammen. Dabei besitzen Zytokine mit überlappender Funktion eine individuelle ligandenbindende und eine gemeinsame signalvermittelnde Einheit (Stahl & Yancopoulos 1993).

1.6.3.2 Die "Familie" der Interleukin-6-Rezeptoren (IL-6R)

Der IL-6R gehört zu einer Rezeptorfamilie, die sich alle die Glycoprotein 130- (gp130-) Rezeptoruntereinheit teilen (Abbildung 4). Zu dieser Zytokinfamilie gehören neben

IL-6 auch der “*ciliary neurotrophic factor*“ (CNTF), der “*leukemia inhibitory factor*“ (LIF), “*oncostatin M*“ (OSM), “*cardiotrophin-1*“ (CT-1) und Interleukin-11 (IL-11) (Kishimoto et al. 1995, Taga & Kishimoto 1997).

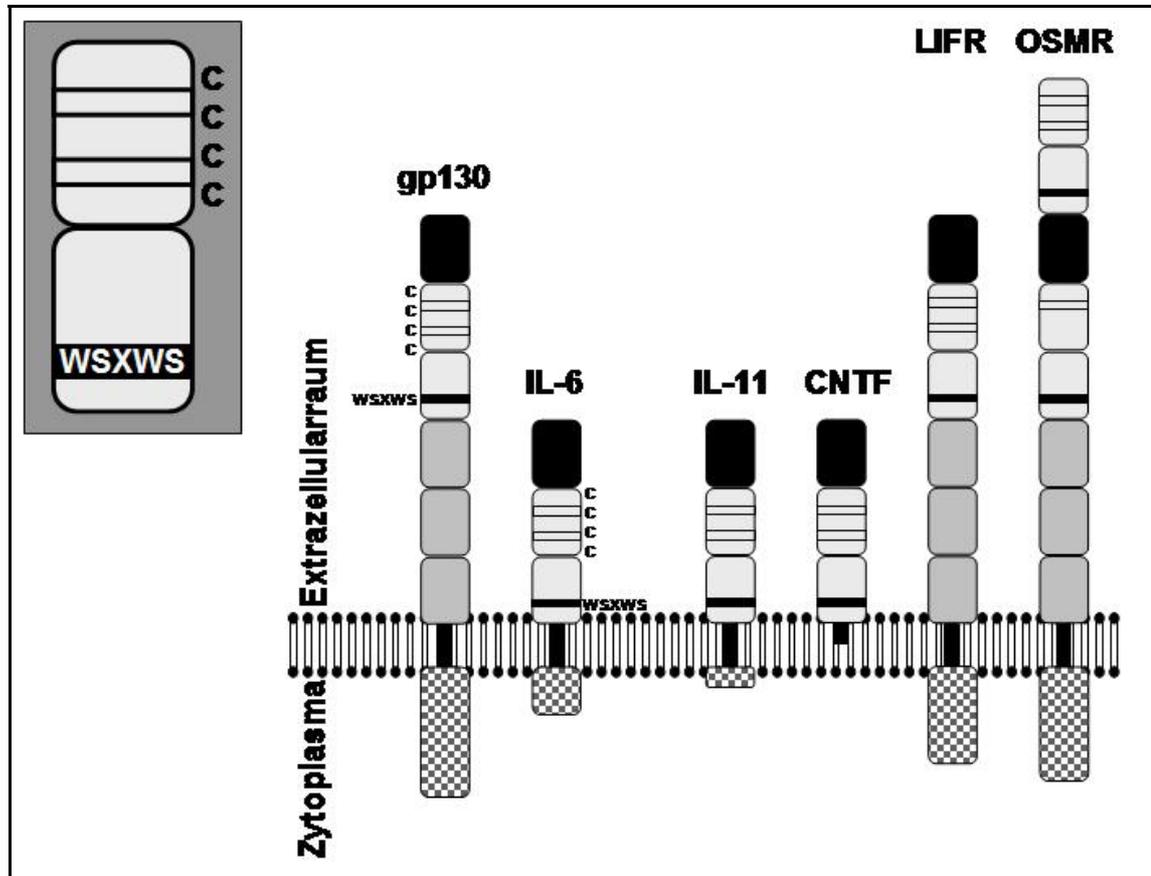


Abbildung 4:
Schematische Darstellung der Rezeptorstrukturen der Mitglieder der IL-6-Rezeptorfamilie. Sie gehören zur Klasse 1 der Zytokinrezeptoren und besitzen eine konservierte Domäne (hellgrau, Inset) aus ca. 200 Aminosäuren (AS). Charakteristisch für diese Rezeptorfamilie sind vier konservierte Zysteine (C, vier schmale Querbalken) und eine “*Tryptophan-Serin* – nicht konservierte AS – *Tryptophan-Serin*“ Sequenz (WSXWS, dicker Querbalken), die sich in der konservierten Domäne aller Mitglieder befinden.

Die Homologie ihrer Aminosäuresequenzen ist mit maximal 30% relativ niedrig. Ihre gemeinsame Tertiärstruktur zeichnet sich durch vier antiparallele α -Helices aus, wodurch ihnen ein ähnliches dreidimensionales Aussehen verliehen wird. Diese Struktur ist auch für andere Zytokine, wie z.B. IL-2, IL-4, “*granulocyte*“ und “*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*“ (G-CSF und GM-CSF), charakteristisch (Bazan 1990a & 1990b, Taga & Kishimoto 1992, Sprang & Bazan

1993). Deshalb werden die Mitglieder der IL-6-Familie (IL-6, IL-11, LIF, CNTF, OSM und CT-1) in erster Linie nicht wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit, sondern wegen ihres gemeinsamen Gebrauches der zur Signaltransduktion benötigten Rezeptoruntereinheit gp130 zusammengefaßt (Kishimoto et al. 1995).

Abbildung 5 beschreibt den Prototyp des IL-6-Rezeptors (IL-6R). Dieser besteht aus zwei Untereinheiten, einer 80kDa großen IL-6-bindenden α -Untereinheit (IL-6R α , gp80, CD126) und einer signalvermittelnden 130kDa großen β -Untereinheit (IL-6R β , gp130, CD130).

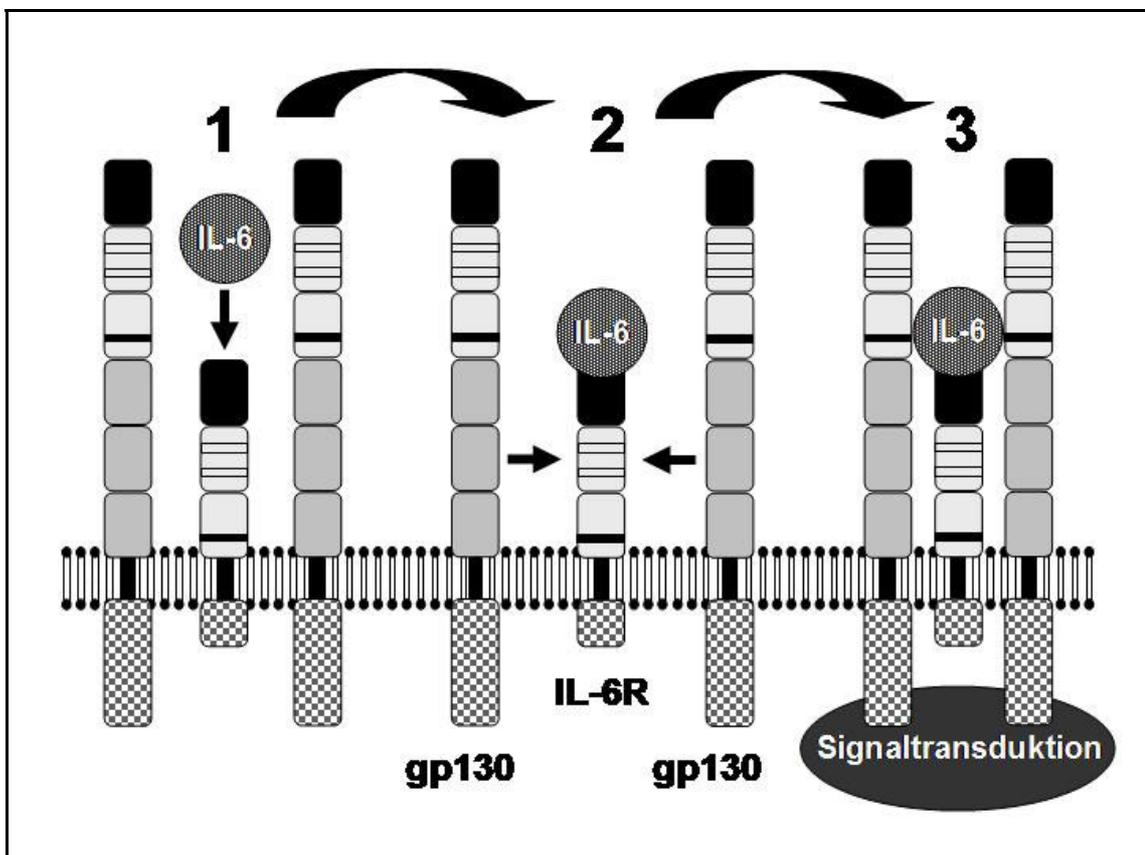


Abbildung 5:
Schema der IL-6-Bindung am IL-6-Rezeptorkomplex. Zum Zeitpunkt der Anlagerung des IL-6 sind die gp130 Rezeptoruntereinheiten noch vom IL-6R getrennt (Abbildung 1). Die Anlagerung des IL-6 an seinen Rezeptor führt zur Dimerisierung zweier gp130 Moleküle (Abbildung 2) und deren Assoziation an den IL-6-IL-6R Komplex (Abbildung 3). Dadurch entsteht ein hochaffiner Liganden-Rezeptorkomplex, der zur (gp130-vermittelten) Signaltransduktion befähigt ist.

IL-6 bindet an die α -Rezeptor-Untereinheit, deren zytoplasmatische Domäne jedoch nicht die IL-6-induzierten Signale vermittelt (Taga et al. 1989).

Kapitel 1: Einleitung

Die β - oder gp130-Untereinheit, die den Liganden allein nicht binden kann, ist jedoch auf Grund ihrer zytoplasmatischen Domäne für die IL-6-induzierte Signaltransduktion unentbehrlich (Yamamoto et al. 1994). Ein aktiver IL-6-Membranrezeptorkomplex setzt sich aus der α -Untereinheit und zwei gp130-Untereinheiten zusammen (Davis et al. 1993, Murakami et al. 1993). Die Interaktion von IL-6 mit seinem α -Rezeptor induziert die Dimerisierung zweier gp130-Moleküle und deren Assoziation mit der α -Untereinheit (Yamasaki et al. 1988, Taga et al. 1989, Hibi et al. 1990).

Erst die Assoziation der β -Untereinheit steigert die Affinität der α -Untereinheit gegenüber ihrem Liganden, so daß IL-6R α und gp130 zusammen einen hochaffinen IL-6-Bindungskomplex darstellen. Die Bildung dieses Signaltransduktionskomplexes (Taga et al. 1989, Murakami et al. 1993) löst eine Kaskade weiterer Reaktionen aus (siehe Kapitel 1.6.3.5) (Darnell Jr. et al. 1994, Hirano et al. 1994, Kishimoto et al. 1994, Ihle et al. 1995).

1.6.3.3 Der lösliche Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R)

Neben der membranständigen Variante des IL-6R gibt es auch eine lösliche, im Blut zirkulierende Rezeptorvariante (sIL-6R). Das Gen für die membrangebundene Form des IL-6R codiert für ein transmembranes Protein von 449 Aminosäuren mit einer kurzen intrazellulären Region von 82 Aminosäureresten (Taga et al. 1989). Die lösliche Form des IL-6R ist kleiner als die membrangebundene Form, was auf ihren Entstehungsprozeß schließen läßt. Der lösliche IL-6R kann einerseits durch den Prozeß des "Sheddings", d.h. durch eine limitierte Proteolyse im Bereich der extrazellulären Region des membrangebunden IL-6R (Müllberg et al. 1993, Rose-John & Heinrich 1994, Mackiewicz et al. 1995, Heaney & Golde 1996), andererseits durch differenziertes "Splicing" (Splitten) der IL-6R prä-mRNA (Lust et al. 1992, Rose-John & Heinrich 1994) generiert werden. Der lösliche IL-6R bindet IL-6 mit der gleichen Affinität wie der membrangebundene IL-6R (Stoyan et al. 1993).

Auch der sIL-6R assoziiert mit dem gp130 in Anwesenheit von IL-6 (Taga et al. 1989). Der Komplex aus IL-6 und sIL-6R besitzt jedoch die Möglichkeit Zielzellen zu aktivieren, die nur die gp130 Untereinheit auf ihrer Oberfläche ausgebildet haben. Dieser Vorgang wird auch als "Trans-Signaltransduktion" bezeichnet (Rose-John & Heinrich 1994). Während gp130 auf allen Zellen ausgebildet werden kann, ist die

Kapitel 1: Einleitung

Anzahl der IL-6R hoch variabel. Durch die Anwesenheit des löslichen IL-6R können auch Zellen, die keine oder nur wenige membranständige IL-6R ausbilden, auf IL-6 Stimulation antworten (März et al. 1997b, 1998). Dadurch erhöht sich das Wirkspektrum von IL-6 (Peters et al. 1997b), denn bei Anwesenheit von IL-6 und sIL-6R sind theoretisch alle Zellen, die einen gp130-Rezeptor exprimieren, in der Lage auf IL-6 zu antworten. Studien an transgenen Mäusen mit einer Überexpression des humanen sIL-6R zeigten, daß die Wirkung von sIL-6R in Anwesenheit von IL-6 auf die direkte Umgebung der sIL-6R Synthese begrenzt ist (Peters et al. 1997a) und es sich möglicherweise um einen Vorgang mit parakriner Wirkung handelt (Peters et al. 1997a). Auch Zellen des ZNS werden als Herkunftsort des sIL-6R Proteins erachtet (Ringheim et al. 1998). Ähnlich der IL-6- und IL-6R-mRNA ist auch das sIL-6R Protein unter physiologischen Bedingungen nachweisbar (März et al. 1997a). Die Dissoziationskonstante (K_D) von IL-6 bezüglich des IL-6R oder sIL-6R beträgt $1-5 * 10^{-12}$ mol/l, bzw. 1-5 pM/l (Gruol & Nelson 1997).

1.6.3.4 Vorkommen des IL-6R im ZNS

Wie IL-6 ist auch der IL-6R bzw. seine mRNA in verschiedenen Zelltypen des ZNS, wie Astrozyten, Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia nachzuweisen (Schöbitz et al. 1992, Yan et al. 1992, Sawada et al. 1993, Schöbitz et al. 1993, Gadiant & Otten 1994, Nelson et al. 1999). Somit besitzt eine Reihe von Zellen die Möglichkeit, IL-6 zu synthetisieren und / oder auf IL-6 zu reagieren. Damit ist IL-6 in der Zell-zu-Zell-Vermittlung und der autokrinen Regulation von entscheidender Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen ist die IL-6-mRNA in parenchymalen Zellen des ZNS vorhanden (Vallières & Rivest 1997). Endotoxämische Zustände können eine vermehrte IL-6-Expression im Gehirn induzieren (Vallières & Rivest 1999). Die periphere Applikation von LPS induziert die Synthese von IL-6-mRNA vor allem in Zellen der zirkumventrikulären Organe (CVOs, siehe Kapitel 1.7.1.2), der Blutgefäße und einigen wenigen neuronalen Zellpopulationen (Vallières & Rivest 1997). Im Vergleich dazu ist unter physiologischen Bedingungen die mRNA des IL-6R und des gp130 innerhalb des gesamten ZNS und in den CVOs sowie den Blutgefäßen anzutreffen. Die Applikation von LPS steigert die Synthese der IL-6R- und gp130-mRNA in den CVOs und in den Blutgefäßen. Damit wird gezeigt, daß LPS die Genexpression von IL-6, IL-6R und

gp130 in spezifischen Regionen (CVOs) induzieren kann. Weiterhin kann IL-6 die Synthese seines Rezeptors innerhalb zentraler Blutgefäße selbst induzieren, wobei dieser Effekt nach vorheriger Applikation von LPS verstärkt wird (Vallières & Rivest 1999). So kann die vorherige Induktion der IL-6-Rezeptorexpression die neuroendokrine Immunantwort von zirkulierendem IL-6 verstärken (Vallières & Rivest 1999).

1.6.3.5 Die intrazelluläre Signaltransduktion durch die gp130-Untereinheit des IL-6R

In Abbildung 6 wird die Signaltransduktion schematisch dargestellt. Die proximale Region der intrazellulären Domäne der gp130-Untereinheit ist mit Tyrosinkinase assoziiert (Murakami et al. 1991 & 1993, Stahl et al. 1994, Narazaki et al. 1994), die für die Signaltransduktion von wichtiger Bedeutung sind. Sie wurden ursprünglich auf Grund einer fehlenden Definition einfach *“just another kinase“* (“nur eine andere Kinase“) genannt. In Anlehnung an den zweigesichtigen römischen Gott Janus ist ihnen später der Name „Janus-Kinase“ (JAK) zugewiesen worden, da die Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen ebenfalls in zwei Richtungen schauen: *“auswärts“* in Richtung der unterschiedlichen Zytokinliganden und *“einwärts“* in Richtung des Zellinneren. Die Familie der Janus-Kinasen repräsentiert eine Familie löslicher Tyrosinkinase, die für eine Reihe von Signaltransduktionen verschiedener Mitglieder der Zytokinfamilie verantwortlich gemacht werden (Wilks et al. 1991, Velazquez et al. 1992, Watling et al. 1993, Müller et al. 1993, Witthuhn et al. 1994, Barbieri et al. 1994, Darnell Jr. et al. 1994, Ihle et al. 1994, Johnston et al. 1994). Zu der Familie der Janus-Kinasen (JAKs) gehören JAK1 bis JAK3 und TYK2 mit einem Molekulargewicht von 125-135kDa und einer Sequenzhomologie von 35-45%. In ruhenden Zellen sind die JAKs katalytisch inaktiv. Die Interaktion von IL-6 mit seiner membrangebundenen α -Rezeptoreinheit induziert die Assoziation (Homodimerisierung) zweier gp130-Untereinheiten, so daß es zur Annäherung der assoziierten JAKs kommt. Durch eine Auto- bzw. Transphosphorylierung eines Tyrosinrestes innerhalb ihrer Kinasedomäne kommt es zu einer schnellen und langanhaltenden Aktivierung der JAKs. JAK1, JAK2 und TYK2 sind die wesentlichen Kinasen, die mit gp130 assoziiert sind, und deren Tyrosinphosphorylierung durch die Mitglieder der IL-6-Familie induziert wird (Stahl &

Kapitel 1: Einleitung

Yancopoulos 1993). In einem weiteren Schritt phosphorylieren die aktivierten JAKs Tyrosinreste im distalen Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne der gp130-Untereinheit. Die phosphorylierten Tyrosinreste sind Bindungsstellen für die Faktoren, die für die weitere Signaltransduktion verantwortlich sind. Dazu gehören unter anderem die *“Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription“*, die sogenannten STAT Faktoren. Sie zeichnen sich durch ihre zweifache Funktion in der *“Signal-Transduktion“* im Zytoplasma und in der *“Aktivierung der Transkription“* im Zellkern aus. Die STAT-Faktoren, durch Studien über die Signalvermittlung bei Interferonen erstmalig identifiziert (Darnell Jr. et al. 1994), bilden eine Gruppe von sieben Proteinen (STAT1-4, STAT5A und B, STAT6). Über eine Länge von ca. 700 Aminosäuren (AS) besitzen sie abschnittsweise ähnliche Strukturen (Darnell Jr. et al. 1994), was in einer Sequenzhomologie von 28-40% resultiert. Mit über 50% weist der AS-Abschnitt zwischen AS 600 und AS 700 eine maximale Übereinstimmung bezüglich der Sequenzhomologie der STAT-Mitglieder auf. Diese Region codiert den Bereich der SH2- (*“src-homology 2“*) Domäne. Die SH2-Domäne assoziiert mit dem Rezeptor-Kinase-Komplex und legt fest welches STAT-Molekül von welchem Rezeptor gebunden wird (Overduin et al. 1992, Heim et al. 1995). In einem weiteren Schritt werden die STAT-Moleküle durch Phosphorylierung ihres Tyrosinrestes aktiviert (Shuai et al. 1993, Improta et al. 1994, Rothman et al. 1994). Der Tyrosinrest ist die zweite wichtige Struktur neben der SH2-Domäne, die für die weitere Funktion der STAT-Faktoren essentiell ist. Als Andockstellen für die zu diesem Zeitpunkt als Monomer vorliegenden STAT-Faktoren dienen die phosphorylierten Tyrosinreste des distalen Abschnitts der intrazellulären Domäne des gp130-Rezeptors (Stahl et al. 1995). Die gp130-Untereinheit besitzt insgesamt sechs Tyrosinreste, wovon der zweite und der vierte Tyrosinrest essentiell sind (Hibi et al. 1996). Die transiente Assoziation der STAT-SH2-Domäne mit dem Rezeptor-Kinase-Komplex bringt die STAT-Monomere in die angemessene Position, um von den benachbarten Janus-Kinasen durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes aktiviert zu werden. Der Rezeptor scheint dabei bestimmen zu können, welches STAT-Monomer assoziiert wird, indem er die einzigartigen Besonderheiten der STAT-SH2-Domäne erkennt. Damit agiert der Rezeptor als zentrale Stelle, um die Signalgenauigkeit zu gewährleisten und zu regulieren (Schindler & Darnell Jr. 1995).

Die aktivierten STAT-Monomere sind jetzt in der Lage, mit einem weiteren aktivierten STAT-Monomer ein STAT-Dimer zu bilden. Die Dimerisierung erfolgt durch

molekulare Interaktion der SH2-Domänen mit den phosphorylierten Tyrosinresten. Dabei kann es zur Homodimerisierung von zwei gleichen STAT-Faktoren oder zu einer Heterodimerisierung von zwei unterschiedlichen STAT-Faktoren kommen.

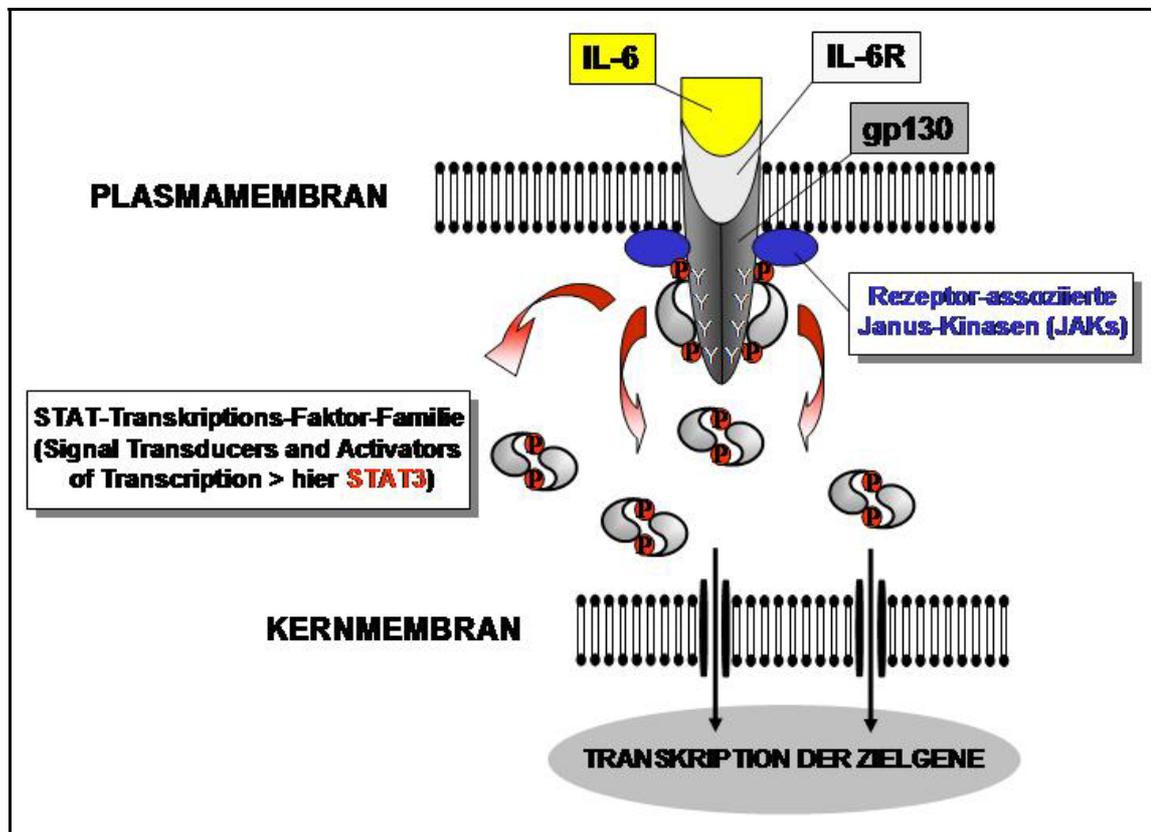


Abbildung 6:

Schematische Übersicht des JAK- (Janus-Kinase) STAT- (Signal Transduktor und Aktivator der Transkription) Signaltransduktionsweges. Die Anlagerung des Liganden Interleukin-6 (IL-6) an seinen Rezeptor (IL-6R) führt zur Assoziation zweier gp130- (Glykoprotein 130) Rezeptoruntereinheiten (gp130). Durch Auto- oder Transphosphorylierung werden die rezeptorassoziierten Janus-Kinasen aktiviert, die die gp130 assoziierten Tyrosinreste phosphorylieren, an die sich die STAT3-Monomere anlagern. Diese transient angelagerten STAT3-Monomere werden durch die Janus-Kinase phosphoryliert, so daß sie im aktivierten Zustand STAT3-Homodimere bilden können. Diese STAT3-Homodimere translozieren im Anschluß in den Zellkern, um an ihre Zielgene zu binden und deren Transkription zu veranlassen.

Im direkten Anschluß werden die STAT-Dimere serinphosphoryliert (Lütticken et al. 1995) und translozieren in den Zellkern, um sequenzabhängig an DNA-Strukturen ("responsive elements") ihrer Zielgene zu binden. Die Serinphosphorylierung wird in diesem Zusammenhang für eine optimale Transaktivierung der Zielgene verantwortlich

Kapitel 1: Einleitung

gemacht (Heinrich et al. 1998). Rezeptoren mit ähnlicher Struktur wie die Rezeptoren der IL-6-Familie, können dieselben STAT-Faktoren, wie z.B. die Faktoren STAT1 und STAT3 (Schindler & Darnell Jr. 1995) aktivieren.

DNA-Sequenzen, die STAT-Proteine binden, sind ursprünglich bei der IFN- γ -vermittelten Induktion der Gentranskription als GAS- (“*gamma-interferon activation site*“-) Elemente entdeckt worden. Dabei handelt es sich um einen hochkonservierten DNA-Abschnitt von ca. 10-12 Basenpaaren, der in den Promotoren von über zehn verschiedenen Genen vorkommt, die durch IFN- α transkriptional aktiviert werden (Darnell Jr. et al. 1994). An dieses GAS-Element bindet der Proteinkomplex GAF (“*gamma-interferon activation factor*“). Dieser ist identisch mit einem Mitglied der STAT-Familie, dem STAT1-Homodimer. Heute ist bekannt, daß sechs der sieben STAT-Faktoren die gleiche palindrome Konsensussequenz “*TTCN2-4GAA*“ (Decker et al. 1997) bzw. “*TTNNNNNAA*“ (Schindler & Darnell Jr. 1995) erkennen, die eine GAS-Sequenz definiert. Damit können die GAS-Sequenzen als allgemeine nukleäre Zielregion des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges und seiner Aktivatoren (Zytokine) betrachtet werden.

Auch IL-6 vermittelt seine Signale durch Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges (Abbildung 6). Bei der Signalvermittlung von IL-6 sind die Kinasen der JAK-Familie, JAK1, JAK2 und TYK2 verantwortlich (Lütticken et al. 1994, Stahl et al. 1994). Vor allem JAK1 kommt eine besondere Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor von IL-6 in Abwesenheit von JAK1 nicht ausreichend aktiviert wird, trotz Aktivierung von JAK2 und TYK2 (Guschin et al. 1995). Damit ist JAK1 bei der IL-6-induzierten Signalvermittlung von entscheidender Bedeutung. Wie bei den anderen Mitgliedern der IL-6-Familie sind die Faktoren STAT1 und STAT3 auch bei der IL-6-vermittelten Immunantwort von Bedeutung. Beispielsweise werden nach IL-6-Stimulation neben STAT1- und STAT3-Homodimeren (Akira et al. 1994, Wegenka et al. 1994) auch STAT1-STAT3-Heterodimere gebildet (Ruff-Jamison et al. 1993 & 1994, Zhong et al. 1994). Bei dem Transkriptionsfaktor, der in erster Linie – vor allem bei geringen Konzentrationen des Liganden – die IL-6-Signaltransduktion vermittelt, handelt es sich um den Faktor STAT3 (Lütticken et al. 1994, Stahl et al. 1994, Zhong et al. 1994). Diese Aussage beruht auf der Beobachtung, daß in Leberzellen durch LPS-Stimulation die IL-6-Synthese induziert und damit die APR aktiviert wurde (Wegenka et al. 1993). Bei diesem Versuch und der direkten Stimulation der Leberzellen mit IL-6 konnte eine schnelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors APRF (“*acute-phase*

response factor“) (Wegenka et al. 1994) beobachtet werden, der im direkten Anschluß tyrosinphosphoryliert wurde. Aus Leberextrakten IL-6- und LPS-behandelter Ratten ist APRF aufgereinigt und analysiert worden (Wegenka et al. 1994). Dabei stellte sich heraus, daß APRF mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 identisch war (Akira et al. 1994, Wegenka et al. 1994, Zhong et al. 1994). Die Stimulation von Leberzellen mit IL-6 induzierte ebenfalls eine Tyrosinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Lütticken et al. 1994, Stahl et al. 1994). Bei einer lokalen Entzündung ist IL-6 zur Induktion der APR essentiell. In diesem Zusammenhang konnte STAT3 als einziger Faktor im Lebergewebe nachgewiesen werden (Alonzi et al. 1998). In Versuchen mit IL-6-defizienten Mäusen wurde festgestellt, daß STAT3 bei einer lokalen Entzündung als Transkriptionsfaktor nicht vorhanden war (Alonzi et al. 1998). Damit ist die IL-6-induzierte APR STAT3 vermittelt (Ruff-Jamison et al. 1993 & 1994), und es ist wahrscheinlich, daß STAT3 auch in der Fiebermediation eine große Bedeutung hat.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 besitzt eine Länge von ca. 750 AS und sein Gen wurde auf dem Chromosom 11 der Maus entdeckt (Yamamoto et al. 1994). STAT3 wird bei der IL-6-vermittelten Immunantwort durch Phosphorylierung seines Tyrosinrestes (Tyr705) aktiviert, was in erster Linie durch die JAK1 vermittelt wird. Diese aktivierten STAT3 Monomere bilden STAT3 Homodimere, die im direkten Anschluß serinphosphoryliert (Ser727) werden, um in den Zellkern zu translozieren und an entsprechende DNA-Abschnitte (“responsive-elements“) ihrer IL-6 Zielgene zu binden.

1.7 Theorien zum fieberinduzierenden Signaltransfer

Es werden verschiedene Mechanismen der Zytokin – Gehirn – Kommunikation diskutiert (Dantzer 1994, Faggioni et al. 1995, Watkins et al. 1995, Roth & de Souza 2001). Grundlegend können zwei verschiedene Mechanismen unterschieden werden: ein humoral über das Blut und ein neural über afferente Nervenfasern vermittelter Immunsignalweg. Im Folgenden sollen die Möglichkeiten der humoralen Signalübertragung erläutert werden, da sich die Arbeit in erster Linie auf diesen Signalweg konzentriert.

1.7.1. Die Bluthirnschranke (BHS)

Wie schon vorher beschrieben, liegt das thermoregulatorische Zentrum in der präoptischen Region des Hypothalamus. Sie wird, wie das gesamte Gehirn, von der Körperperipherie weitgehend durch die Bluthirnschranke (BHS) isoliert. Die BHS verhindert die Passage von größeren Molekülen aus der Peripherie in das Gehirn. Sie setzt sich aus mehreren zellulären Einheiten zusammen, wozu auch die Endothelzellen gehören. Diese weisen eine verminderte Pinozytose- bzw. Transzytoserate auf und sind durch besondere Zellkontakte, den *“tight junctions“*, dicht verknüpft (Bradbury 1984). Den Endothelzellen aufgelagert sind Astrozytenausläufer, die durch *“gap-junctions“* miteinander verbunden sind und die *“Membrana gliae limitans perivascularis“* bilden, wodurch die Gehirnkapillaren nahezu impermeabel werden. Die BHS ist jedoch nicht hundertprozentig undurchlässig. Lipidlösliche, unpolare Substanzen geringer Größe können jedoch ihrem Diffusionsgradienten folgend durch die Membranen der Endothelzellen hindurch diffundieren. Auch die *“tight junctions“* sind nicht absolut undurchlässig. So können neben Ionen auch Substanzen mit einer Molekülmasse kleiner 90Da und einem Molekülradius kleiner 0.2nm die BHS passieren. Größere Moleküle können auf diese Art und Weise die BHS nicht überwinden. Damit ist ein passiver Transport peripherer endogener Pyrogene, wie IL-6, das ein Molekulargewicht von 23-26kDa besitzt, nahezu unmöglich. Allerdings kann sich die Permeabilität der BHS durch diverse pathophysiologische Vorgänge erhöhen, so daß eine Überwindung der BHS durch große Moleküle nicht ausgeschlossen werden kann.

1.7.2 Die zirkumventrikulären Organe (CVOs)

Die Kapillaren bestimmter Strukturen des Gehirns weisen eine erhöhte Permeabilität auf, was auf der anatomischen Besonderheit dieser Strukturen – der Abwesenheit der sonst überall im Gehirn ausgebildeten BHS – beruht. Bei diesen Strukturen handelt es sich um die zirkumventrikulären Organe (CVOs *“circumventricular organs“*, Abbildung 7). Sie erhielten diese Bezeichnung, weil sie bei Säugern in der medianen Sagittalebene des Gehirns liegende kleinere Gehirnstrukturen umfassen, die an den dritten bzw. vierten Gehirnventrikel grenzen (Hofer 1958). Dazu gehören das Organum subfornicale (SFO), das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), die Area postrema (AP),

Kapitel 1: Einleitung

die Eminentia mediana (ME), die Neurohypophyse (NL), das Organum subcommissurale (SCO), die Glandula pinealis (PIN, Epiphyse) und die Plexus chorioidei der vier Ventrikelräume.

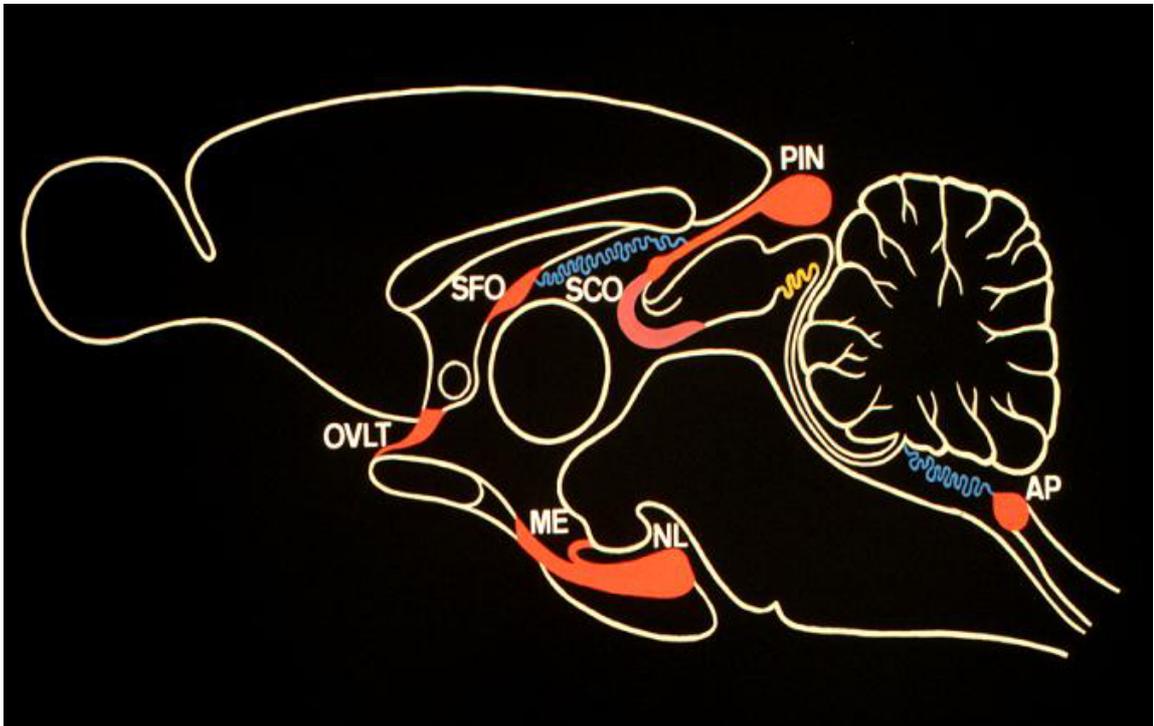


Abbildung 7:

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

Trotz ihrer Unterschiede weisen sie doch eine Reihe gemeinsamer morphologischer und neuroendokriner Besonderheiten auf. Sie besitzen, bei generell starker Vaskularisierung neben einem fenestrierten Kapillarendothel weite perivaskuläre Räume (Leonhardt 1980, Landas & Philipps 1987, Dellmann 1987, Gross 1992). Das Fehlen der BHS ist die morphologische Grundlage für einen möglichen Informationsaustausch durch polare Moleküle zwischen dem Blutmilieu und dem neutralen Milieu der CVOs, was ihnen die Bedeutung als “Fenster des Gehirns“ einbrachte. Auch Substanzen im Plasma, wie z.B. den hochmolekularen und polaren pyrogenen Zytokinen könnte es ermöglicht werden, die BHS an diesen Strukturen zu passieren (Stitt 1990). Weiterhin unterscheiden sich

Kapitel 1: Einleitung

die CVOs bezüglich ihrer Ependymzellen, die die ventrikuläre Oberfläche der CVOs bilden, unregelmäßig geformt sind und wenig oder gar kein Flimmerepithel auf ihrer luminalen Oberfläche besitzen (Weindl & Joynt 1971, Phillips et al. 1974, Dellmann & Simpson 1979, McKinley et al. 1987). Andererseits weisen die Ependymzellen der CVOs sogenannte "tight junctions" auf, die den Austausch von Molekülen zwischen der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF "cerebrospinal fluid") und den CVOs stark einschränkt (Weindl 1973, Broadwell and Brightman 1976, Krisch et al. 1978, McKinley et al. 1990). Damit könnte behauptet werden, daß die BHS vom Bereich des Kapillarendothels in den ependymalen Bereich der CVOs verschoben wurde.

1.7.3 Die sensorischen CVOs

Drei der CVOs zeichnen sich durch eine weitere Besonderheit im Vergleich zu den anderen aus. Dabei handelt es sich um das OVLT (namentlich erstmalig von Behnen 1927 erwähnt), das den ventralen Anteil der vorderen Begrenzung des 3. Ventrikel darstellt, das SFO (erstmalig 1922 von Putnam erwähnt), das sich ventral des Hippocampus im 3. Ventrikel befindet sowie die AP (erstmalige Erwähnung durch Wilson 1906), die dorsomedial der Medulla oblongata im 4. Ventrikel zu finden ist. Das OVLT und das SFO sind anatomisch eingebettet in die Lamina terminalis, die rostrale Begrenzung des dritten Hirnventrikels. Neben den anderen morphologischen Besonderheiten der CVOs besitzen sie darüber hinaus bi- und tripolare Neurone und eine hohe Anzahl verschiedener Rezeptoren für Neurotransmitter und Peptide. Dadurch wird ihnen eine sensorische Funktion im Rahmen der autonomen Regulation zuerkannt (Johnson et al. 1992, Johnson & Gross 1993), weshalb sie die Bezeichnung "sensorische CVOs" erhalten haben. Neben einer Vielzahl afferenter und efferenter Konnektivitäten weisen sie auch eine andere Zytoarchitektur und -chemie auf. Wegen ihrer Gefäßnähe und ihren neuronalen Konnektivitäten, die in verschiedene Regionen des ZNS projizieren, wird ihnen eine gesonderte Funktion im Bereich der Körperhomöostase bezüglich des Flüssigkeitshaushaltes und der Kreislauffunktion zuerkannt (Zur Übersicht: McKinley et al. 1990, Johnson & Gross 1993, Oldfield & McKinley 1995). Damit sind die die CVOs höchstwahrscheinlich auch in der Reaktionsvermittlung zirkulierender Zytokine zwischengeschaltet. In neuroanatomischen "tracing"-Studien wurden zahlreiche reziproke Verbindungen mit wichtigen autonomen hypothalamischen

Kapitel 1: Einleitung

als auch extrahypothalamischen Kerngebieten nachgewiesen (Philipps & Camacho 1987, McKinley et al. 1989, Oldfield et al. 1991, Johnson et al. 1992). Insbesondere wird das OVLT – unter anderem aufgrund seiner unmittelbaren Nähe zur präoptischen Region – als wichtigste Region bei der Fieberentstehung angesehen (Zeisberger & Merker 1992, Hunter et al. 1994).

1.7.4 *Die Hypothesen*

Über die Möglichkeiten der Zytokine ihre Signale humoral zu vermitteln, gibt es eine Reihe verschiedener Theorien (Abbildung 8):

- Der Eintritt hochmolekularer zirkulierender endogener Pyrogene in das Gehirn würde durch die fenestrierten Kapillaren der CVOs erfolgen. Im perivaskulären Raum der CVOs könnten die Zytokine mit Rezeptoren von Astrozyten, Makrophagen und / oder Endothelzellen reagieren und dadurch in diesen Zellen die Produktion und Freisetzung von Mediatoren, wie z.B. Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Katsuura et al. 1989, Zeisberger & Merker 1992, Stitt 1992, Zeisberger 2000) induzieren. Diese lipophilen Moleküle könnten anschließend in thermosensitive Regionen, wie z.B. in die an das OVLT grenzende präoptische Region diffundieren. Eine direkte Diffusion der Zytokine in thermosensitive Strukturen, wie die präoptische Region, ist aufgrund der molekularen Eigenschaften der Zytokine eher unwahrscheinlich (Blatteis & Sehic 1997). Weiterhin könnte PGE₂ – aus Zellen nicht neuronalen Ursprungs – parakrin wirken und Neurone in den CVOs erregen, die in die präoptische Region projizieren (Blatteis & Sehic 1997) oder die Aktivität warmsensitiver Neurone innerhalb der CVOs vermindern (Matsuda et al. 1992).
- Eine andere Möglichkeit bestünde darin, daß die Endothelzellen auf eine Bindung der Zytokine an Rezeptoren des zerebralen Gefäßendothels (Maier et al. 1990, Goldgaber et al. 1989) mit der Bildung und Freisetzung weiterer zentraler Mediatoren wie PGE₂ reagieren. PGE₂ könnte die Information der pyrogenen Zytokine durch Diffusion in thermosensitive Gebiete weiterleiten. Auch könnte es zu einer Veränderung der Durchlässigkeit der Endothelzellen bzw. ihrer Zellkontakte und damit der BHS kommen, so daß es Krankheitsmediatoren oder -auslösern (LPS), die normalerweise

Kapitel 1: Einleitung

von der BHS zurückgehalten werden, möglich wäre nun in das Gehirn einzudringen (Furie & McHugh 1989).

- Eine weitere Hypothese beschreibt die Überwindung der BHS mit Hilfe eines spezifischen Transportsystems. Dabei handelt es sich um einen aktiven Transportmechanismus, der von einigen Autoren bei Ratten und Mäusen beschrieben wurde (Banks et al. 1989 & 1991, Banks & Kastin 1991, Guitierrez et al. 1993, Banks et al. 1994 & 1995, Banks & Kastin 1996, Plotkin et al. 1996, Pan et al. 1997, Maness et al. 1998). Das Transportsystem ist bezüglich der Transportrate und der Anzahl der Transportmoleküle beschränkt und besitzt dadurch eine maximale Sättigung (Banks & Kastin 1987 & 1991). Pharmakokinetische Berechnungen ergaben, daß 60min nach intravenöser Applikation eines Zytokins nur 0.06% bis 0.08% seiner Ausgangsdosis im Gehirn zu finden sind. Daher ist es unwahrscheinlich, daß durch diesen Transportmechanismus eine ausreichende Konzentration der Mediatoren in die thermosensitiven Regionen gelangen, um eine Fieberantwort erzeugen zu können. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Weg einen Anteil zur Fieberentstehung beisteuert oder an Vorgängen beteiligt ist, die mit der Fieberantwort zusammenhängen (Blatteis & Sehic 1997).
- Neben diesen rein humoralen Hypothesen wird ein indirekter, humoral-zellulär vermittelter Signalweg diskutiert. In diesem Fall erfolgt die Vermittlung der peripheren Immunsignale ins Gehirn durch Lymphozyten. T-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, die BHS zu überwinden. Somit können die im Rahmen der Immunreaktion durch zirkulierende Zytokine aktivierten Lymphozyten in das Gehirn gelangen und dort weitere zentrale Immunantworten aktivieren (Couraud 1994, Williams & Hickey 1996). Das würde bedeuten, daß im Gehirn proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, die wiederum die Bildung und Freisetzung von Mediatoren, wie PGE₂ oder Zelladhäsionsmolekülen induzieren (Neuman & Wekerle 1998).

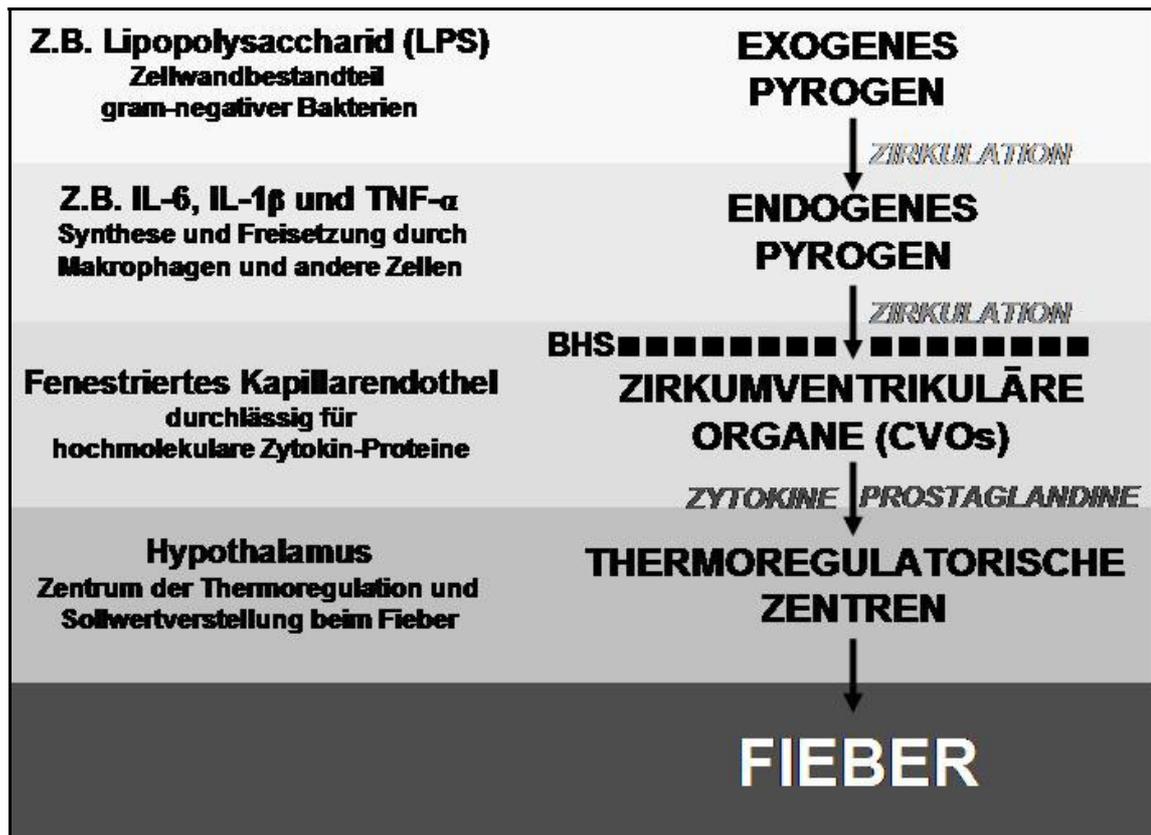


Abbildung 8:

Übersicht über den humoralen Mechanismus, wie die zirkulierenden pyrogenen Zytokine aus der Peripherie in das Zentralnervensystem gelangen könnten.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß keiner der oben beschriebenen humoralen Wege einzig und allein für die Übertragung der peripheren Immunsignale ins Gehirn verantwortlich ist. Eher besitzt jeder dieser Wege einen Anteil an der komplexen Reaktion des Organismus. Innerhalb des Gehirns werden viele Zytokine von Neuronen und / oder von Gliazellen synthetisiert (Fontana et al. 1986, Sternberg 1988, Dascombe & Milton 1989, Rothwell et al. 1991, Roth et al. 1993, Saper & Breder 1994, Breder et al. 1994, Rothwell & Hopkins 1995, Hopkins & Rothwell 1995). Die peripheren Zytokine besitzen die Möglichkeit, humoral, möglicherweise unter Freisetzung weiterer Mediatoren, ihre eigene oder die Synthese anderer Zytokine sowie anderer Mediatoren im ZNS zu induzieren. Auch bleibt ihnen die Möglichkeit über die nervale Komponente die zentrale Zytokinproduktion zu aktivieren.

1.8 Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Bedeutung von zirkulierendem IL-6 als potentiell endogenen Mediator der humoralen Signalvermittlung der Fieberentstehung analysiert werden. IL-6 besitzt eine wichtige Rolle in der APR und ist auch an der Fieberinduktion beteiligt (siehe Kapitel 1.5.1). Dieses Zytokin ist über die gesamte Zeitperiode der LPS-induzierten Fieberantwort in der Blutzirkulation nachweisbar. Darüber hinaus korrelieren die zirkulierenden IL-6-Konzentrationen ausgezeichnet mit den fieberhaften Veränderungen der Körpertemperatur (LeMay et al. 1990a & 1990b, Roth et al. 1993 & 1994). Die CVOs sind bei der Vermittlung zirkulierender pyrogener Signale von entscheidender Bedeutung. Als geeigneter Kandidat könnte IL-6 als hochmolekularer und humoraler Mediator von den CVOs erkannt werden und über diese seine fieberinduzierende Wirkung vermitteln. Deshalb sollen in der vorliegenden Arbeit mögliche Interaktionen von IL-6 mit Zellen der sensorischen CVOs nachgewiesen und analysiert werden. Die mögliche Beteiligung von IL-6 bei der Fieberentstehung wird dadurch unterstützt, daß dieses Zytokin die Aktivität warmsensitiver Neurone im OVLT vermindert. In direkter Nachbarschaft des OVLT befindet sich die präoptische Region (Area praeoptica), die für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur von Bedeutung ist (Xin & Blatteis 1992). Darüber hinaus kann nach systemischer LPS-Stimulation ein Anstieg der IL-6-Konzentration im vorderen Hypothalamus und in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) beobachtet werden (LeMay et al. 1990c, Klir et al. 1993). Umgekehrt verursacht die Infusion von human-rekombinantem Interleukin-6 (*hrIL-6*) in den vorderen Hypothalamus (Klir et al. 1993) oder die intrazerebroventrikuläre (i.c.v.) Injektion von *hrIL-6* (LeMay et al. 1990c) bzw. *rrIL-6* (Lenczowski et al. 1999) eine lang anhaltende Fieberantwort. Nach systemischer LPS-Applikation ist eine Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von IL-6 und der Höhe der Fieberantwort zu beobachten (LeMay et al. 1990a & 1990b). Ebenso besteht nach systemischer Applikation von LPS eine Korrelation zwischen der IL-6-Konzentration des CSF und der Höhe der Fieberantwort (LeMay et al. 1990c). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, daß IL-6 in der LPS-vermittelten Fieberantwort eine zentrale Rolle einnimmt. Parallele Messungen der IL-6-Konzentrationen im Plasma und im hypothalamischen Perfusat nach systemischer LPS-Stimulation ergaben keine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern (Roth et al. 1993), da das Maximum der

Kapitel 1: Einleitung

IL-6-Konzentration im Hypothalamus früher als im Plasma erreicht wurde. Deshalb kann vermutet werden, daß der Hypothalamus nach pyrogener Stimulation wahrscheinlich selbst dazu befähigt ist, Zytokine zu bilden. Weiterhin ist bekannt, daß IL-6 seine Immunantworten über den JAK-STAT3-Weg vermittelt, wobei STAT3 die Transkription der IL-6-Zielgene aktiviert. Dazu gehört auch die durch IL-6-vermittelte Genaktivierung, die für die Fieberentstehung wichtig ist. Basierend auf diesen Kenntnissen soll in der vorliegenden Arbeit analysiert werden, ob der Transkriptionsfaktor STAT3 in den CVOs während einer Fieberantwort neuroanatomisch nachgewiesen und somit deren Bedeutung in der Fieberentstehung bestätigt werden kann.

Bezug nehmend auf die Klugerschen Postulate, die die endogenen Pyrogene theoretisch erfüllen sollten, müßte während eines LPS-induzierten Fiebers der vermeintliche pyrogene humorale Mediator, in diesem Falle IL-6, in Beziehung zur Fieberantwort in der systemischen Zirkulation nachzuweisen sein und von einer genomischen Aktivierung zellulärer Elemente innerhalb der CVOs begleitet sein. Auch die systemische Applikation des endogenen Pyrogens IL-6 sollte eine Fieberantwort induzieren können, so daß zirkulierendes IL-6 und eine Reaktion zellulärer Elemente der CVOs auf diesen pyrogenen Stimulus nachweisbar sind. Darüber hinaus sollte durch die zentrale Applikation eines endogenen Pyrogens, wie IL-6, eine charakteristische Fieberantwort zu induzieren sein, die mit einer genomischen Aktivierung spezifischer Gehirnstrukturen einhergeht, die für die Fiebermediation von Bedeutung sind.

Basierend auf diesem Hintergrund sollen in der Arbeit folgende wissenschaftliche Fragen abgeklärt werden:

Sind erhöhte IL-6-Plasmawerte während des LPS-induzierten Fieberverlaufs von einer Aktivierung zentralnervöser fieberrelevanter Strukturen begleitet?

Geben die durch direkte IL-6-Applikation induzierten physiologischen Reaktionen Hinweise auf eine kausale Rolle dieses Zytokins bei der LPS-induzierten Fieberreaktion?

Kann der immunhistochemische Nachweis der nukleären Translokation des IL-6-spezifischen Transkriptionsfaktors STAT3 in Zellen fieberrelevanter Strukturen des ZNS Hinweise auf eine genomische Aktivierung dieser Zellen liefern?

Welche Zelltypen fieberrelevanter ZNS-Strukturen werden durch IL-6 genomisch aktiviert?

Welche Bedeutung hat zentralnervös gebildetes im Vergleich zu zirkulierendem IL-6 bei der Fieberentstehung und der genomischen Aktivierung von Zellen in fieberrelevanten ZNS-Strukturen?

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten aus institutseigener Zucht verwendet. Entsprechend der artgerechten, gesundheitlichen und qualitativen Kriterien erfolgte die Aufzucht in transparenten 38 x 59 x 18 (cm) (Breite x Tiefe x Höhe) großen Typ IV Polycarbonat-Käfigen (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmendingen) bei einer Raumtemperatur von $23\pm 1^\circ\text{C}$ und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Als Einstreu wurde Altromin Animal-Bedding (Altromin GmbH und Co KG, D-Lage-Lippe) verwendet. Wasser und Futter (Altromin GmbH und Co KG, D-Lage-Lippe) standen *ad libitum* zur Verfügung. Nach Erreichen des Absatzgewichtes ($110\pm 10\text{g}$) wurden die Tiere nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von bis zu 5 Tieren in Typ IV Polycarbonat-Käfige (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmendingen) umgesetzt. Unter denselben Haltungsbedingungen verblieben die Tiere dort bis zum Erreichen ihres Operations- bzw. Versuchsgewichtes von $210\pm 10\text{g}$. Danach wurden sie einzeln in transparenten, 28 x 42 x 15 (cm) (Breite x Tiefe x Höhe) großen Polycarbonat-Käfigen des Typ III (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmendingen) gehalten. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden sie in den Versuchsraum verbracht, in dem die gleichen Umweltbedingungen herrschten wie bei der Aufzucht. Während dieser Phase besaßen die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter. Täglich wurde der allgemeine Gesundheitszustand inklusive des Körpergewichtes (KG) sowie der Futter- und Wasserfüllstand kontrolliert. Durch das zeitige Umsetzen der Tiere in neue Käfige und eine andere Umgebung wurden die Tiere an die Versuchssituation gewöhnt. Das ist im Zusammenhang mit der Messung der Körpertemperatur wichtig, denn ein Anstieg der Körperkerntemperatur kann auch durch streßbedingte Faktoren, wie z.B. Käfigwechsel oder den Umgang mit den Tieren ("handling") ausgelöst werden.

Die Versuche wurden mit der Genehmigung der lokalen Tierschutzkommission (Projektnummer GI 20/1 – 1/96, GI 18/2 – 42/00 und 48-3560-1/2) durchgeführt.

2.2 Operationen

Vor Beginn der Operationen wurden die Tiere adspektorisch auf ihren Gesundheitszustand überprüft. Sie durften keine äußeren Anzeichen eines gestörten Allgemeinbefindens, Verletzungen oder andere Erkrankungen aufweisen. Die Operationen wurden mindestens eine – bei der Implantation der Transmitter – bzw. zwei – bei der intrazerebroventrikulären (i.c.v.) Kanülierung – Wochen vor Beginn des eigentlichen Experimentes durchgeführt, um den Tieren eine ausreichende Rekonvaleszenzzeit zu lassen.

2.2.1 *Narkose*

Die i.c.v. Kanülierung und die Implantation der Thermosender erfolgten unter Vollnarkose. Zu diesem Zweck wurde jedem Tier 100mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn GmbH, D-Erlangen) in Kombination mit 25mg/kg KG Xylazin (Rompun[®] 2%, Bayer Vital, D-Leverkusen) in einer 1ml Mischspritze (BD Plastipak, Bechton-Dickinson, D-Heidelberg) mit einer 26G Einmal-Insulin-Kanüle (Sterican (0.45x12mm), Braun, D-Melsungen) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Eine ausreichende Narkosetiefe war vorhanden, wenn durch Ausübung eines Druckschmerzes mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette im Zwischenzehbereich und der Haut im Abdominalbereich keine Flexionsbewegung der hinteren Gliedmaße ausgelöst werden konnte. Die Operationen dauerten 20min bis 60min, wobei die Tiere innerhalb der nächsten 2h wieder aus der Narkose erwachten.

2.2.2 *Vorbereitung des Operationsfeldes*

Das Operationsfeld wurde rasiert und anschließend mit 70%igem Ethanol (eigene Herstellung) und Braunol (Betaisodona[®], Mundi-Pharma GmbH, D-Limburg) desinfiziert.

2.2.3 *Intrazerebroventrikuläre Kanülierung*

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Schädeldecke im Bereich zwischen Augen und Ohren rasiert. Dann wurde der Kopf des Tieres für die Operation mittig im Stereotakten (Kopf Instruments, USA) fixiert, indem der Kopf posterior von zwei in den Meatus acusticus externus eingeführten Stahlstäben gehalten wurde. Anterior wurde die Maxilla so eingespannt, daß der Angulus oculus anterior in der Transversallinie lag, die durch den Mittelpunkt des Meatus acusticus externus geht. Der Stereotakt war mit einem Heizkissen (Fine Science Tools Inc., D-Heidelberg) versehen, um eine Auskühlung der Ratte während des Eingriffs zu vermeiden. Zur Überwachung der Körpertemperatur und zur Verhinderung einer Überhitzung wurde das Tier mit einem Rektalfühler ausgestattet, der mit einer Kontrolleinheit verbunden war, die die Temperatur des Heizkissens regulierte. In regelmäßigen Abständen von fünf Minuten wurde die Narkosetiefe überprüft.

Die Koordinaten für die i.c.v. Positionierung der Kanüle wurden dem stereotaktischen Gehirnatlanten für Ratten (Paxinos & Watson 1998) entnommen. Die Koordinaten für die i.c.v. Implantation der Kanüle wurden wie folgt definiert (Abbildung 9):

anterior: Bereich rostral von Bregma gelegen > - 0.8mm

lateral: Bereich seitlich der Sutura sagittalis > 1.4mm – 1.5mm

ventral: Bereich unterhalb der dorsalen Schädelkalotte > 4mm.

Der Beginn der Operation begann mit einem Hautschnitt entlang der Medianen vom hinteren Augenwinkel zur Ohrbasis. Anschließend wurde entlang der Inzision die Kalotte vom Periost stumpf freipräpariert und anhand der Koordinaten das Bohrloch für die Kanüle auf der Kalotte farblich markiert. An dieser Stelle wurde die Kalotte mit einem Dentalbohrer (Fine Science Tools, D-Heidelberg) trepaniert und im angrenzenden Os frontale und Os parietale wurden Bohrlöcher für drei kleine Schrauben (A4, M₁ (4x2), FMI GmbH, D-Seeheim) gesetzt, die später als Anker für den Knochenzement (Polymethylacrylat, Palacos®, Merck, D-Darmstadt) dienen. Nach Eindrehen der Schrauben wurde die Kanüle mit Hilfe der auf dem Stereotakten befestigten Führungseinheit (Kopf Instruments, USA) 4mm tief versenkt, wobei das Ende der rechtwinkeligen 27G-Kanüle (institutseigene Herstellung) nach caudal zeigte.

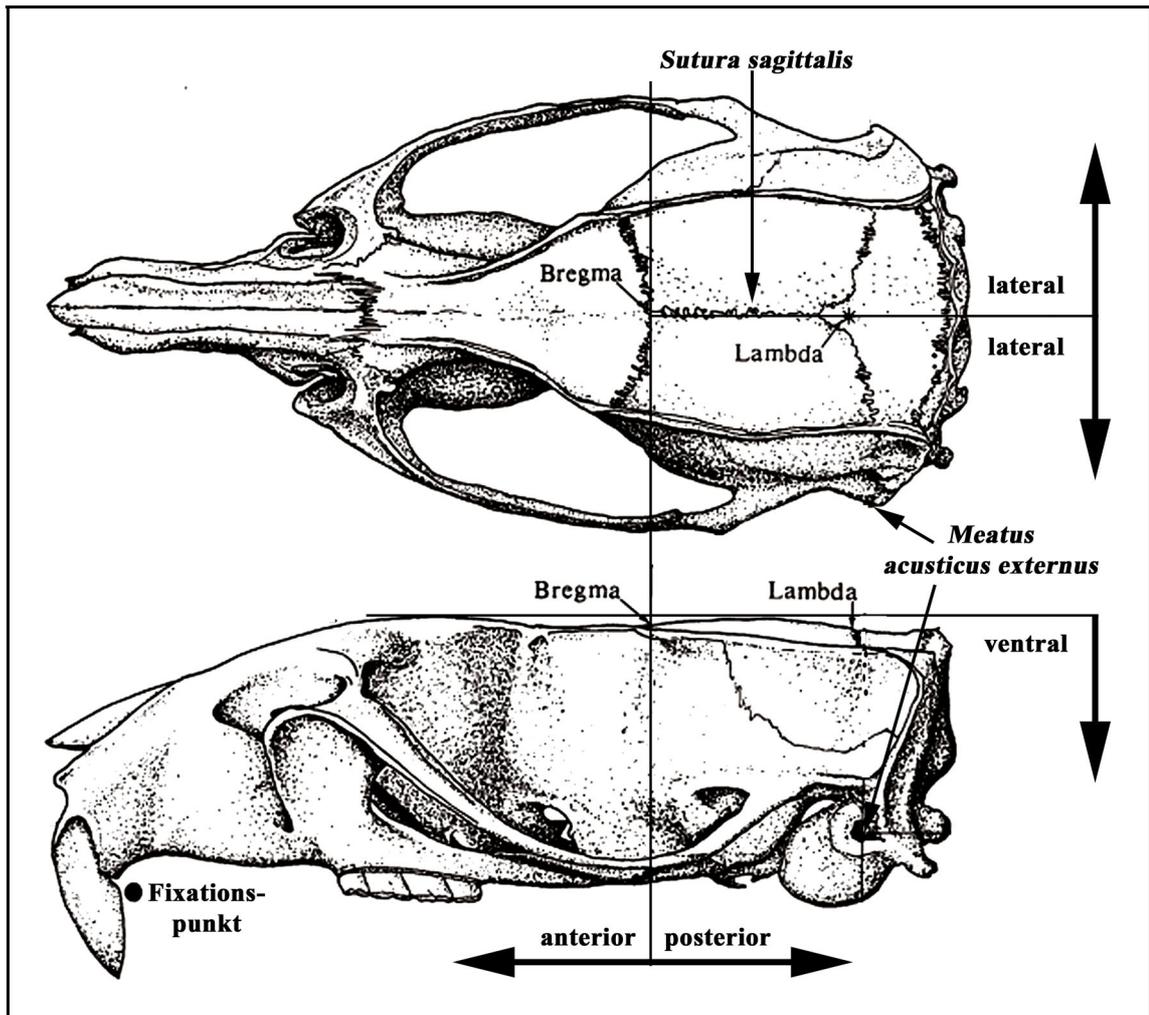


Abbildung 9: Skizzen eines Rattenschädels. Die obere Abbildung zeigt die dorsale Aufsicht und die untere Abbildung die laterale Ansicht. Dargestellt sind die Orientierungspunkte “Bregma“ und “Lambda“, die als Orientierungspunkte für die i.c.v. Kanülierung dienten, sowie der rostrale Fixationspunkt (untere Abbildung) und die Meatus acustici externi als laterale Fixationspunkte (Abbildung modifiziert nach Paxinos & Watson 1998).

Der Knochenzement wurde zwischen der Kanüle und den Schrauben verteilt, so daß die Schrauben und das Wundgebiet vollständig bedeckt waren. Nach ausreichender Aushärtung des Zements wurde die Kanüle von der Führungseinheit getrennt und anschließend mit einem 1cm langen Polypropylenschlauch (PP20, Portex, UK-Hythe) verschlossen, der am Ende zugeschweißt war. Während der Operation wurden die Augen der Tiere mit einer Augensalbe (Bepanthen®, Hoffman-La Roche, D-Grenzach-Wyhlen) bedeckt, um diese vor Austrocknung zu schützen. Alle zur Kanülierung verwendeten Instrumente und Materialien wurden vorher autoklaviert. Die Ratten wurden postoperativ bis zum Abklingen der Narkose unter eine Wärmelampe gelegt.

2.2.3.1 *Angiotensin-II-Trinktest*

Nach einer Woche Erholungszeit wurde der richtige Sitz der Kanülen mit Hilfe eines Trinktestes funktionell überprüft. Zur Auslösung einer Trinkantwort wurde Angiotensin-II (Sigma Chemicals, D-Deisenhofen) als Bolus i.c.v. durch die Kanüle injiziert. Angiotensin-II ist ein stark dipsogen wirkendes Agens, das bei zentraler Applikation in der Lage ist, eine sofortige Trinkantwort auszulösen. Zur Durchführung des Trinktests wurden die Tiere eine Woche vor Versuchsbeginn in den Versuchsraum gebracht, der mit einer telemetrischen Trinkanlage ausgestattet war. Die Tränkeflaschen standen jeweils auf Waagen, wobei letztere mit einem Computer verbunden waren. Somit konnte die Aufzeichnung des individuellen Trinkverhaltens computerunterstützt erfolgen. Zur i.c.v. Applikation wurde ein Polypropylenschlauch (PP20, Portex, UK-Hythe) mit pyrogenfreier physiologischer Kochsalzlösung (0.9%NaCl, Braun- D-Melsungen) (2 μ l) zum Spülen der Kanüle, Angiotensin-II (10ng gelöst in 2 μ l NaCl) zur Stimulation und NaCl (1 μ l) zum Nachspülen mit Hilfe einer Hamilton Spritze (Hamilton, CH-Bonaduz) gefüllt und mit dem caudalen Ende der Kanüle verbunden. Nach Applikation wurde das Trinkverhalten jeder Ratte innerhalb der nächsten 30min minütlich aufgezeichnet (Accudiet, Accuscan Instruments Inc., Omnitech, USA-Ohio). Bei korrekter Plazierung der Kanüle im lateralen Ventrikel kam es zur sofortigen Auslösung einer Trinkantwort. Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes tranken die erfolgreich operierten Tiere durchschnittlich 9ml bis 10ml. Eine verzögerte Trinkantwort, die frühestens 10min nach der Stimulation einsetzte oder die Aufnahme von weniger als 7ml innerhalb dieser 30min, führte zum Ausschluß dieser Tiere vom weiteren Versuch.

2.2.4 *Implantation des Transmitters*

Zur Ermittlung eines der Körperkerntemperatur genäherten Wertes erfolgte die abdominale Implantation eines Temperatursenders am narkotisierten Tier. Dieses lag für die Operation auf dem Rücken, um einen freien Zugriff auf das Abdomen zu haben. Das Abdomen wurde geschoren und desinfiziert und supraumbilikal ein ca. 10-15mm langer medianer Hautschnitt durchgeführt. Danach wurde stumpf bis zur Freilegung der Linea alba weiter präpariert, das Abdomen eröffnet und der Sender intraperitoneal

plaziert. Die Sender wurden zuvor in 70%igem Ethanol desinfiziert und vor dem Einsetzen mit 0.9%iger NaCl abgespült. Peritoneum und Bauchmuskulatur wurden anschließend mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl®, 1.5metric, Fa. Ethicon, D-Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Mersilene, 3 metric, USP2/0, FS1, Ethicon, D-Norderstedt) in Einzelheften vernäht. Die Wundnaht wurde anschließend mit einem aseptischen Sprühverband (Nobecutan-Spray®, Astra Chemicals GmbH, D-Wedel) versorgt.

2.3 Telemetrische Erfassung der Körperkerntemperatur

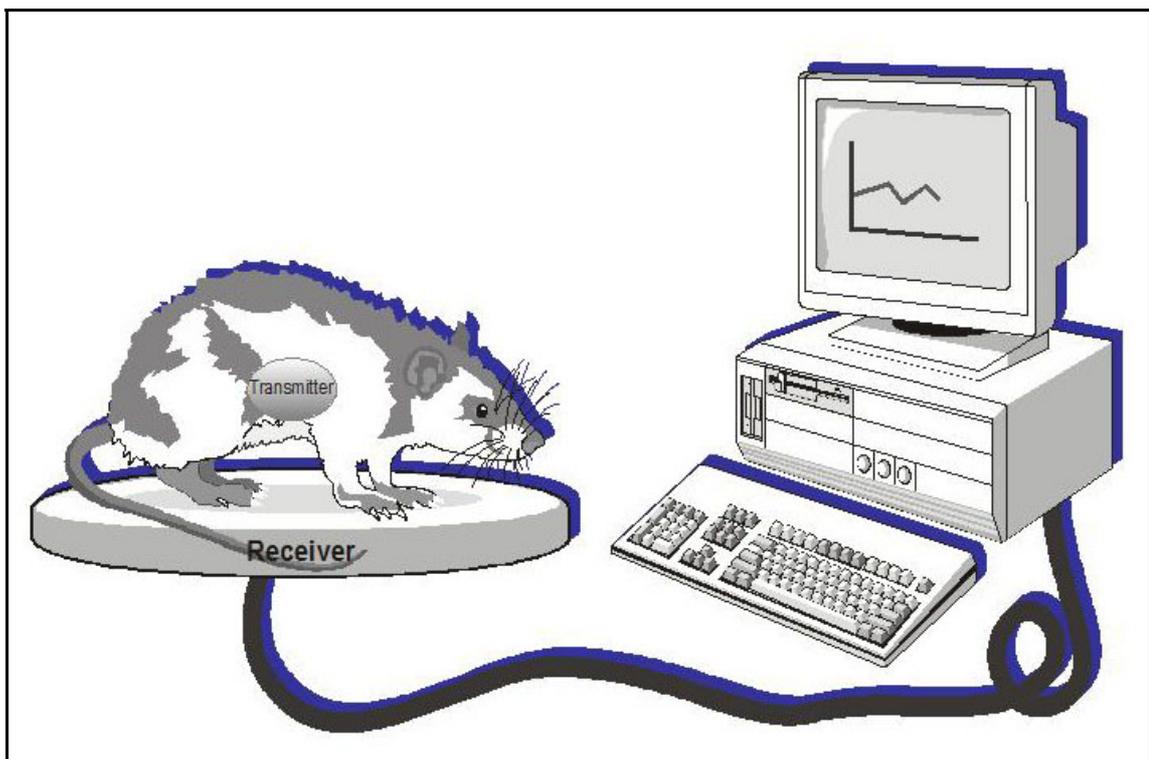


Abbildung 10: Schematische Übersicht der einzelnen Komponenten des telemetrischen Systems zur Aufzeichnung der abdominalen Körpertemperatur. Die Ratte konnte sich während der gesamten Versuchsperiode in ihrem Käfig (nicht dargestellt) frei bewegen. Käfigfläche und Empfängerfläche stimmten überein, so daß sich die Ratte nicht außerhalb der Empfängerfläche aufhalten konnte und dadurch Meßausfälle vermieden wurden (Technische Erläuterungen im Text).

Kapitel 2: Material und Methoden

Die implantierten Sender oder Transmitter (PDT-4000 E-Mitter; Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA) dienten zur telemetrischen Aufzeichnung der abdominalen Körperkerntemperatur während des Versuches. Die Sender waren ca. 1cm lang, besaßen einen Durchmesser von 0.5cm und ein Gewicht von 7g. Hauptbestandteil des Transmitters war der wärmeempfindliche Transistor bzw. ein Thermistor mit einem negativen Temperaturkoeffizienten (NTC). Die Frequenz der vom Sender ausgesendeten Radiosignale ändert sich proportional zur Temperaturänderung. Ein Anstieg der Temperatur resultiert in einem Anstieg der Impulsrate und umgekehrt. Die vom Sender abgegebenen Radiofrequenzsignale (Frequenz in Herz (Hz)) wurden von einem Empfänger (ER-4000 Receiver, Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA), der unter dem Tierkäfig platziert wurde, aufgefangen (Abbildung 9). Ein Datenaquisitionssystem (Vital View, Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR, USA) wurde für die automatische Datenaufzeichnung und -analyse verwendet.

2.4 Verwendete Substanzen

Die verwendeten Substanzen werden mit ihren Abkürzungen und ihrer Herkunft in der folgenden Tabelle dargestellt.

Abkürzung	Substanz	Herkunft
LPS	Lipopolysaccharid von Escherichia coli (Serotyp0111:B4)	Sigma Chemicals, D-Deisenhofen
<i>rr</i>IL-6	Rekombinantes rattenspezifisches Interleukin-6	Dr. Steve Poole (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK)
0.9% NaCl	Pyrogenfreie physiologische (0.9%) Kochsalzlösung	Braun, D-Melsungen

Tabelle 5:
Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Substanzen, ihre Abkürzungen und Herkunft.

2.4.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Bei Ratten läßt sich durch systemische LPS-Applikation von 5-50µg/kg KG eine Fieberreaktion induzieren. Die dabei fieberauslösende Komponente ist das Lipid A (Kapitel 1.4). Das Lipid A des in der vorliegenden Versuchsreihe von *E. coli* (Serotyp 0111:4B) isolierten LPS, besteht aus einem zweifach phosphorylierten Glucoseaminyln-b-1,6-glucosamin-disaccharid, sechs ungesättigten Fettsäuren und drei Alkyloxyalkylgruppen bestimmter Länge und Position.

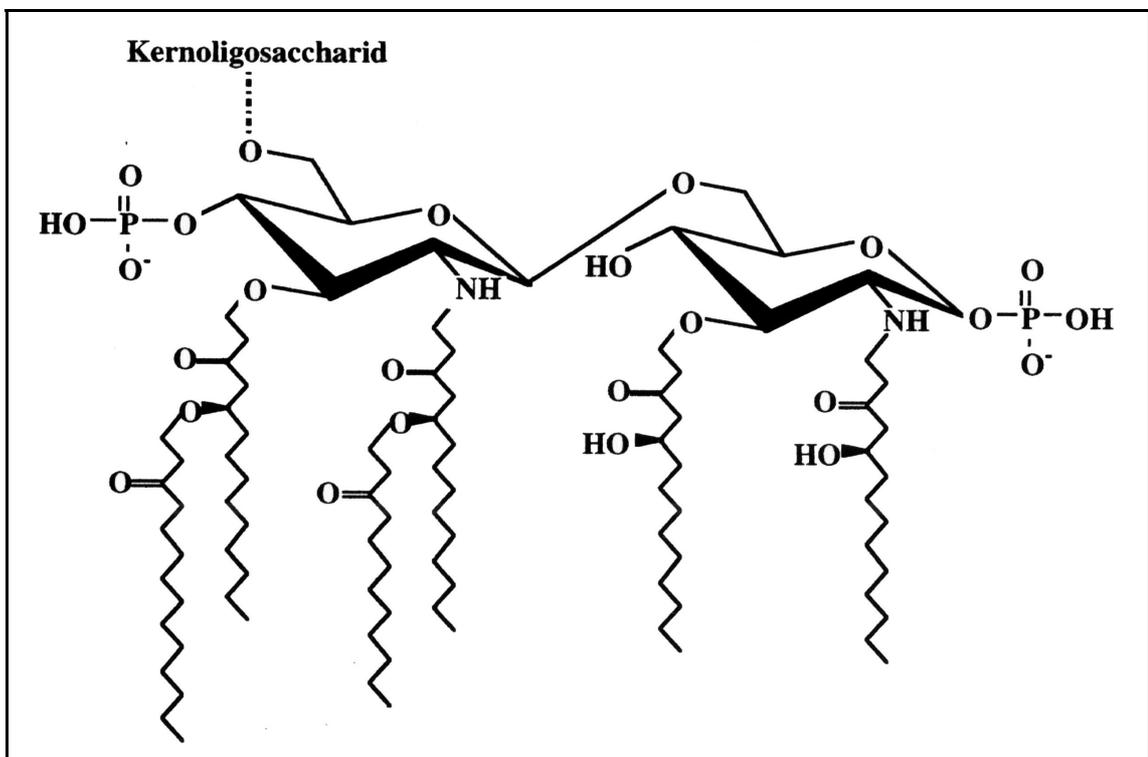


Abbildung 11:
Chemische Struktur des Lipid A (*E. coli*), Bestandteil des Lipopolysaccharid und hauptverantwortlich für die antigene Wirkung des Bakteriums. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die kovalente Bindung zum Kernoligosaccharid (nach Hampton et al. 1991).

Die Dosishöhe, die in vorliegenden Studien den Tieren verabreicht worden ist, führte zu qualitativ und quantitativ reproduzierbaren Ergebnissen. Das ursprünglich pulverförmige LPS wurde mit Hilfe von 0.9%iger NaCl gelöst, aliquotiert und bei -40°C bis zum Versuch gelagert. Diese Aliquots, deren Konzentration 1mg/ml betrug,

Kapitel 2: Material und Methoden

wurden am Versuchstag aufgetaut und mit 0.9% NaCl wurde ein Applikationsvolumina von 500µl mit einer LPS-Konzentration von 100µg/kg KG hergestellt.

2.4.2 *Rekombinantes rattenspezifisches Interleukin-6 (rrIL-6)*

Für die Versuche wurde rrIL-6 verwendet. Das rrIL-6 wurde tiefgefroren auf Trockeneis geliefert und im direkten Anschluß aliquotiert, so daß 10µg rrIL-6 in 50µl 0.9%iger NaCl gelöst waren. Diese Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Vor dem Versuch wurde die benötigte Menge an Aliquots aufgetaut und mit 0.9% NaCl auf ein Endvolumen von 500µl verdünnt, um eine rrIL-6-Konzentration von 45µg/kg KG im Versuchstier zu applizieren.

2.4.3 *Pyrogenfreie physiologische Kochsalzlösung (0.9% NaCl)*

Neben der Verwendung als Mischsubstanz wurde 0.9% NaCl mit einem Volumen von 500µl pro Tier als Kontrollsubstanz für die Versuche verwendet.

2.5 **Verwendete Lösungen und Puffer**

Auch bei den verwendeten Pufferlösungen soll anfangs ein tabellarischer Überblick über die dafür verwendeten Basissubstanzen gegeben werden (Tabelle 6).

Abkürzung	Substanz	Herkunft
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, D- Darmstadt
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat	Merck, D- Darmstadt
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)	Merck, D- Darmstadt
4%ige PFA-Lösung	Paraformaldehyd	Merck, D- Darmstadt
Saccharoselösung	Saccharose	Merck, D-Darmstadt

Tabelle 6:
Übersicht über die verwendeten Grundsubstanzen, die zur Herstellung der Puffer und Lösungen verwendet wurden.

2.5.1 *Phosphatpuffer (PB)*

Der für die immunhistochemische Aufarbeitung verwendete Phosphatpuffer (PB) wurde aus einer 0.2M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)- und einer 0.2M Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)- Stocklösung hergestellt. Die Mischung der Stocklösungen ergab einen 0.2M PB mit einem pH-Wert von 7.2, der durch Zugabe einer äquivalenten Menge Aqua bidest (Milli-Q_{plus}, Millipore, F-Molsheim) auf eine molare Konzentration von 0.1M verdünnt wurde. Der pH-Wert von 7.2 wurde mit einem pH-Teststäbchen (Merck, D-Darmstadt) bestimmt. Für die Stocklösungen selbst wurden 35.6g/l Na_2HPO_4 bzw. 27.6g/l NaH_2PO_4 abgewogen (Mettler P1210N, Mettler Toledo, D-Gießen) und jeweils in 1l Aqua bidest gelöst.

2.5.2 *Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS, 0.9%)*

Grundlage der PBS bildete der PB. Diesem wurde eine entsprechende Menge NaCl (Merck, D-Darmstadt) hinzugegeben (9g NaCl/l), um eine 0.9%ige PBS zu erzeugen.

2.5.3 *Paraformaldehydlösung (PFA 4%)*

Als Basis für eine 4%ige PFA-Lösung diente der PB. Eine entsprechende Menge PFA wurde unter dem Abzug abgewogen (40g/l) und unter Rühren dem PB dazugegeben. Dann wurde die PB-PFA-Suspension auf 100°C erhitzt und so lange gerührt, bis das PFA gelöst und die Lösung klar war. Anschließend wurde die Lösung mit PB auf ein exaktes Volumen aufgefüllt, filtriert und anschließend auf Eis auf 4°C abgekühlt.

2.5.4 *Saccharoselösung (20%)*

Als Basis für eine 20%ige Saccharoselösung diente der PB. Eine entsprechende Menge Saccharose (20g/100ml) wurde abgewogen und unter Rühren dem Phosphatpuffer dazugegeben. Nachdem sich die Saccharose gelöst hatte, wurde die Lösung bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.6 Durchführung der Versuche

2.6.1 *Stimulation der Versuchstiere*

Die Stimulation erfolgte am wachen Tier entweder systemisch durch Injektion der entsprechenden Substanzen in die Bauchhöhle oder zentral durch i.c.v. Applikation.

2.6.1.1 *Periphere Stimulation (intraperitoneal)*

Die stimulierenden Substanzen wie LPS und IL-6, sowie die Kontrollsubstanz NaCl wurden intraperitoneal (i.p.) mit einem jeweiligen Volumen von 500µl injiziert, wobei die Konzentration von LPS 100µg/kg KG und die von IL-6 45µg/kg KG betrug. Die Substanzen wurden zur Applikation in sterile 1ml-Spritzen (BD Plastipak, Bechton-Dickinson, D-Heidelberg) aufgezogen und zur Injektion 12mm lange 26G-Einmal-Insulin-Kanülen (Sterican (45x12mm), Braun, D-Melsungen) verwendet.

2.6.1.2 *Zentrale Stimulation (i.c.v.)*

Ähnlich dem Angiotensin II Trinktest (Kapitel 2.2.2.1) wurde auch die i.c.v. Stimulation mit *rrIL-6* durchgeführt. Mit Hilfe eines sterilen Polypropylenschlauches (PP20), der mit der Kanüle verbunden war, wurden die Substanzen zentral über die Kanüle langsam appliziert. Der Schlauch war gefüllt mit NaCl (1µl) zum Spülen der Kanüle, *rrIL-6* (100 bzw. 200ng/2µl) zur Stimulation und abschließend mit NaCl (2µl) zum Nachspülen, so daß sich ein Gesamtvolumen von 5µl/Tier ergab. Durch Vor- und Nachspülen sollte gewährleistet werden, daß das gesamte *rrIL-6* den Ventrikel erreicht. Als Kontrollsubstanz wurde NaCl mit einem Volumen von 5µl/Tier als Bolus langsam appliziert.

2.6.2 *Aufzeichnung der Körperkerntemperatur*

Während des Versuchszeitraumes erfolgte die automatische Datenaufzeichnung und -analyse durch das Datenaquisitionssystem. Meßperiode und Meßzeitabstände wurden vorher einprogrammiert. Am Vorabend des Versuches wurde die Datenaufzeichnung gestartet und individuell durch den jeweiligen Perfusionszeitpunkt beendet. Die Körpertemperatur wurde während des Versuchszeitraumes kontinuierlich überwacht und

Kapitel 2: Material und Methoden

in 5min Abständen aufgezeichnet. Für eine spätere Auswertung und graphische Darstellung der Daten wurden die Meßwerte von 15min-Intervallen verwendet.

2.6.3 *Perfusion*

Entsprechend der vorgegebenen Zeitpunkte wurden die Tiere perfundiert. Die Tiere wurden in eine tiefe Ketamin-Rompun Narkose gelegt, so daß nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe mit der Perfusion begonnen werden konnte. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage gebracht und auf einer Perfusionswanne fixiert. Als nächstes wurde die Bauchhöhle präumbilikal in der Medianen eröffnet und weiter bis zum Brustkorb freipräpariert. Hierauf erfolgte die Durchtrennung der Rippen und des Zwerchfells sowie anschließend die Fixation des Sternums nach cranial, um eine ausreichende Übersicht zu schaffen. Nun wurde das Herz aus dem Herzbeutel befreit und so ausgerichtet, daß der linke Ventrikel mit einer 40mm langen 18G Einmal-Kanüle (Sterican 1.2x40mm), Braun, D-Melsungen) perforiert werden konnte. Dieser war eine heparinisierte (Liquemin[®] N 25000, Hoffman La Roche, D-Grenzach-Wyhlen) 1ml-Spritze zur Blutabnahme aufgesetzt. Nach Entnahme der Blutprobe wurde in die gleiche Stichstelle eine 18G-Perfusionskanüle (Sterican (1.2x40mm), Braun, D-Melsungen) eingeführt, die mit der Perfusionsanlage verbunden war. Mit Eröffnung des rechten Vorhofes wurde die Anlage angeschaltet, so daß das Blutgefäßsystem zunächst mit ca. 300ml zimmerwarmer PBS (0.1M, pH 7.2) und einem Druck von ca. 120mmHg durchspült wurde. Als Indiz für eine ausreichende Entblutung wurde die Farbe der Leber gewertet, so daß bei ausreichender Blässe die Fixierung mit 400-500ml gekühltem (4°C) 4%igem PFA begonnen werden konnte. Nach Beendigung der Perfusion wurden die Gehirne entnommen.

2.6.4 *Entnahme der Proben*

2.6.4.1 *Blutentnahme nach systemischer Applikation*

Im direkten Anschluß an die Blutentnahme wurden die Blutproben in Reaktionsgefäße von 1.5ml (Fa. Eppendorf-Nethaler-Hinz GmbH, D-Hamburg) überführt und bei

Kapitel 2: Material und Methoden

7000U/min für 5min in einer Tischzentrifuge (MicroV, Fisher Scientific, USA-Denver) zentrifugiert. Anschließend wurde der Plasmaüberstand abpipettiert und in neuen Reaktionsgefäßen bei -40°C eingefroren und bis zur Analyse gelagert.

2.6.4.2 Entnahme der Gehirnproben

Zur Entnahme der Gehirne wurde die Ratte auf den Bauch gelegt und eine Inzision der Haut dorsal der Kalotte vom Os nasale bis zum dritten Halswirbel durchgeführt. Danach wurde die Wirbelsäule zwischen dem zweiten und dritten Halswirbel durchtrennt und vorsichtig mit einer Knochenzange die Medulla oblongata freipräpariert. Danach wurde die Schädeldecke abpräpariert, die Hirnhäute entfernt und das Gehirn so freigelegt, daß es vorsichtig entnommen werden konnte. Die Gehirne wurden am Übergang Cerebrum-Cerebellum durchtrennt und anschließend in 30ml Schraubgläschen mit der Fixierlösung überführt, um sie jeweils für 1h bei 4°C nachzufixieren. Nach ausreichender Fixierung wurden sie in mit Saccharoselösung (20%) gefüllte 30ml Gläschen gegeben, um über Nacht einen kryoprotektiven Schutz vor der weiteren histologischen Verarbeitung zu erhalten. Anzeichen für eine ausreichend lange Einwirkungszeit war das Absinken des Gehirns in der Saccharoselösung.

2.7 Analyse der Proben

2.7.1 IL-6 Bioassay

Zur Bestimmung von bioaktivem IL-6 im Plasma nach systemischer Pyrogen- bzw. Kochsalzapplikation wurde ein IL-6 Bioassay eingesetzt.

2.7.1.1 Prinzip des IL-6-Bioassays

Das Prinzip des IL-6 Assays beruht auf dem wachstumsfördernden bzw. proliferativen Einfluß von IL-6 auf die B9-Hybridoma-Zelllinie (Aarden et al. 1987, Oers et al. 1988).

Kapitel 2: Material und Methoden

Abhängig von IL-6 kommt es zu einer hochspezifischen und dosisabhängigen Stimulation des Zellwachstums. Je höher die vorhandene IL-6 Aktivität ist, desto höher ist die resultierende Zellzahl. Die Zugabe eines Farbstoffs führt zu dessen Verstoffwechslung in den Mitochondrien lebender Zellen. Durch anschließende Zelllyse kann die daraus resultierende optische Dichte photometrisch bestimmt werden. Durch den Einsatz von Verdünnungsreihen ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die durch Verwendung internationaler Standardreihen quantifiziert werden kann und einen internationalen Vergleich zwischen verschiedenen Labors ermöglicht (Meager & Gaines-Das 1994). Alle Arbeiten, d.h. die Passage der Zellen und die Durchführung der Assays, wurden unter sterilen Bedingungen einer Reinarbeitsbank (Microflow, Nunc Int., D-Wiesbaden-Biebrich) durchgeführt.

2.7.1.2 *Verwendete Zelllinie*

Die Quantifizierung der biologischen Aktivität von IL-6 wurde mit der IL-6-abhängigen B9-Hybridoma Zelllinie durchgeführt. Diese wurde von Lansdorp et al. 1986 durch die Injektion von Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentacane) in die Bauchhöhle von Balb/c-Mäusen entwickelt. Die von diesen Mäusen entnommenen Milzzellen wurden mit Hybridplasmazytomzellen (Sp2/0Ag14) fusioniert. Daraus entstand die Hybridoma Zelllinie B 13.29, deren Subklon die im Versuch verwendete B9 Zelllinie ist.

45ml RMPI-Medium	Fa. Life Technologies, Paisley, Schottland
3.8ml FCS	Life Technologies, Paisley, Schottland
0.5ml Glutamin (200nM)	Life Technologies, Paisley, Schottland
[0.5ml IL-6 (500 IU/ml)]	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK
125µl Mercaptoethanol (200mmol/l)	Life Technologies, Paisley, Schottland
65µl Gentamycin	Life Technologies, Paisley, Schottland

Tabelle 7:
Übersicht über die verwendeten Volumina und den Herkunftsort der zur Herstellung der Kulturmedien benötigten Substanzen.

Kapitel 2: Material und Methoden

Diese Zelllinie besitzt eine sehr hohe Sensitivität gegenüber IL-6, so daß der Nachweis der Bioaktivität von IL-6 eines einzelnen menschlichen Monozyten möglich ist (Aarden et al. 1987). Zur Kultivierung der B9-Zellen wurde ein spezielles Kulturmedium verwendet, das aus unterschiedlichen Substanzen hergestellt war (Tabelle 7). Dazu gehörten das "Rothwell Park Memorial Institute Medium" (RPMI 1640), fötales hitzeinaktiviertes Kälberserum (FCS), L-Glutaminsäure, Mercaptoethanol und Gentamycin. Dieses Kulturmedium wurde ebenso als Assaymedium verwendet. Durch weitere Zugabe von human-rekombinantem IL-6 (*hrIL-6*) wurde dieses Kulturmedium als Wachstumsmedium verwendet. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (Queue™, Nunc Int., D-Wiesbaden-Biebrich) bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchte von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5%. Alle drei Tage erfolgte die Passage der Zellen in neues Wachstumsmedium. Von diesem wurden 9ml in einer 50ml Kulturflasche (Greiner GmbH, D-Frickenhausen) vorgelegt und 1ml Zellsuspension aus der alten Kulturflasche hinzupipettiert.

2.7.1.3 Durchführung des IL-6-Bioassays

Die Durchführung der IL-6-Assays erfolgte in sterilen Mikrotiterplatten (Cellstar®, Greiner, D-Frickenhausen) (Tabelle 8) mit 96 Vertiefungen. In jede Vertiefung außer A1 wurden 100µl der aufbereiteten Zellsuspension gegeben. Ab Spalte "C" wurde in jede Vertiefung 100µl Assaymedium zur anschließenden Verdünnung der Plasmaproben gegeben. Zu Beginn des Assays mußten die Zellen bzw. die Zellsuspension von IL-6 befreit werden, damit eventuelle Überreste das Meßergebnis nicht verfälschen konnten. Aus diesem Grund wurde die Zellsuspension für 10min bei 2300U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zusatz von 9ml IL-6-freiem Assaymedium resuspendiert und wieder 10min bei 2300U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, um restliches IL-6 vollständig zu entfernen. Nach erneuter Resuspension wurden 50µl entnommen, auf eine Zählkammer (Hämozytometer nach Thoma) gegeben und die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Anhand der ermittelten Zellzahl wurde eine Zellsuspension hergestellt, die ca. 5000 Zellen/100µl Medium enthielten. Bei jedem Assay wurden zwei Standards und zwei Qualitätskontrollen (QK) erstellt. Die QK und Standards enthielten festgelegte Mengen an *hrIL-6* (Referenz-Code 89/548, National Institute for Biological Standards and

Kapitel 2: Material und Methoden

Control (NIBSC), Potters Bar, GB). Die Konzentrationen der Qualitätskontrollen betragen 10IU/ml (International Units > Internationale Einheiten), 30IU/ml und die des Standards 50IU/ml. Von diesen wurden, wie von den Proben, Verdünnungsreihen erstellt, wobei die einzelnen Proben um den Faktor 1:1 verdünnt wurden. Bei den Standardreihen wurde eine Einfachbestimmung durchgeführt und der Vorgang zehnmal wiederholt, wobei die erste Vertiefung frei blieb.

	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

Tabelle 8:
Schematische Ansicht einer Mikrotiterplatte und des zur Analyse der Plasmaproben verwendeten Verdünnungsschemas.

Bei den Kontrollen und den Proben erfolgte eine Doppelbestimmung, so daß am Ende der Verdünnungsreihe ein Verdünnungsfaktor von 1:16 vorlag (Tabelle 8). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden im Brutschrank wurde in jede Vertiefung 25µl des Farbstoffes MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) mit einer Konzentration von 5mg/ml dazugegeben und für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit setzten mitochondriale Succinyl-Dehydrogenasen lebender Zellen das gelbe MTT-Tetrazoliumsalz in dunkelblaue bis violette MTT-Formazan-Kristalle um (Mosman 1983, Ibelgaufts 1995) (Abbildung 10). Nach der Inkubationszeit wurden aus jeder Vertiefung 125µl vorsichtig (so daß keine Zellen mitgenommen wurden) abpipettiert und verworfen. Danach wurden je 100µl eines Salzsäure- (0.04M) Isopropanol-Gemisches dazugegeben und lichtgeschützt für weitere 12h bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen aufzulösen. Abschließend wurden die Mikrotiterplatten bei einer Wellenlänge von 550nm mit einem

ELISA-Reader (Digiscan, Asys Hitech, A-Eugendorf) photometrisch bestimmt und aufgezeichnet (Mikrowin 2000, Asys Hitech, A-Eugendorf).

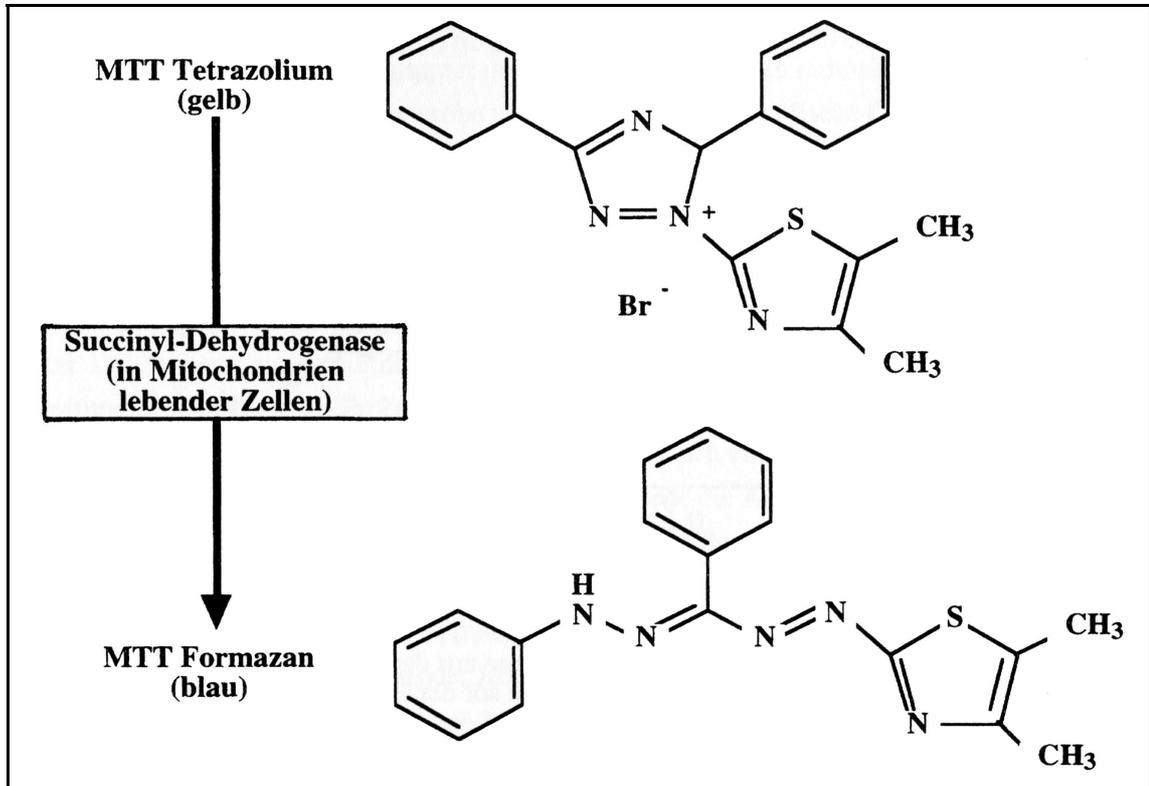


Abbildung 12:
Strukturformeln und Reaktion von MTT.

2.7.2 Immunhistochemische Analyse der Rattengehirne

2.7.2.1 Schneiden der Gehirne am Gefriermikrotom

Nachdem die Gehirne über Nacht in der Saccharoselösung abgesunken waren, wurden sie zum Gefrierschneiden vorbereitet. Überschüssige Saccharoselösung wurde entfernt und das Vorderhirn mit seiner caudalen Schnittfläche auf den Objekthalter des Gefriermikrotoms (Modell 1205, Jung, D-Heidelberg) mit Gefrier-Einbettmedium (Tissue Tec®, Leica Instruments GmbH, D-Nussloch) nach ausreichender Justierung aufgeblickt. Dies erfolgte durch Leitung von CO₂-Gas durch den Objekthalter, wodurch dieser abgekühlt und das Gehirn gleichzeitig von caudal nach cranial durchgefroren

Kapitel 2: Material und Methoden

wurde. Zur Beschleunigung dieses Prozesses wurde über das Gehirn und den Objekthalter ein Deckel gestülpt, so daß das entweichende CO₂ verwirbelt und um das Gehirn geleitet wurde. Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden von den tiefgefrorenen Gehirnen sowohl 40µm als auch 20µm dicke Schnittpräparate angefertigt, die in 0.1M PB sektoriell in geeigneten Gefäßen gesammelt wurden. Dabei handelte es sich um sogenannte "Karussells" (eigene Herstellung) mit einem Durchmesser von ca. 15cm. Diese bestanden aus transparentem Polycarbonat, waren in acht Sektoren unterteilt und ihre Unterseite mit einem feinmaschigen Polyethylenetz (Maschengröße ca. 0.5mm) beklebt. Die Karussells standen in entsprechend großen Glasbehältern (Durchmesser ca. 16cm), die mit 100ml des 0.1M PB gefüllt waren, so daß die Schnitte in den Karussells ausreichend bedeckt waren. Eine optimale Arbeitstemperatur war vorhanden, wenn sich die Schnitte auf dem Messer rollten und mit dem Pinsel einfach aufzunehmen waren.

2.7.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der nukleären STAT3-Translokation

2.7.2.2.1 Grundlage der Immunhistochemie

Die Grundlage der Immunhistochemie bildet die Interaktion hochspezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper (IgG) mit der entsprechenden Zielstruktur, dem nachzuweisenden Antigen. Antigene besitzen spezielle Determinanten (Epitope), die von der hochvariablen F_{ab}-Region des entsprechenden Antikörpers erkannt werden und zur Bildung reversibler Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag-Ak-Komplex) führen. Somit können bei Vorhandensein des spezifischen Antikörpers Antigene jeglicher Art, wie z.B. Proteine oder Peptide in Geweben detektiert werden (Harlow und Lane 1988). Der Nachweis dieser Antigen-Antikörper-Komplexe kann durch verschiedene Methoden, wie z.B. durch die Avidin-Biotin-Methode (Hsu et al. 1981) mit anschließender Diaminobenzidin-Färbung oder durch indirekte Immunfluoreszenz (Coons 1958), erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden eingesetzt, um die Gehirnpräparate immunhistochemisch nach unterschiedlichen Gesichtspunkten auswerten zu können.

2.7.2.2 Avidin-Biotin-Methode

Die Grundlage der Avidin-Biotin-Methode bildet der Einsatz eines biotinylierten Sekundärantikörpers, der sich an den Primärantikörper des Ag-Ak-Komplexes anlagert (Abbildung 13, links). Der Einsatz eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (Abbildung 17) resultiert in einer anschließenden Signalamplifizierung (Abbildung 18), die auf eine hohe Affinität des Avidins gegenüber dem Biotin zurückzuführen ist.

Bei der Anwendung der indirekten Immunfluoreszenz wird an den antigenspezifischen Primärantikörper ein sekundärer, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper angelagert, der gegen die F_c-Region des Primärantikörpers gerichtet ist (Abbildung 13, rechts).

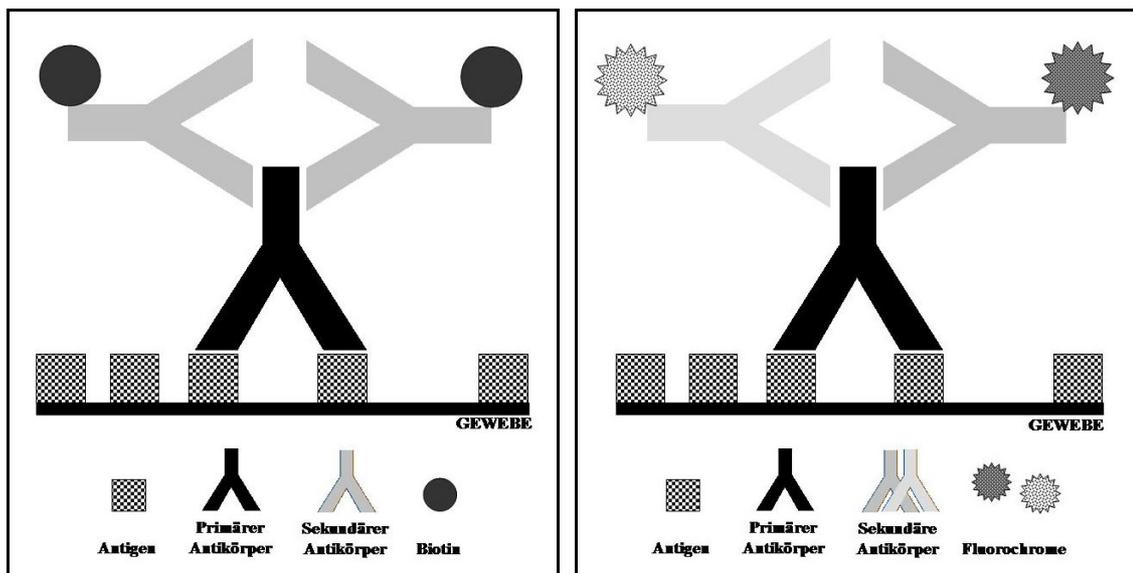


Abbildung 13: Schema einer Ag-Ak-Reaktion und die weitere Reaktion des Ag-Ak-Komplexes mit einem biotinylierten (Abbildung links) oder Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern (Abbildung rechts).

Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird durch Anregung des Fluorophors mit einer geeigneten Wellenlänge sichtbar gemacht, indem es nach entsprechender Filterung zur Emission der längerwelligen Strahlung kommt. Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht durch Verwendung von Primärantikörpern aus unterschiedlichen Tierspezies und Sekundärantikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren eine gleichzeitige Detektion mehrerer Antigene (Abbildung 13, rechts). Durch Einsatz eines biotinylierten

Zweitantikörpers gegen einen der Primärantikörper kann auch bei der indirekten Immunfluoreszenz eine Amplifizierung erfolgen (Abbildung 20).

2.7.2.2.3 Der STAT3 Antikörper

Grundlage der vorliegenden immunhistochemischen Analyse bildet der STAT3-Antikörper. Zum Nachweis zytoplasmatischer und / oder nukleärer STAT3-Immunreaktivität in den Gehirnschnitten, wurde ein im Kaninchen hergestellter polyklonaler STAT3-Antikörper (sc-482, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) eingesetzt. Dieser STAT3-Antikörper bindet im Carboxy-terminalen Ende des STAT3 Antikörpers ein Peptid (AS 750-769), so daß STAT3-Monomere und -Dimere (Kapitel 1.5.1.3) im Zytoplasma (zytoplasmatische STAT3 Immunreaktivität) und (Kapitel 1.5.1.3) STAT3-Dimere im Karyoplasma (nukleäre STAT3 Translokation) detektiert werden können.

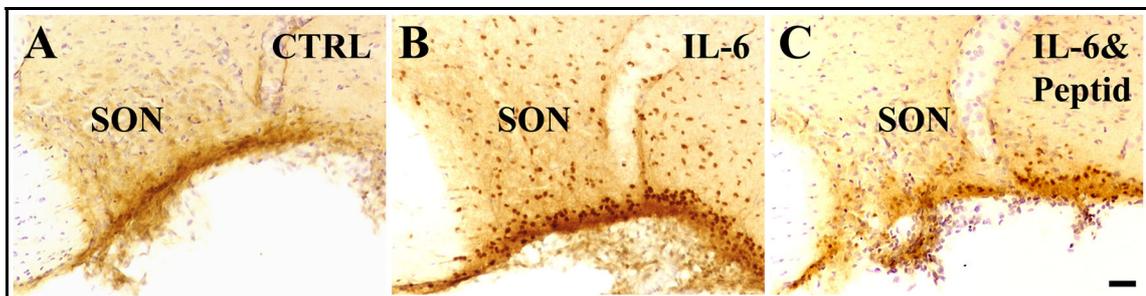


Abbildung 14: Nachweis der Spezifität des STAT3-Antikörpers. Abbildung A-C zeigen den Nucleus supraopticus (SON) 30min nach i.c.v. Stimulation mit *rrIL-6* (200ng/Tier) (IL-6, B/C) oder einer vergleichbaren Menge NaCl (CTRL, A). Der STAT3-Antikörper stellt sich als braunes Reaktionsprodukt dar, das als nukleäres STAT3-Signal im SON und den Meningen 30min nach *rrIL-6*-Stimulation beobachtet werden kann (B). Im Vergleich dazu zeigen die mit dem STAT3-Kontrollpeptid behandelten Gehirnschnitte der *rrIL-6*-stimulierten Tiere eine stark reduzierte STAT3-Immunreaktivität (C), die der STAT3-Immunreaktivität der Kontrollen gleicht (A). Eichbalken für A-C = 50µm.

Die Spezifität dieses Antikörpers war durch vorherige Studien abgesichert (Strömberg et al. 2000) und auch durch eigene Vorversuche bestätigt worden. Dazu wurde der STAT3-Antikörper vor dem Versuch über Nacht mit einem Überschuß eines speziellen

Kapitel 2: Material und Methoden

STAT3-Kontrollpeptids (sc-482 P, Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg) koinkubiert. Dieses besteht aus einer Aminosäuresequenz, die das Bindungspeptid des STAT3 Proteins enthält, wodurch es zur Reaktion des STAT3-Antikörpers mit dem Kontrollpeptid kommt. Dadurch steht der STAT3 Antikörper zur anschließenden Detektion des STAT3-Proteins der Gehirnschnitte nicht mehr zur Verfügung, so daß die STAT3-Immunreaktivität nach *rrIL-6*-Stimulation deutlich reduziert und mit der STAT3-Expression der Kontrolltiere vergleichbar war (Abbildung 14). Weiterhin stellte sich heraus, daß ein Tyramin-Amplifizierungsschritt zur Darstellung der STAT3-Immunreaktivität von Vorteil ist.

2.7.2.2.4 Immunhistochemisches Protokoll

Während des gesamten Inkubationsprotokolls bildete der 0.1M Phosphatpuffer (pH = 7.2) die Grundlage für alle Inkubations- und Waschlösungen. Die Waschschrte erfolgten in den Karussells mit durchschnittlich 100ml 0.1M PB pro Waschgang. Die Inkubationen hingegen fanden in 5ml-Gefäßen (58/485, Sarstedt GmbH, D-Nümbrecht). Sämtliche Inkubationslösungen wurden je nach Volumen in 15ml- oder 50ml-Röhrchen (62.554.502 oder 62.547.254, Sarstedt GmbH, D-Nümbrecht) angefertigt, deren Grundlage neben dem 0.1M PB ein Zusatz von 0.1% Triton X-100 (T 9284, Sigma Aldrich, D-Steinheim) bildete. Sowohl Waschschrte als auch Inkubationen wurden bei Raumtemperatur (RT) unter kontinuierlichem Schwenken (GFL 3011, Gesellschaft für Labordiagnostik mbH, D-Burgwedel) durchgeführt. Der immunhistochemische Nachweis wurde an frisch geschnittenen 40µm dicken Schnittpräparaten durchgeführt, die zu Beginn gewaschen (3x5min, 0.1M PB) und anschließend in einer Lösung aus 0.1M PB, 10% Normal Horse Serum (NHS, B15-122, PAA Laboratories, A-) und 0.3% Triton X-100 zum Maskieren unspezifischer Bindungsstellen für 1h bei RT präinkubiert wurden. Ohne Waschschrte wurden die Schnitte zum Blocken unspezifischer Tyraminbindungsstellen in eine spezielle 0.5%ige Blockungslösung (NEL700, NEN Life Science Products, D-Köln) transferiert und für 30min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Blockungslösung wurde in regelmäßigen Abständen aus einem Blockungspulver und 0.1M PB hergestellt, tiefgefroren und portionsweise bei Gebrauch aufgetaut. Im direkten Anschluß wurden die Schnitte in eine Lösung des primären STAT3-Antikörpers überführt, der mit einer Konzentration von 1:12.000 eingesetzt und

in 0.1M PB mit 2% NHS und 0.1% Triton X-100 gelöst wurde. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 24-48h bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in 0.1M PB, wurden die Schnitte mit einem zweiten biotinylierten anti-Kaninchen Antikörper (1:200, Vector BA-1000, Linaris Biologische Produkte, D-Wertheim-Bettingen) für 1h bei RT inkubiert. Der in der Ziege hergestellte Zweitantikörper wurde in 0.1M PB mit 0.1% Triton X-100 gelöst. Nach erneutem Waschen erfolgte der Tyramin-Amplifizierungsschritt mit einem kommerziell erhältlichen Tyramin-Amplifizierungskit (NEL700, NEN Life Science Products, D-Köln). Der Amplifizierungsschritt setzte sich aus mehreren Schritten zusammen. Zuerst wurden die Schnitte mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Merrettich-Peroxidase, 1:100, 0.1M PB, 0.1% Triton X-100) für 30min unter Lichtausschluß bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Tyramin (1:100) für 10min abgedunkelt bei RT. Der Mechanismus, der bei den zwei Reaktionen ablief, soll nachfolgend erklärt werden. Während der ersten Inkubation reagieren freie Streptavidin-Moleküle mit den biotinylierten Stellen des zweiten Antikörpers (Abbildung 15).

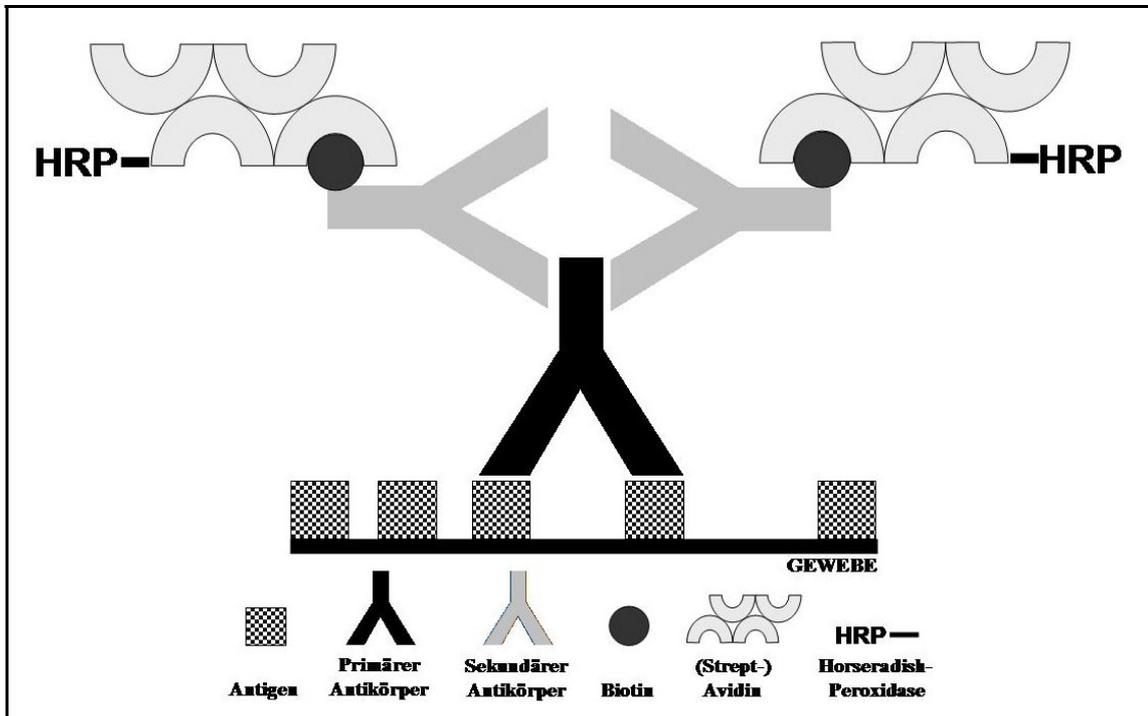


Abbildung 15:
Schema des ersten Teilschrittes der Tyramin-Amplifizierung: Reaktion des Avidin-Biotin-Komplexes mit dem biotinylierten Zweitantikörper (Beschreibung im Text).

Die konjugierte HRP aktiviert die im nächsten Schritt dazu gegebenen biotinylierten Tyraminderivate (Abbildung 16). Dadurch entstehen hochreaktive und kurzlebige Tyraminradikale, die mit nukleophilen Molekülen eine kovalente Bindung eingehen. Somit kommt es zur Dimerisierung des biotinylierten Tyramins mit tyrosinhaltigen Protein- bzw. Peptidstrukturen des Primär- und Sekundärantikörpers sowie des Gehirngewebes (Abbildung 16). Die Bindungs- oder Interaktionsmöglichkeiten des Tyramins sind durch die vorangegangene Absättigung der unspezifischen Tyraminbindungsstellen eingeschränkt und von der Anwesenheit der HRP abhängig, die die Dimerisierung des Tyramins mit den tyrosinhaltigen Strukturen enzymatisch katalysiert. Dadurch kann das Tyramin nur am oder in unmittelbarer Umgebung der HRP und damit des Ag-Ak-Komplexes binden (Abbildung 16).

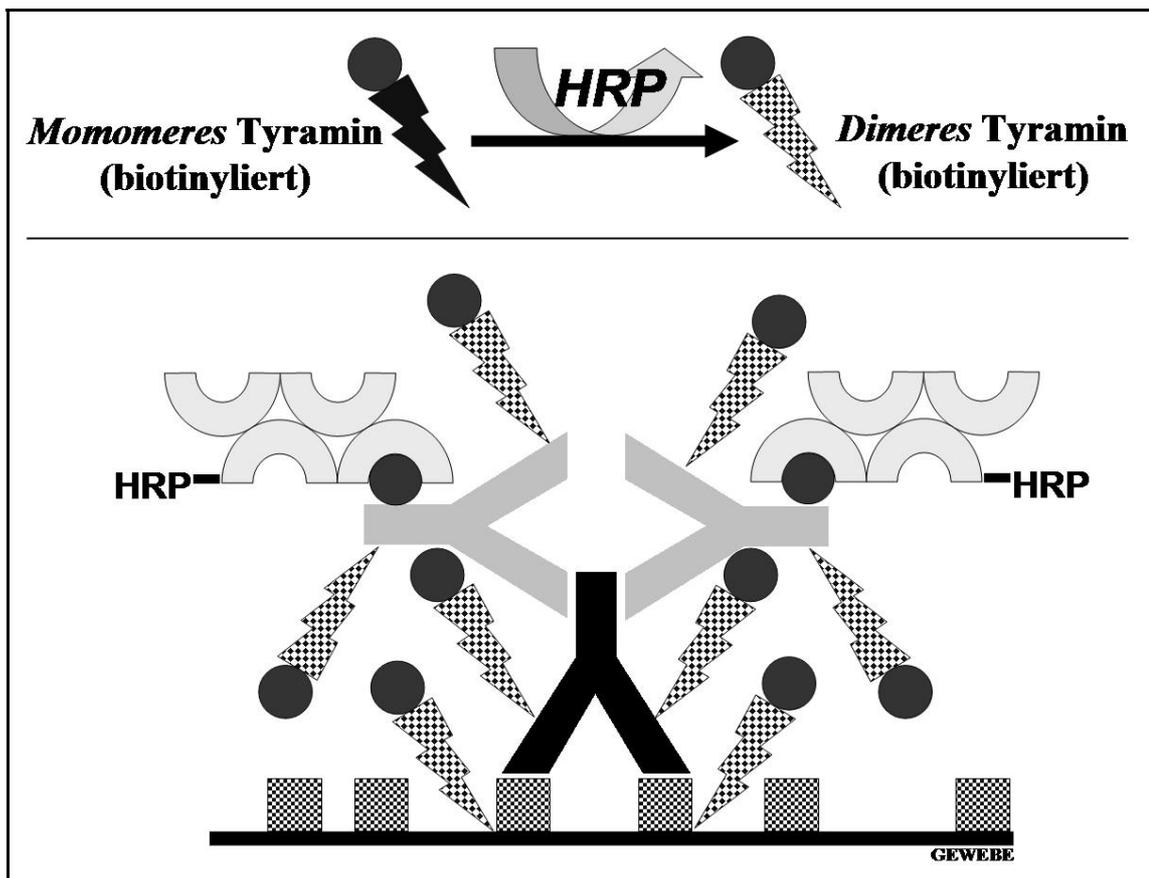


Abbildung 16:
Schematische Darstellung des zweiten Teilschrittes der Tyraminamplifizierung: Reaktionsablauf nach Zugabe von Tyramin (Legende siehe Abbildung 15, weitere Erläuterungen im Text).

Nach Abschluß des Tyramin-Amplifizierungsschrittes war nun eine Vielzahl von Biotinmolekülen am Ag-Ak-Komplex vorhanden. Nach einem weiteren Waschschrift wurde nun mit unterschiedlichen Nachweisstrategien weitergearbeitet. Zum einen sollte mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) eine nukleäre STAT3-Translokation, zum anderen durch Immunfluoreszenz der zelluläre Ursprung einer eventuellen nukleären STAT3-Translokation nachgewiesen werden.

Nachweis der nukleären STAT3 Translokation durch die Avidin-Biotin-Methode

Zu diesem Zweck wurden die Schnitte mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter HRP (Vector Elite Kit, A-2100, Linaris Biologische Produkte, D-Wertheim-Bettingen) inkubiert. Die Lösung dafür wurde mindestens 30min vor Inkubationsbeginn angesetzt, damit Reagenz A (Avidin, 1:100) und Reagenz B (biotinylierte HRP, 1:100) ausreichend Zeit zur Komplexbildung hatten (Abbildung 17). Diese lagerten sich während der einstündigen Inkubationszeit bei RT an die freien Biotinstellen an (Abbildung 18). Mit diesem Schritt war die Amplifizierung des Antigen-Antikörper-Komplexes abgeschlossen.

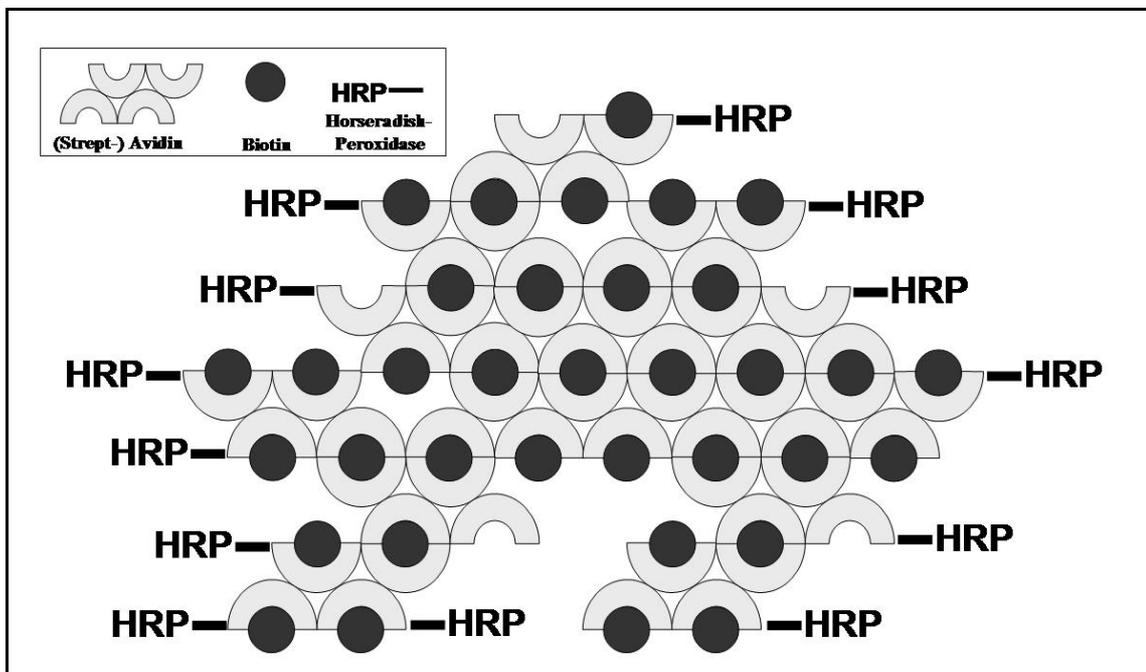


Abbildung 17:
Schema der Komplexbildung von Avidin und Biotin-HRP (ABC-Kit, Beschreibung im Text).

Darstellung der nukleären STAT3-Translokation mit Diaminobenzidin (DAB)

Zur Darstellung dieser hochgradigen Signalamplifizierung wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen mit Puffer in Diaminobenzidin-Tetrahydrochloride (DAB, D-5637, Sigma Aldrich, D-Steinheim) für 15min abgedunkelt bei RT inkubiert. Zur Herstellung der DAB Lösung wurden tiefgefrorene DAB-Aliquots von 50mg ca. 15min vor der Reaktion in 100ml 0.1M PB gelöst und die Schnitte damit ca. 15min lichtgeschützt inkubiert.

Für diese Reaktion war die HRP als enzymatischer Katalysator unabdingbar. Somit konnte die Umsetzung von DAB von seiner löslichen (violett) in die feste Form (braun) (Abbildung 19) nur im Bereich der "HRP-Enzymwolke", also in Nähe des Ag-Ak-Komplexes (Abbildung 18) stattfinden.

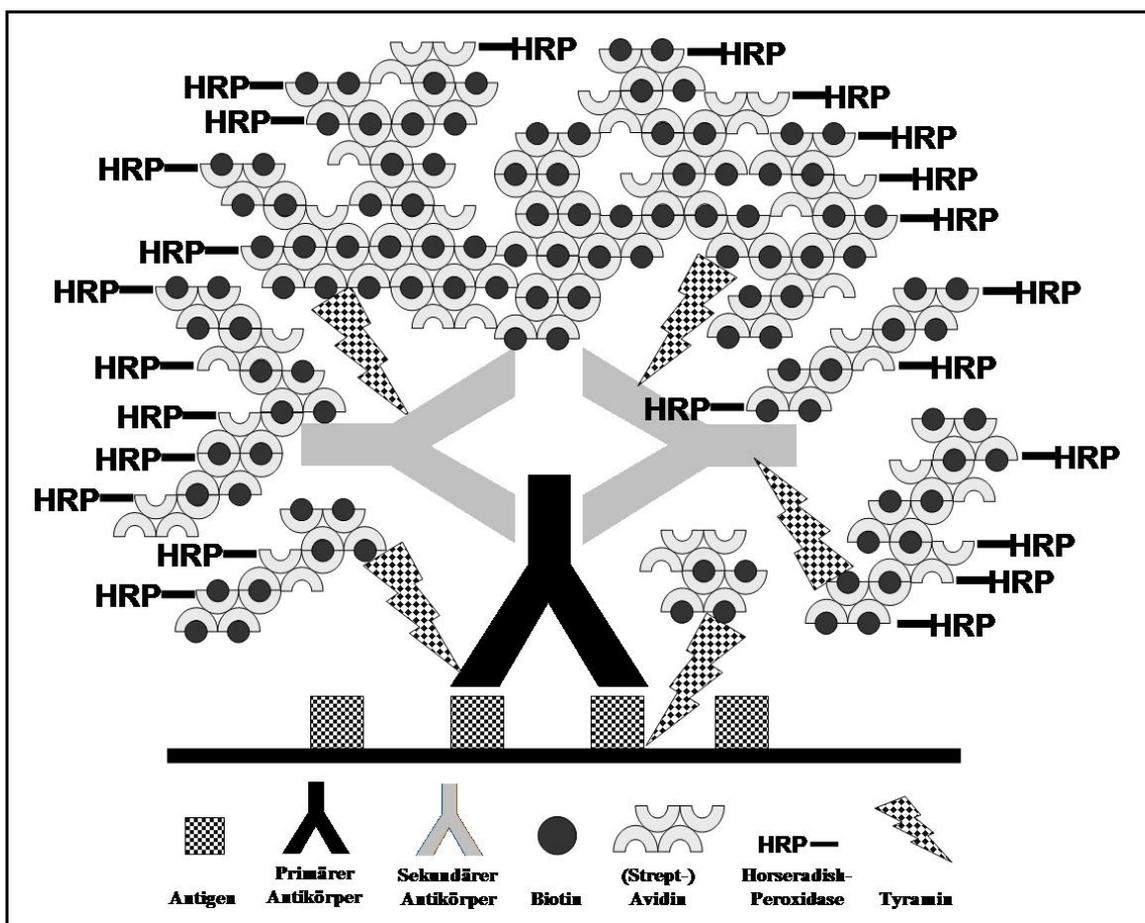


Abbildung 18:
Schematische Darstellung des dritten Teilschrittes der Tyraminamplifizierung: Anlagerung der Avidin-Biotin-Komplexe an den biotinylierten Sekundärantikörper (Erläuterungen im Text).

Während der Inkubationszeit konnte sich das lösliche DAB unter anderem im Bereich dieser Enzymwolke verteilen und durch anschließende Zugabe von 30µl 10%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , ca. 3min) sichtbar gemacht werden, das den Beginn der enzymatischen Umsetzung von DAB durch die HRP katalysierte.

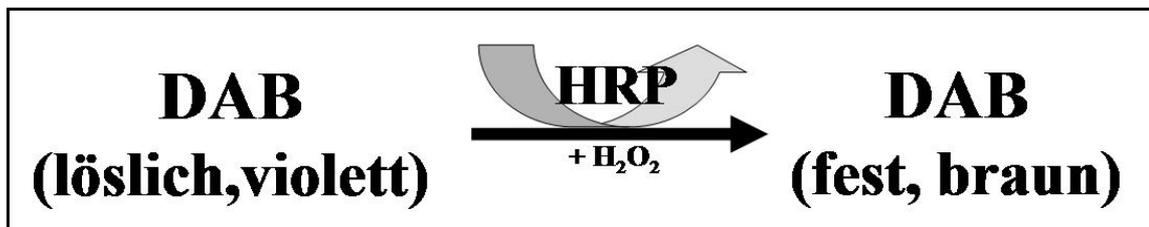


Abbildung 19:
Reaktion von DAB unter Einwirkung von HRP und H_2O_2 , das nach der Reaktion braun ausfällt.

Im Anschluß daran wurden die Schnitte in PB gewaschen, auf gelatinebeschichtete Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen und getrocknet. Nach ihrer Trocknung wurden die Schnitte mit Kresylviolett (Fluka AG, CH-Buchs) gegengefärbt. Vorher wurden sie für 2h in HistoClear (HS 200, Plannet GmbH, Wetzlar) gereinigt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach Entfernen der Alkoholreste mit Aqua bidest erfolgten die Gegenfärbung mit Kresylviolett und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Danach wurden die Schnitte noch einmal für 10min in HistoClear und anschließend bis zum Deckeln in Xylol (Braun, D-Melsungen) transferiert. Gedeckelt (Menzel GmbH, D-Braunschweig) wurde zügig mit Entellan® (Merck, D-Darmstadt), so daß die Schnitte dabei nicht eintrocknen konnten.

Darstellung der nukleären STAT3-Translokation durch indirekte Immunfluoreszenz

Auch bei der indirekten Immunfluoreszenz kann unter Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers das Immunfluoreszenzsignal mit der Tyramin- und Avidin-Biotin-Amplifizierungsmethode verstärkt werden. In einem weiteren Schritt erfolgt die Inkubation mit Avidin- oder Streptavidin- gekoppelten Fluorophoren, die sich an die biotinylierten freien Stellen anlagern (Abbildung 20).

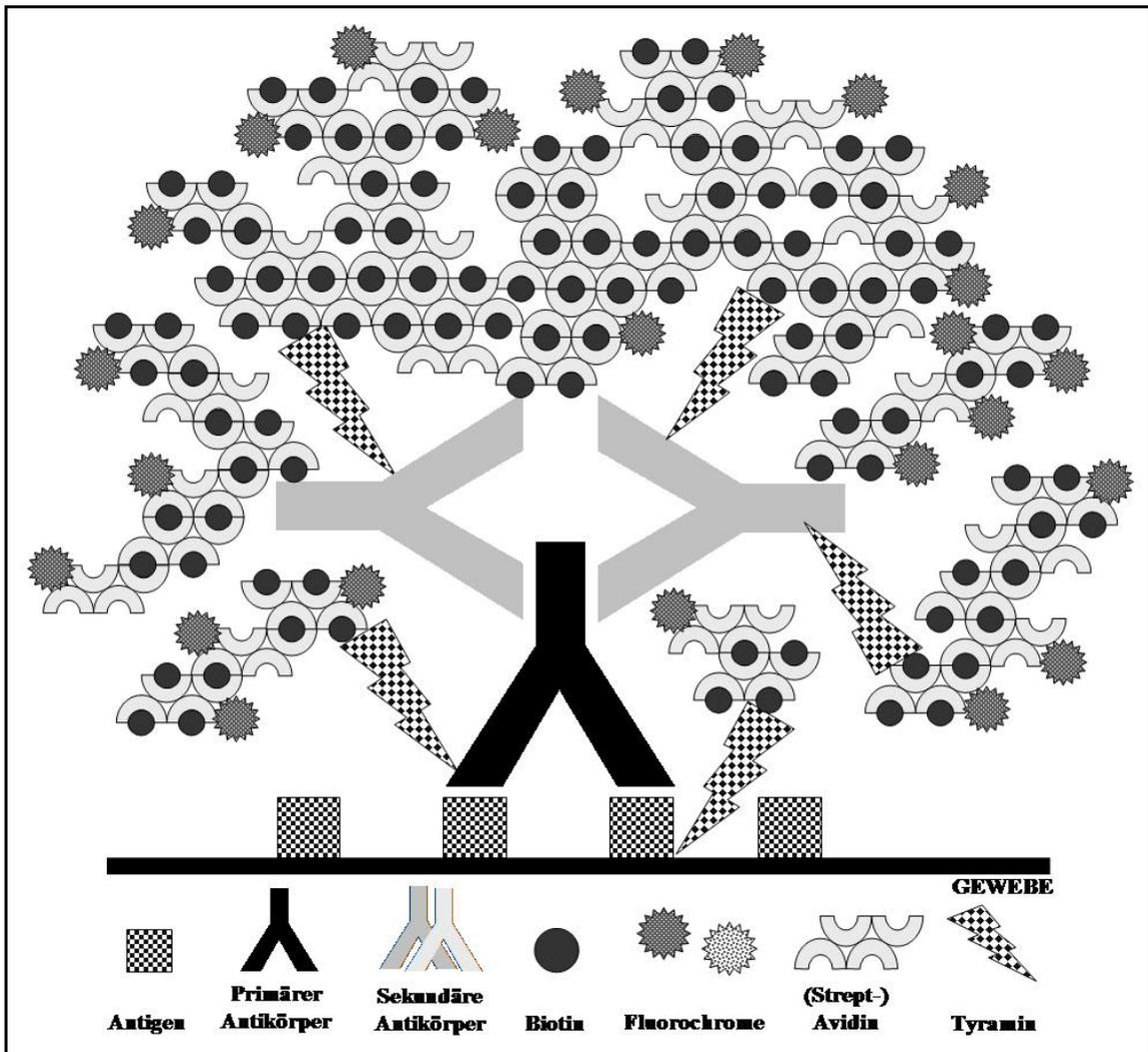


Abbildung 20:
Schematische Darstellung der Tyramin-Signalamplifizierung bei der indirekten Immunfluoreszenz, wobei die (Strept-) Avidinmoleküle mit einem Fluorochrom gekoppelt sind.

2.7.2.3 Bestimmung des zellulären Ursprungs der nukleären STAT3-Translokation durch indirekte Immunfluoreszenz

Zur näheren Charakterisierung des Ursprungs der nukleären STAT3-Translokation in Zellen des OVLT und SFO wurden Kolokalisationsstudien des STAT3-Antikörpers mit zellspezifischen Markerproteinen durchgeführt.

Tabelle 9 liefert eine Übersicht dieser spezifischen Marker, die zeigen sollten, ob die nukleären STAT3-Signale endothelialen, glialen oder neuronalen Ursprungs waren.

Kapitel 2: Material und Methoden

Weiterhin wurde ein Zellkernmarker eingesetzt, um nachzuweisen, daß die STAT3-Signale wirklich nukleären Ursprungs sind sowie ein Marker zum Nachweis nitrerger Neurone verwendet. Zur Charakterisierung der STAT3-positiven Zellen wurden neben monoklonalen Primärantikörpern, wie anti-APC, anti-GFAP und anti-CD11b auch polyklonale Erstantikörper, wie anti-c-Fos und anti-vWF verwendet (Tabelle 9).

Marker	Bezeichnung der Zellmarker / Marker (spezifisch) für	Herkunft und Konzentration des Markers
anti-STAT3 <i>(polyklonal, made in rabbit)</i>	Signal Transduktor und Aktivator der Transkription 3 <i>STAT3</i>	sc-482; Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg; <i>1:12.000</i>

und

anti-APC <i>(monoklonal, made in mouse)</i>	Adenomatous Polyposis Coli <i>Oligodendrozyten</i>	OP 80; Calbiochem, D-Bad-Soden; <i>1:200</i>
anti-GFAP <i>(monoklonal, made in mouse)</i>	Glial Fibrillary Acidic Protein (Saures Gliales Faserprotein) <i>Astrozyten</i>	MAB 3408; Molecular Probes, MoBiTec GmbH, D-Göttingen; <i>1:2.000</i>
anti-rat-CD11b <i>(monoklonal, made in mouse)</i>	Cluster of Differentiation 11b <i>Mikroglia</i>	MCA 275R; Serotec GmbH, D-Düsseldorf; <i>1:500</i>
anti-vWF <i>(polyklonal, made in sheep)</i>	Von-Willebrand-Faktor <i>Endothelzellen</i>	SARTW-IG; Haemochrom Diagnostica GmbH, D-Essen; <i>1:3.000</i>
anti-NeuN <i>(monoklonal, made in mouse)</i>	Neuron-Specific Nuclear-Protein oder Neuronal Nuclei (Neuronenspezifischer Zellkernmarker) <i>Neuronale Zellkerne</i>	MAB377;Molecular Probes, MoBiTec GmbH, D-Göttingen; <i>1:100</i>
anti-c-Fos <i>(polyklonal, made in rabbit)</i>	c-Fos <i>Neuronale Zellen</i>	sc-52; Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg; <i>1:1.000</i>

Tabelle 9:

Tabellarische Übersicht über die verwendeten Zellmarker, ihre Abkürzungen, Bezeichnungen sowie ihre Herkunft und ihre eingesetzten Konzentrationen.

Kapitel 2: Material und Methoden

Das Protokoll der indirekten Immunfluoreszenz unterschied sich von dem vorangegangenen Protokoll durch den gleichzeitigen Einsatz eines weiteren Primärantikörpers neben STAT3. Aus diesem Grund sollen im folgenden Protokoll alle Schritte dargestellt, aber nur die spezifischen Unterschiede ausführlich beschrieben werden.

Für diese Methode der indirekten Immunfluoreszenz wurden von jedem Tier 20µm Schnitte angefertigt, die in mehreren Schnittserien (max. 3) parallel gesammelt wurden. Dadurch konnten verschiedene Antikörper an Gehirnpräparaten desselben Tieres parallel getestet und dadurch die benötigte Tierzahl reduziert werden. Die Gehirnschnitte wurden nach Maskierung unspezifischer Bindungs- und Tyraminbindungsstellen für 24-48h mit anti-STAT3 allein (c-Fos, vWF) oder mit einem weiteren Primärantikörper (anti-APC, anti-GFAP, anti-rat CD11b, anti-NeuN) bei 4°C inkubiert. Die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen von STAT3 und anti-vWF machten es nötig, den vWF-Antikörper erst im Anschluß an diese Inkubation einzusetzen. Während sich die anderen Schnittserien noch in der Inkubation mit ihren Primärantikörpern befanden, wurde die anti-vWF-Serie gewaschen und anschließend für 1h bei RT mit dem vWF-Antikörper inkubiert. Danach wurden alle Schnittserien gewaschen und das Signalamplifizierungsprotokoll für den STAT3-Antikörper durchgeführt. Dazu erfolgte die Inkubation der Serien mit dem in der Ziege hergestellten biotinylierten anti-Kaninchen Antikörper (1:200, Vector BA 1000, Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen). Im Anschluß daran wurden der Tyramin-Amplifizierungsschritt und die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex durchgeführt und die Serien anschließend 3x5min in 0.1M PB gewaschen. Die bis dahin nur mit dem STAT3-Antikörper inkubierte Serie wurde einer Inkubation mit dem c-Fos-Antikörper für 24-48h bei 4°C unterzogen. Die Inkubation mit anti-c-Fos erfolgte nach Abschluß des STAT3-Protokolls, da sowohl anti-STAT3 als auch anti-c-Fos im Kaninchen hergestellt worden waren und eine direkte Koinkubation dieser beiden Antikörper zu Kreuzreaktionen führen würde.

Nun erfolgte die Inkubation der Serien mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern oder Fluorophor-gekoppeltem (Strept-) Avidin. Tabelle 10 liefert eine Übersicht über die eingesetzten Substanzen und ihre Konzentrationen, die in 0.1M PB (0.1% Triton X-100) gelöst und worin die Gehirnschnitte lichtgeschützt für 1h bei RT inkubiert wurden.

Erstantikörper	Fluorochrome und F.-gekoppelte Zweitantikörper Konzentration	Herkunft
anti-STAT3	Avidin (FITC-gekoppelt) 1:200	A 200, Linaris GmbH, D-Wertheim-Bettingen;
anti-STAT3 (mit vWF)	Streptavidin (Cy3-gekoppelt) 1:800	016-160-084, Jackson Immuno- Research, West Grove USA

und

anti-APC anti-GFAP anti-rat CD11b anti-NeuN	sheep anti-mouse (Cy3-gekoppelt) 1:600	C 2181, Sigma-Aldrich, D- München
anti-wWF	mouse anti-sheep (FITC-gekoppelt) 1:250	713-095-147, Jackson Immuno- Research, West-Grove, USA
anti-c-Fos	goat anti-rabbit (Cy3-gekoppelt) 1:600	C 2306, Sigma-Aldrich, D-München

Tabelle 10:

Tabellarische Übersicht über die verwendeten Fluorochrom-gekoppelten (Strept-) Avidine und Sekundärantikörper für die gleichzeitige (Doppel-) Markierung von STAT3 mit unterschiedlichen zell-spezifischen Markerproteinen.

Nach 3x5min Waschen (0.1M PB) wurden die Schnitte mit dem zellkernspezifischen Marker DAPI (Tabelle 11) inkubiert. Dieser interagiert mit der doppelsträngigen DNA und ist somit im Zellkern nachweisbar.

Substanz	Konzentration	Marker für	Herkunft
DAPI (4',6-diamidino-2-di- phenylindol-dilaktat)	1:800	Unspezifischer Zellkern- marker	D3751, Molecular Probes, MoBiTec GmbH, D-Göttingen

Tabelle 11:

Eigenschaften von DAPI.

Kapitel 2: Material und Methoden

DAPI war in Aliquots bei -20°C tiefgefroren und wurde vor Inkubationsbeginn in 0.1M PB mit 0.1% Triton X-100 gelöst und in einer Konzentration von 1:800 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei RT für 5min. Mit der DAPI-Inkubation und einem anschließenden Waschgang war der Hauptteil des Protokolls abgeschlossen.

Die Schnitte wurden auf gelatinebeschichtete Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen und leicht angetrocknet. Ein Teil der Schnitte wurde mit Objektgläschen (Menzel GmbH, D-Braunschweig) blasenfrei mit Citifluor (Citifluor AF1, Citifluor Products, GB-Kent) gedeckelt. Der andere Teil der Schnitte wurde im Anschluß daran einer enzymhistochemischen NADPH-Diaphorasefärbung unterzogen. Diese Färbung basiert auf der Reduktion von Tetrazoliumfarbstoffen. Diese Reduktion erfolgt in Abhängigkeit von NADPH durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) des fixierten Gewebes. Deshalb wird diese Reduktion auch als endogene NADPH-Diaphoraseaktivität bezeichnet. Damit kann diese Reaktion für eine enzymhistochemische Untersuchung zur Lokalisation der NOS-Isoenzyme genutzt werden. Für die lichtmikroskopische Analyse hat sich der Einsatz von Nitroblau-Tetrazolium (NBT, Tabelle 12) als Protonenakzeptor bewährt, das bei der NADPH-Diaphorasefärbung (Tabelle 12) einen wasserunlöslichen, tiefblauen NBT-Formazanniederschlag am Ort der enzymatischen Reaktion hinterläßt.

Substanz	Konzentration	Marker für	Herkunft
β -NADPH+H ⁺ β -Nicotinamid-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)	1:200	Nachweis der neuronalen Stickstoffmonoxid synthase (nNOS)	SIGMA 205-201; Sigma Aldrich, D-Deisenhofen
& NBT (Nitroblau-Tetrazolium)	1:100	(- nitrerger Neurone)	SIGMA N-6876; Sigma Aldrich, D-Deisenhofen

Tabelle 12:
Übersicht über die zur NADPH-Diaphorase-Färbung verwendeten Substanzen (Erläuterungen im Text).

Kapitel 2: Material und Methoden

So können Zellkörper und im Falle des Isoenzym Typ1 der NOS, der neuronalen NOS (nNOS), auch dendritische und axonale Zellausläufer spezifisch angefärbt werden, wobei aus der basischen Aminosäure L-Arginin sowohl L-Citrullin als auch das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) unter Mitwirkung wasserstoffübertragender Kofaktoren gebildet wird (Schmidt et al. 1993). Die NADPH-Diaphorasefärbung ist zum Nachweis und zur Lokalisation von Stickstoffmonoxid-produzierenden Neuronen und Nervenfasern eingesetzt worden.

Die Gewebeschnitte wurden zu diesem Zweck in 0.1M PB mit einem pH von 8.0 über Nacht bei 4°C rehydriert. Anschließend wurde mit dem gleichen Puffer eine Inkubationslösung mit β -NADPH (1:200), NBT (1:100) und 0.3% Triton X-100 angesetzt. Dies erfolgte 30min vor der Inkubation lichtgeschützt in 100ml PB, damit sich die ursprünglich pulverförmigen Substanzen unter Rühren bei 37°C lösen konnten. Die Schnitte wurden in dieser Lösung für 4h bei 37°C im Dunkeln inkubiert, anschließend 3x20min gewaschen und wie oben beschrieben mit Citifluor gedeckelt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.8 Graphische Auswertung und Statistik

2.8.1 *Telemetriedaten*

Die über den Zeitraum von -120min bis 480min aufgezeichneten Daten der Körperkerntemperaturen wurden von Vital View in Exceltabellen überführt. Die graphische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot (Jandel Scientific, CA-Corte Madera). Die Werte der abdominalen Körpertemperatur der verschiedenen Gruppen wurden als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat (Jandel Scientific, CA-Corte Madera). Die Körpertemperaturen der LPS- und IL-6-stimulierten Tiere wurden mit den Körpertemperaturen ihrer entsprechenden Kontrollen verglichen. Dies erfolgte mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), der ein Bonferroni's post-hoc-Test angeschlossen wurde.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ lagen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen vor.

2.8.2 *IL-6-Bioassay*

Die photometrisch gemessenen Daten wurden mit Hilfe eines Kalkulationsprogrammes (Microsoft Excel 7.0) ausgewertet. Dabei wurden die Standardwerte der Absorption bzw. der optischen Dichte auf der Ordinate gegen ihre jeweiligen IL-6-Konzentrationen auf der Abszisse aufgetragen, um eine Eichkurve zu erstellen. Es wurden die Verdünnungen der einzelnen Proben gewählt, die in den Bereich der Eichkurve fielen. Deren jeweilige IL-6-Konzentration (IU/ml) wurde mit Hilfe der Regressionsgleichung der Eichkurve (Abbildung 21) und des Verdünnungsfaktors der jeweiligen Probe errechnet. Je höher die Konzentration an IL-6 in der Probe war, desto höher war die optische Dichte, die bei 550nm ermittelt wurde. Denn je höher die IL-6-Konzentration war, desto mehr Zellen überlebten und verstoffwechselten MTT in den Mitochondrien zu blauen Formazankristallen, deren Quantität nach ihrer Auflösung bei 550nm gemessen wurde. Diese Daten wurden anschließend mit SigmaPlot bearbeitet und als Mittelwerte mit Standardfehler graphisch wiedergegeben.

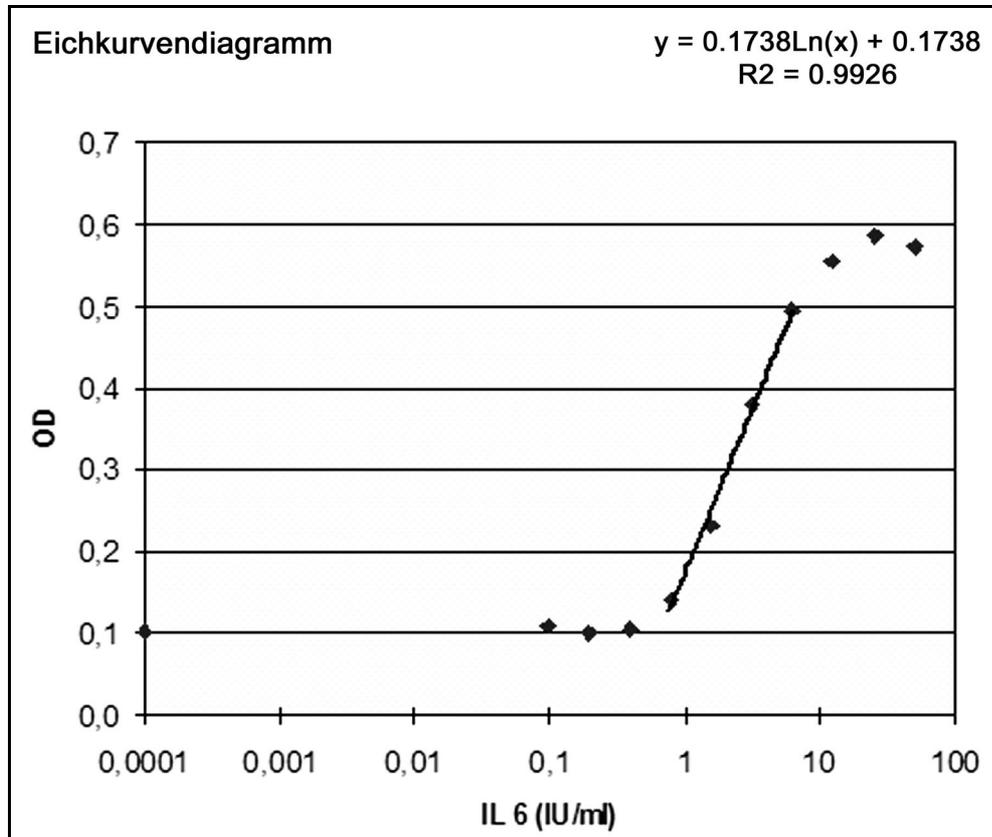


Abbildung 21:
Darstellung eines Eichkurvendiagramms eines IL-6-Assays.

Kapitel 2: Material und Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat (Jandel Scientific, CA-Corte Madera). Die Werte der zirkulierenden IL-6-Menge wurden ebenfalls als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Plasma IL-6 der LPS- und IL-6-stimulierten Tiere wurden mit ihren jeweiligen Kontrollen verglichen, sowie die Werte von Plasma IL-6 von LPS- und IL-6-stimulierten Tieren untereinander. Mit diesen Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, der sich der post-hoc-Test nach Scheffé anschloß. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ vor.

2.8.3 Mikroskopisch-histologische Auswertung

2.8.3.1 Durchlichtverfahren

Nach systemischer Applikation von Pyrogenen wurden die DAB gefärbten Schnitte mit einem Olympus BX50 Mikroskop (Olympus Optical, Hamburg) im Durchlichtverfahren analysiert. Digitale Bilder wurden mit einer Olympus Camedia C-3030 Kamera aufgenommen, wofür die Olympus Camedia Master 2.0 Software benutzt wurde. Nach zentraler Applikation von *rr*IL-6 wurden die Gehirnschnitte mit einem Zeiss Axioplan Lichtmikroskop ausgewertet. Mit einer SONY 3-CCD Kamera wurden digitale Aufnahmen unter Benutzung des Zeiss KS 100 Software-Paketes gemacht.

Zur Bildbearbeitung wurde ein Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop) verwendet, das über den Farbmodus RGB verfügte. Durch Veränderung von Helligkeit und Kontrast sowie der Farbbalance wurden ausgewählte Bilder optimiert, die mit diesem Programm zu Bildtafeln zusammengefügt wurden.

Die Anzahl STAT3-immunreaktiver Zellkerne wurde quantitativ für das OVLT und das SFO ermittelt. Dafür wurden die Zeitpunkte 60 min und 120 min nach Stimulation mit den Pyrogenen LPS und IL-6 ausgewählt. Zum Vergleich wurden auch die entsprechenden Kontrolltiere ausgewertet. Für jedes Tier wurden drei rostrale OVLT-Schnitte gewählt, die stereotaktisch ähnliche Koordinaten besaßen. Für das SFO wählte man ebenfalls drei Schnittebenen aus, die aus dem ganzen Gebiet des SFO stammten. Ein mikroskopisches Zählfeld ($200 \times 200 \mu\text{m}$) wurde benutzt, um bei 400facher Vergrößerung die STAT3-positiven Zellen bzw. ihre Kerne zu zählen. Die Anzahl der gezählten STAT3-immunreaktiven Zellkerne in OVLT und SFO wurde mit SigmaPlot

als Mittelwert mit Standardfehler graphisch dargestellt. Für jede Gruppe wurden jeweils vier bis fünf Tiere ausgewertet. Die gewonnenen Daten dieser Gruppen wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben, wobei die einzelnen Gruppen mit einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem post-hoc-Test statistisch verglichen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte SigmaStat (Jandel Scientific, CA-Corte Madera). Ein statistisch signifikanter Unterschied lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ vor.

2.8.3.2 *Immunfluoreszenzverfahren*

Nach systemischer Applikation wurden die Gehirnpräparate mit einem Olympus BX50 Mikroskop durch Wahl geeigneter Filter analysiert. Die Anregung des Fluorophors mit Licht geeigneter Wellenlänge führte nach entsprechender Filterung zu einer längerwelligen Emissionsstrahlung des angeregten Fluorophors. FITC (Fluorescein-isothiocyanat Konjugat), gekoppelt an einen Antikörper oder Avidin, wurde durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 450-490nm angeregt und emittierte grünes Licht einer Wellenlänge von 510-530nm. Cy3 (Carboxymethylindocyanin), gekoppelt an einen Antikörper oder Streptavidin, wurde durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 510-530nm angeregt und emittierte rotes Licht einer Wellenlänge von 630-660nm. Die Anregung von DAPI, dem Marker für Zellkerne, erfolgte durch gefiltertes Licht einer Wellenlänge von 358nm, worauf es blaues Licht einer Wellenlänge von 461nm emittierte. Durch die Möglichkeit der unterschiedlichen Anregung verschiedener Antikörper war eine Mehrfachmarkierung möglich. Zur Bilddokumentation wurde eine digitale schwarz-weiß-Kamera (Spot Insight, Visitron Systems, D-Puchheim) mit entsprechender Software (Spot Insight Software, Diagnostic Instruments, Michigan, USA) verwendet. Darüber hinaus wurde zur Dokumentation das Softwareprogramm (Metamorph, Visitron Systems GmbH, D-Puchheim) verwendet, mit dem die Bilder anschließend bearbeitet wurden. Die schwarz-weiß photographierten Bilder wurden eingefärbt, so daß STAT3 eine grüne, DAPI eine blaue und die anderen zellspezifischen Marker eine rote Farbe erhielten. Zur Darstellung einer zellspezifischen Kollokalisierung wurden gleiche Ausschnitte von STAT3 und den entsprechenden Markern übereinander gelagert. Zum Nachweis des nukleären Ursprungs von STAT3 wurden gleiche Ausschnitte von STAT3 und DAPI übereinander gelegt. Nach zentraler

rrIL-6-Applikation wurden die Gehirnschnitte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Digitale Aufnahmen wurden mit einem inversen Zeiss Laser Scanning Mikroskop (LSM 410, Zeiss, D-Jena) unter Verwendung der Zeiss KS 100 Software aufgenommen.

Zur endgültigen Bildbearbeitung wurde bei beiden Verfahren die Adobe Photoshop Imaging-Software zur Befunddokumentation und zur Erstellung von Bildtafeln benutzt.

2.9 Versuchsprotokolle

2.9.1 Periphere Stimulation durch intraperitoneale Applikation der Substanzen

2.9.1.1 LPS-induziertes zirkulierendes IL-6

Zu festgelegten Zeitpunkten nach i.p. Injektion von LPS (100µg/kg, n = 3-5 pro Gruppe) oder eines gleichen Volumens 0.9%iger NaCl (n = 3-5 pro Gruppe) wurden die Ratten getötet und Blutproben durch Herzpunktion entnommen. Die Proben wurden sofort zentrifugiert und bei -70°C bis zur anschließenden IL-6-Bestimmung aufbewahrt.

2.9.1.2 LPS-induziertes Fieber

Zwei Versuchsgruppen (n = 7 pro Gruppe) wurde entweder 500µl LPS (100µg/kg) oder eine äquivalente Menge NaCl i.p. appliziert. Die Körperkerntemperatur wurde mit Hilfe der Telemetrieanlage über die Versuchsperiode aufgezeichnet. Die Aufzeichnung und Auswertung der gesammelten Daten erfolgte 120min vor bis 480min nach Injektionszeitpunkt.

2.9.1.3 rrIL-6-induziertes zirkulierendes IL-6

Den Tieren wurde entweder *rrIL-6* (45µg/kg) mit einem Volumen von 500µl (n = 3-8 pro Gruppe) oder ein vergleichbares Volumen NaCl (n = 3-12) i.p. appliziert. Zu

Kapitel 2: Material und Methoden

festgelegten Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und Blutproben durch Herzpunktion entnommen. Die gewonnenen Proben wurden im Anschluß zentrifugiert und bei -70°C bis zur Auswertung gelagert.

2.9.1.4 *rrIL-6-induziertes Fieber*

Zwei Versuchsgruppen (n = 5 je Gruppe) wurde entweder in 500µl NaCl *rrIL-6* (45µg/kg) oder ein vergleichbares Volumen an NaCl i.p. verabreicht. Die telemetrische Aufzeichnung der Körperkerntemperatur begann 120min vor und endete nach 480min.

2.9.1.5 *LPS- oder IL-6-induzierte nukleäre STAT3-Translokation im Gehirn*

Zur Untersuchung der LPS- oder IL-6-induzierten nukleären STAT3-Translokation sowie ihres möglicherweise zeitabhängigen Auftretens, wurden Tiergruppen mit unterschiedlichen postinjektalen Todeszeitpunkten gebildet. Tiere der ersten Gruppe wurden 30min nach systemischer IL-6- bzw. NaCl-Applikation (n = 3 je Gruppe) perfundiert. Tiere der zweiten Gruppe (n = 14) wurden 60min nach dem Injektionszeitpunkt perfundiert, wovon vier mit LPS, fünf mit *rrIL-6* und fünf mit 0.9%iger NaCl behandelt wurden. Versuchsgruppe drei (n = 14) bestand aus fünf LPS-behandelten, vier IL-6-behandelten und fünf NaCl-behandelten Tieren und wurde nach 120min perfundiert. Versuchsgruppe vier (n = 3 je Gruppe) wurde entweder LPS oder NaCl systemisch injiziert und nach 180min perfundiert. In der fünften und letzten Versuchsgruppe (n = 2 pro Gruppe) wurden die LPS- oder NaCl-behandelten Tiere 240min nach Injektion perfundiert.

2.9.1.6 *Charakterisierung des zellulären Ursprung der nukleären STAT3-Translokation nach systemischer Pyrogenstimulation*

Zur Analyse des zellulären Ursprungs der nukleären STAT3-Translokation wurden zwei Gruppen mit unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten gebildet. Die *rrIL-6*-stimulierten Tiere wurden 60min nach intraperitonealer Stimulation und die LPS-stimulierten Tiere 120min nach Stimulation perfundiert. Daraufhin wurden von jedem Tier drei Schnittserien angefertigt und der STAT3-Antikörper mit zellspezifischen

Kapitel 2: Material und Methoden

Markerproteinen koinkubiert (IL-6 1h: n = 3-5; LPS 2h: n = 3-9; CTRL 1h/2h: n = 3-6) und die Konzentrationen von bioaktivem IL-6 im Plasma dieser Tiere bestimmt.

2.9.2 Zentrale Stimulation durch intrazerebroventrikuläre Applikation der Substanzen

Neben der systemischen *rrIL-6*-Stimulation wurde auch eine zentrale Stimulation mit diesem endogenen Pyrogen durchgeführt, um die jeweils durch STAT3 genomisch aktivierten Hirnregionen zu vergleichen.

2.9.2.1 rrIL-6-induziertes Fieber

Die Ratten erhielten eine i.c.v. Bolusapplikation von *rrIL-6* unterschiedlicher Konzentration (200ng/Tier: n = 7; 100ng/Tier, n = 7) oder eine Applikation von NaCl eines vergleichbaren Volumens (5µl, n = 7). Während der Versuchsperiode erfolgte die telemetrische Aufzeichnung der Körperkerntemperatur, die 120min vor dem Injektionszeitpunkt begann und 480min danach endete.

2.9.2.2 rrIL-6 induzierte nukleäre STAT3-Translokation

Zur Untersuchung der *rrIL-6*-induzierten nukleären STAT3-Translokation sowie ihres möglicherweise zeitabhängigen Auftretens nach zentraler Applikation wurden verschiedene Gruppen mit unterschiedlichen Todeszeitpunkten nach Injektion gebildet. Zur Analyse einer nukleären STAT3-Translokation nach i.c.v. Applikation von *rrIL-6* sowie eines möglicherweise zeitabhängigen Auftretens dieser Erscheinung sind Gruppen mit unterschiedlich postinjektalen Zeitpunkten (15-90min, n = 3-9 pro Gruppe) gebildet worden.

KAPITEL 3: ERGEBNISSE

Die Applikation von exogenen oder endogenen Pyrogenen in einen Organismus verursacht in diesem unter anderem eine Fieberantwort. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in den Versuchsstudien diese Möglichkeit genutzt, um bei Ratten Fieber zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurde den Ratten LPS als exogenes Pyrogen oder *rrIL-6* als endogenes Pyrogen systemisch (intraperitoneal) appliziert (Abbildung 22).

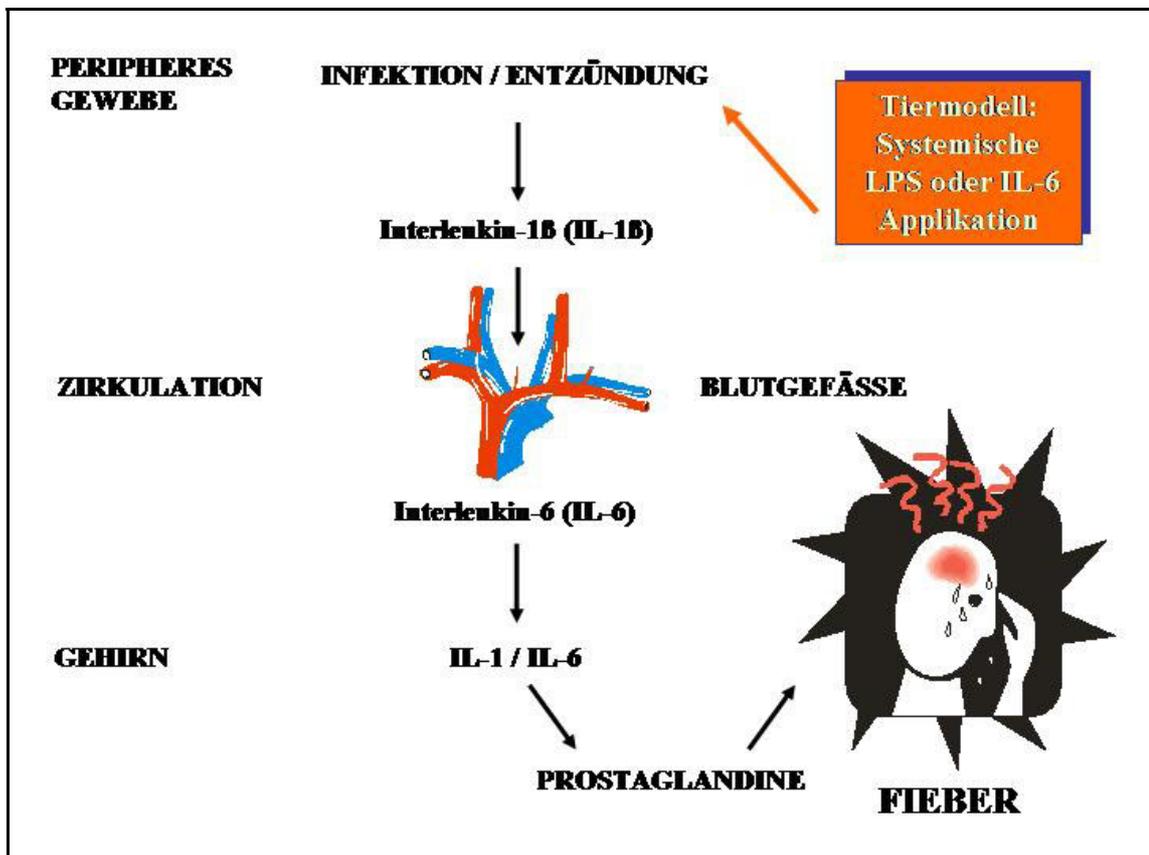


Abbildung 22:
Schematische Darstellung der Fiebermediation, die sowohl durch natürliche Entzündungen oder Infektionen als auch durch systemische Applikation (i.p.) eines exogenen (LPS) oder endogenen (*rrIL-6*) Pyrogens aktiviert werden kann.

3.1 Systemische Applikation (i.p.) von LPS im Vergleich zur systemischen Applikation (i.p.) von 0.9% NaCl bei Ratten

3.1.1 *Verlauf der Körpertemperatur nach intraperitonealer (i.p.) Applikation von LPS oder eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl*

Abbildung 23 beschreibt in diesem Zusammenhang den Verlauf der abdominalen Körpertemperatur nach i.p. Applikation von LPS (100µg/kg, n = 7) bzw. 0.9% NaCl (CTRL, n = 7). Die kontinuierliche Aufzeichnung der abdominalen Körpertemperatur der Tiere begann 120min vor Applikation der Substanzen und endete 480min nach der Stimulation. Zum Zeitpunkt "0" erfolgte die Injektion von LPS bzw. 0.9% NaCl (Pfeil) in das Abdomen. Durch die Verabreichung der Substanzen kam es in beiden Gruppen zu einem vorübergehenden Anstieg der Körpertemperatur um ca. 0.8°C. Dabei handelte es sich um einen „Streß-induzierten“ Anstieg der Körpertemperatur, der durch die Injektionsprozedur verursacht wurde. Danach sank die Körpertemperatur in beiden Versuchsgruppen ab, um sich im weiteren Verlauf bei den Kontrolltieren auf einem Basalniveau von $37.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ einzupendeln. Im Gegensatz dazu entwickelten die LPS-behandelten Tiere anschließend eine biphasische Fieberantwort. Diese wurde gekennzeichnet durch einen erneuten Anstieg der Körpertemperatur, der ca. 120min nach LPS-Applikation begann und nach ca. 180min ein erstes Maximum von ca. 38.0°C erreichte. Danach stieg die Körperkerntemperatur weiter und erreichte ein zweites Maximum von ca. 38.8°C zwischen 300min und 345min. Insgesamt war die Körpertemperatur LPS-behandelter Tiere 135min bis 480min nach Applikation im Vergleich zur Körpertemperatur der Kontrolltiere signifikant erhöht ($P < 0.05$).

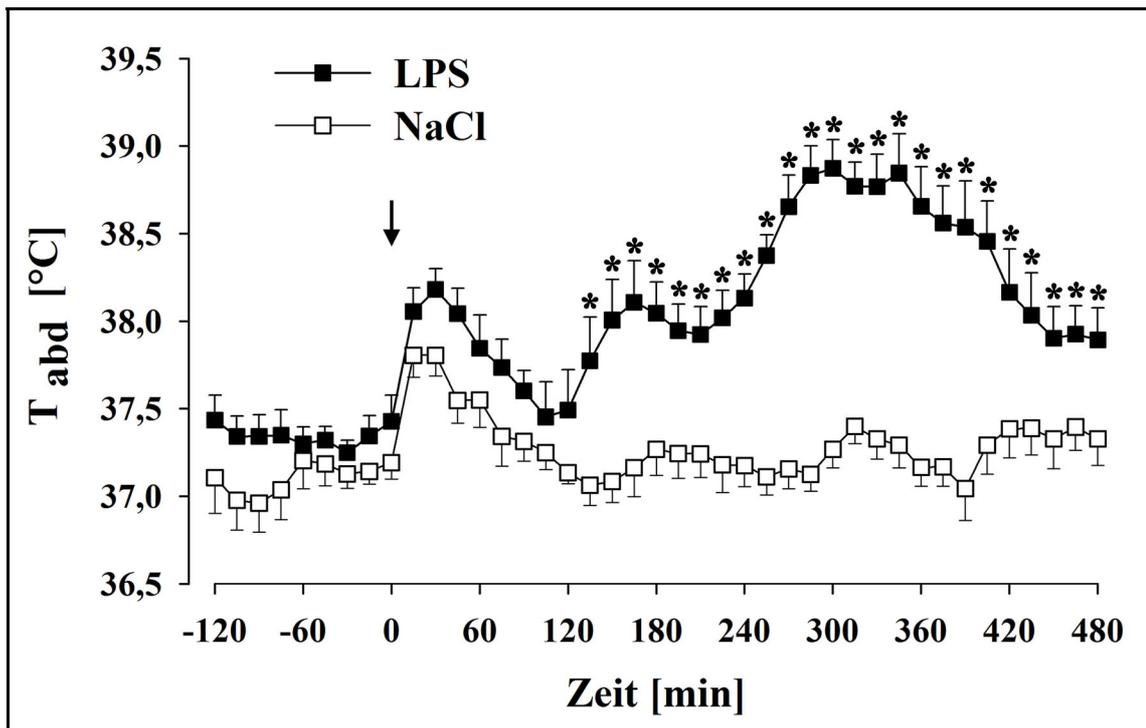


Abbildung 23:

Kontinuierliche Messung des Verlaufs der Körpertemperatur (T_{abd}) bei Ratten vor und nach i.p. Injektion von LPS (100 μ g/kg, n = 7) oder eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL, n = 7). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Applikation. Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) dargestellt. *Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (P < 0.05). Die Fieberkurven der LPS- bzw. NaCl-behandelten Tiere wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA und einem post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen.

3.1.2 *Plasmakonzentration von bioaktivem IL-6 nach intraperitonealer Applikation von LPS bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl*

Neben der Körpertemperatur wurden ebenfalls die zirkulierenden Konzentrationen von bioaktivem IL-6 im Plasma bestimmt. In Abbildung 24 werden diese nach i.p. Applikation von LPS (100 μ g/kg, n = 3-5 pro Säule) bzw. 0.9% NaCl (CTRL, n = 3-5 pro Säule) zu spezifischen Zeitpunkten wiedergegeben. Zum Zeitpunkt der Injektion von LPS oder 0.9% NaCl befanden sich die Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 auf einem basalen Niveau von ca. 20IU/ml (“international units“ > internationale Einheiten).

Kapitel 3: Ergebnisse

Diese basalen IL-6-Konzentrationen stiegen nach LPS-Applikation innerhalb von 60min auf einen Wert von 425 ± 130 IU/ml und besaßen nach 120min einen Wert von 3.010 ± 1.250 IU/ml. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Anstieg der IL-6-Konzentration auf 5.360 ± 3.070 IU/ml (180min), um nach 240min einen Wert von 6.275 ± 2.240 IU/ml zu erreichen. Nach 480min war ein Rückgang der Konzentration des bioaktiven Plasma-IL-6 auf 1.030 ± 565 IU/ml zu sehen. Im Gegensatz dazu war in den mit 0.9%NaCl-behandelten Kontrolltieren kein Anstieg der IL-6 Konzentrationen im Plasma 120min und 240min über Basalwerte von 21 ± 15 IU/ml nach Applikation zu beobachten. Zu diesen Zeitpunkten waren jedoch die IL-6-Plasmakonzentrationen der LPS-behandelten Tiere im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrolltieren signifikant höher ($P < 0.05$).

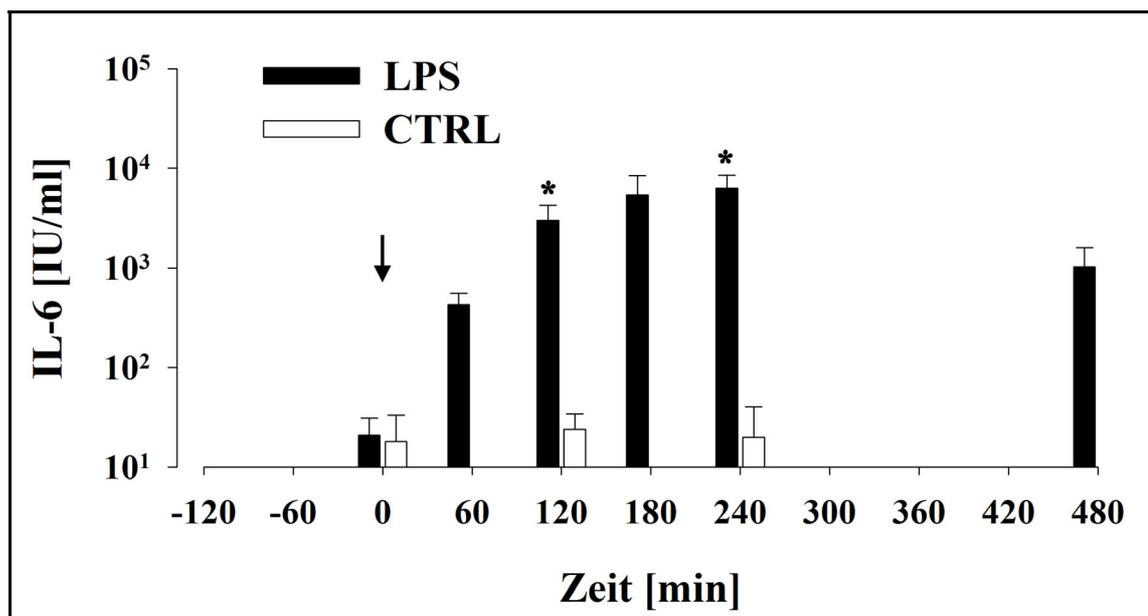


Abbildung 24:

Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 (IU [international units]/ml) zu spezifischen Zeitpunkten nach systemischer Applikation (i.p.) von LPS (100 μ g/kg, n = 3-5 pro Säule) oder eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL, n = 3-5 pro Säule). Die IL-6-Konzentrationen sind als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) dargestellt. *Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$). Die IL-6-Konzentrationen im Plasma LPS- bzw. NaCl-behandelter Tiere wurden mit einer einfaktoriellem ANOVA und anschließendem post-hoc-Test nach Scheffé verglichen.

3.1.3 *Neuroanatomische Analyse des Rattengehirns nach intraperitonealer Applikation von LPS bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl*

Verteilung der zytoplasmatischen und nukleären STAT3-Expression im Rattengehirn unter Kontroll- und LPS-Bedingungen

Im folgenden Abschnitt soll die Verteilung der zytoplasmatischen und nukleären STAT3-Immunreaktivität im Rattengehirn nach i.p. Gabe von LPS (100µg/kg, n = 13) bzw. 0.9% NaCl (CTRL, n = 15) analysiert werden. Sowohl in Kontroll- als auch LPS-stimulierten Tieren konnte unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt (nach 60min, 120min, 180min, 240min) eine basale zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität in verschiedenen Gehirnregionen beobachtet werden (Tabelle 13). Für die Tabelle wurde der Zeitpunkt (120min) gewählt, da zu diesem Zeitpunkt eine LPS-induzierte nukleäre STAT3-Translokation (Abbildung 18) auftrat. Gehirnstrukturen, die eine mittlere bis starke zytoplasmatische STAT3-Expression aufwiesen, waren überwiegend im Hypothalamus und der Medulla oblongata zu sehen. Im Hypothalamus handelte es sich dabei um den Nucleus arcuatus, die Area periarquata, die Regio lateralis hypothalami, den Nucleus preopticus magnocellularis und ventromedialis, die Eminentia mediana, den Nucleus periventricularis, die Area retrochiasmatica und den Nucleus supraopticus. In der Medulla oblongata fand man eine hohe Intensität zytoplasmatischer STAT3-Signale im Nucleus ambiguus, Nucleus cuneatus, Nucleus dorsalis nervi vagi, im Nucleus gracilis, im Nucleus nervi hypoglossi und im Nucleus reticularis lateralis. In den Strukturen, die im besonderen Interesse und damit im Vordergrund dieser Studie stehen, den CVOs, konnte zu allen Zeitpunkten der Untersuchung und unabhängig von der Behandlungsart (LPS oder 0.9%NaCl) neben einer moderaten zytoplasmatischen STAT3-Translokation innerhalb der AP eine geringe zytoplasmatische STAT3-Expression im SFO und OVLT beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wies nach Applikation von LPS oder 0.9% NaCl nur eine limitierte Anzahl von Gehirnstrukturen eine nukleäre STAT3-Translokation auf. Dabei war die stärkste Intensität nukleärer STAT3-Signale im OVLT und im SFO 120min nach LPS-Applikation nachzuweisen, wobei die entsprechenden Kontrollen keine vergleichbare nukleäre STAT3-Immunreaktivität zeigten.

Gehirnstrukturen	Zytoplasmatische STAT3-Expression		Nukleäre STAT3-Expression	
	CTRL 120 min	LPS 120 min	CTRL 120min	LPS 120 min
Zirkumventrikuläre Organe (CVOs) & Liquorstrukturen				
Area postrema (AP)	++	++	+	+
Organum subfornicale (SFO)	+	+	-	+++
Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)	+	+	-	+++
Ependymale Auskleidung der Ventrikel	++	+	-	+
Meninges	++	++	-	+
Plexus chorioideus	++	++	-	+
Hypothalamus				
Area retrochiasmatica	++	+	-	-
Eminentia mediana	++	++	-	++
Nucleus arcuatus	+++	+++	-	+
Nucleus dorsomedialis hypothalami	-	-	-	-
Nucleus paraventricularis	-	-	-	-
subnucleus parvocellularis	+	+	-	-
subnucleus magnocellularis	+	+	-	-
Nucleus periventricularis	+	++	-	-
Nucleus praeopticus magnocellularis	++	++	-	-
Nucleus praeopticus medialis	-	-	-	-
Nucleus praeopticus medianus	-	-	-	-
Nucleus praeopticus ventromedialis	++	+	-	-
Nucleus suprachiasmaticus	-	-	-	-
Nucleus supraopticus	++	++	-	-
Nucleus ventromedialis hypothalami	-	-	-	-
Regio lateralis hypothalami	++	+	-	-
Regio praeoptica lateralis	-	-	-	-
Regio praeoptica medialis	-	-	-	-
Regio periarquata	++	+	-	-
Telencephalon				
Bandeletta diagonalis Broca	++	++	-	-
Cortex (5. Schicht)	+	++	-	-
Cortex piriformis (2. Schicht)	-	-	-	-
Nucleus medialis septi	++	+	-	-
Septum laterale	-	-	-	-
Medulla oblongata				
Nucleus ambiguus	++	++	-	-
Nucleus cuneatus	+++	+	-	-
Nucleus dorsalis nervi vagi	+++	++	-	-
Nucleus externus cuneati	+	+	-	-
Nucleus gracilis	++	+	-	-
Nucleus nervi hypoglossi	+++	+++	-	-
Nucleus reticularis lateralis	+	++	-	-
Nucleus tractus solitarius	+	+	+	+
Nucleus spinalis nervi trigemini	+	-	-	-
Substantia nigra	+	+	-	-

Tabelle 13:

Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 im Rattengehirn. Die Analyse der Distribution der zytoplasmatischen und nukleären STAT3-Expression erfolgte 120min nach Applikation von LPS (100µg/kg) bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%NaCl (CTRL). Eine Vier-Punkte-Skala lag vor, um die Expressionsdichte zu beurteilen: +++ = hohe Dichte; ++ = mittlere Dichte; + = niedrige Dichte und - = kein nukleäres und zytoplasmatisches Signal. Die hier angegebene Rattengehirnnomenklatur wurde nach Paxinos & Watson (1998) modifiziert.

Anders verhielt es sich bei der AP und teilweise beim Nucleus tractus solitarius. Bei diesen konnte 120min nach Injektion sowohl von LPS als auch von 0.9% NaCl eine geringe Anzahl nukleärer STAT3-Signale beobachtet werden. Andere Gehirnregionen, wie z.B. der Nucleus arcuatus, die Eminentia mediana, der Nucleus praeopticus ventromedialis, der Plexus chorioideus, die ependymale Auskleidung der Ventrikel und die Meningen wiesen ebenfalls eine nukleäre, wenn auch nur schwache Expression von STAT3-Signalen auf. Dennoch war die Anzahl der Zellen, die eine nukleäre STAT3-Immunreaktivität in diesen Strukturen aufwiesen um ein Vielfaches geringer als die Anzahl, die in den beiden CVOs (OVLT und SFO) vorhanden war.

Die systemische Applikation von LPS induziert eine zeitabhängige nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 in den CVOs OVLT und SFO

Sowohl unter Kontrollbedingungen (Abbildung 25A/C/E) als auch nach LPS-Stimulation (Abbildung 25B/D/F und Abbildung 26) war die zytoplasmatische STAT3-Expression im OVLT (Abbildung 25A/B (Insets) und 26A/B) und SFO (Abbildung 25C/D (Insets) und 26C/D) sehr gering, so daß eine Unterscheidung von der Hintergrundfärbung schwierig war. Im Gegensatz dazu konnte 120min nach LPS-Stimulation im OVLT (Abbildung 25B und Inset) und SFO (Abbildung 26D und Inset) eine nukleäre STAT3-Translokation und ein Anstieg der STAT3-Immunreaktivität verzeichnet werden. Die nukleären STAT3-Signale im OVLT besaßen eine überwiegend runde Form und waren stark braun gefärbt (Inset Abbildung 25B). Sie waren vor allem in den rostralen Anteilen des OVLT (Abbildung 25B) anzutreffen. Durch den Vergleich ihres Aussehens und ihrer Größe mit den Kresylviolett gegengefärbten Zellkernen des OVLT (Inset Abbildung 25A) könnte eine nukleäre STAT3-Translokation überwiegend in Neuronen des OVLT vermuten werden. Im SFO hingegen waren die stark braun gefärbten nukleären STAT3-Signale charakteristischerweise unregelmäßig geformt (Inset Abbildung 25D). Sie befanden sich vor allem in Zellen der sogenannten "Core-Region" des SFO (Abbildung 25D). Der Vergleich ihres Aussehens und ihrer Größe mit den Kresylviolett gegengefärbten Zellkernen des SFO (Inset Abbildung 25C) läßt einen Ursprung der nukleären STAT3 Translokation in neuronalen Zellen des SFO eher nicht vermuten.

Kapitel 3: Ergebnisse

In Kontrolltieren war 120min nach Applikation von 0.9%iger NaCl eine derartige nukleäre STAT3-Translokation weder im OVLT (Abbildung 25A und Inset) noch im SFO (Abbildung 25C und Inset) zu sehen. Diese Beobachtung wurde auch nach LPS-Stimulation zu anderen Zeiten als 120min gemacht. So konnte 60min nach Applikation von LPS keine nukleäre STAT3-Translokation im OVLT (Abbildung 26A) und SFO (Abbildung 26C) beobachtet werden. Ebenso hat es sich im OVLT (Abbildung 26B) und SFO (Abbildung 26D) 180min nach LPS-Injektion verhalten. Eine besondere Beachtung in diesem Zusammenhang verdient die AP. Als weiteres CVO zeigte sie – wie das OVLT und das SFO – eine zytoplasmatische STAT3-Expression nach systemischer Gabe von LPS oder 0.9% NaCl, die schwer von der Hintergrundfärbung zu unterscheiden war (Abbildung 25E/F und Abbildung 26E/F). Ähnlich der Kontrolltiere konnte im Gegensatz zum OVLT und SFO in der AP kein zeitabhängiger Anstieg der nukleären STAT3-Translokation und STAT3 Immunreaktivität 120min nach LPS Stimulation beobachtet werden (Abbildung 25F).

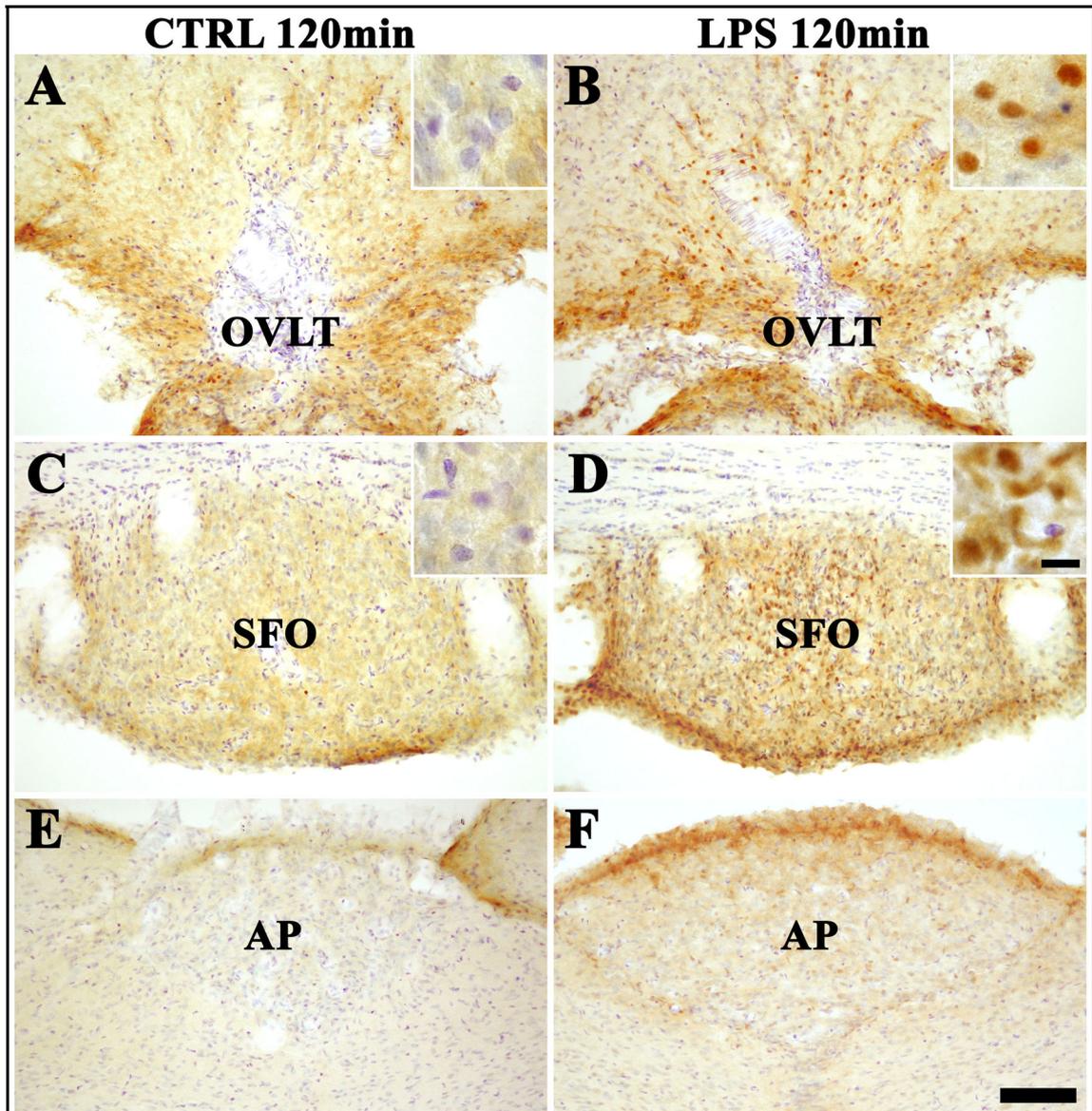


Abbildung 25:

Die CVOs OVLT (A/B), SFO (C/D) und AP (E/F) 120min nach Applikation 0.9%NaCl (CTRL, A/C/E) und LPS (B/D/F). Die i.p. Applikation von LPS (100 μ g/kg, n = 5) erzeugte nach 120min eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im OVLT (B) und SFO (D), jedoch nicht in der AP (F). Allerdings konnte in der AP NaCl- und LPS-behandelter Tiere eine zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität und einige wenige nukleäre STAT3-Signale in der an den vierten Ventrikel grenzenden Zellschicht beobachtet werden (E/F). Die Injektion eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL, n = 5) zeigte nach 120min keine derartige STAT3-Translokation im OVLT (A), SFO (C) oder der AP (E). Die STAT3-Immunreaktivität stellt sich als braunes Reaktionsprodukt dar, das durch die immunhistochemische Aufarbeitung mit DAB sichtbar wird. Die spezifische nukleäre STAT3-Translokation, die 120min nach LPS-Stimulation erscheint, wird in einer höheren Vergrößerung im Inset B für das OVLT und im Inset D für das SFO wiedergegeben. Einzelne braune Zellkerne konnten mit den Kresylviolett gefärbten blauen Zellkernen im OVLT (Inset A) und SFO (Inset C) 120min nach Applikation 0.9%NaCl verglichen werden. Eichbalken für A-F = 100 μ m, Eichbalken für die Insets = 10 μ m.

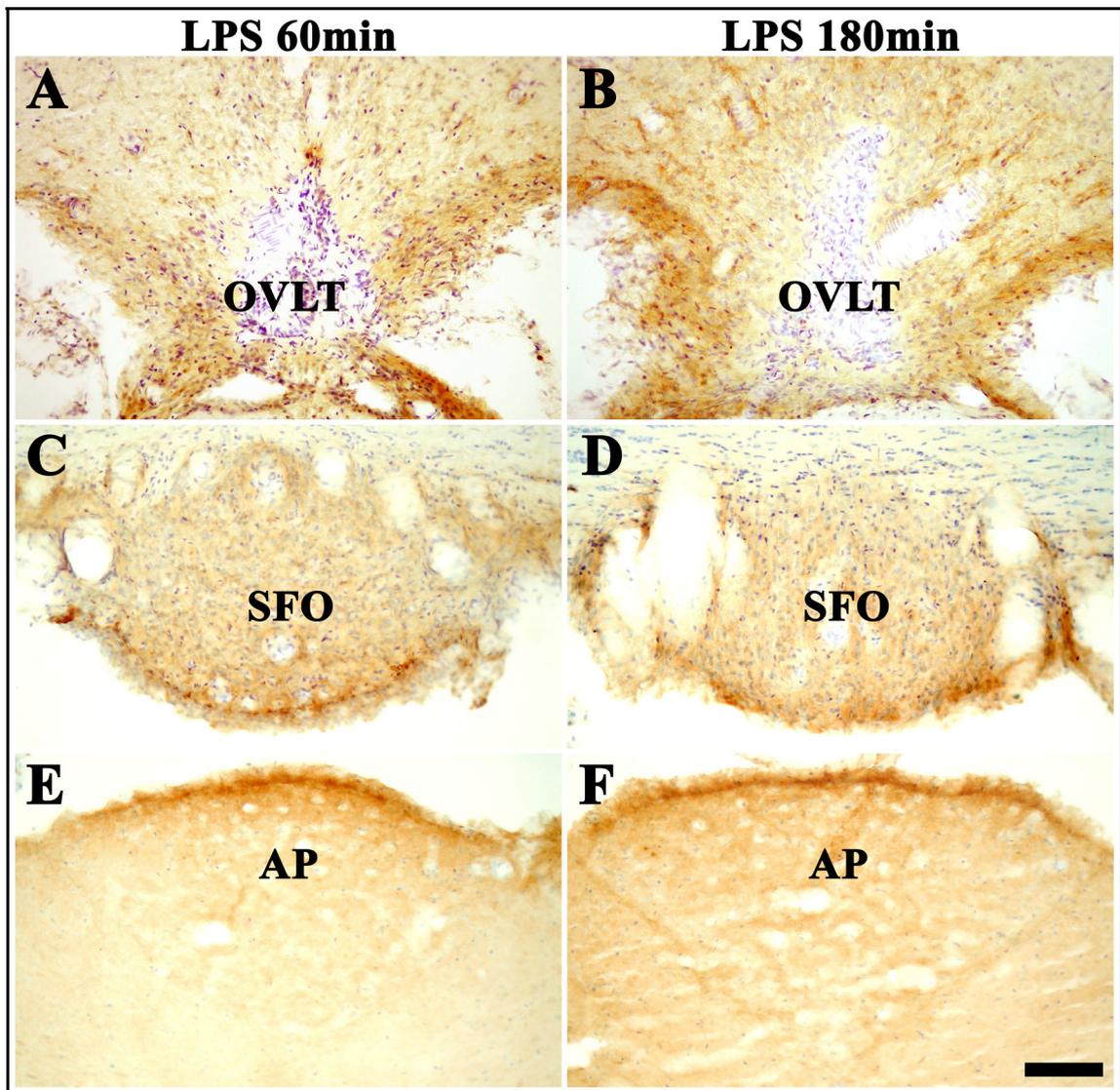


Abbildung 26:

Die CVOs OVLt (A/B), SFO (C/D) und AP (E/F) 60min (A/C/E, n = 4) und 180min (B/D/F, n = 3) nach i.p. Applikation von LPS (100µg/kg). Nach 60min war keine nukleäre STAT3-Translokation und kein Anstieg in der STAT3-Immunreaktivität im OVLt (A), SFO (C) und der AP (E) zu sehen. Ebenso verhielt es sich 180min nach LPS-Stimulation im OVLt (B), SFO (D) und der AP (F). Dennoch ist eine zyttoplasmatische STAT3-Immunreaktivität sowohl 60min als auch 180min nach LPS-Stimulation in allen CVOs zu beobachten. Hinzu kamen einige wenige nukleäre STAT3-Signale in der an den vierten Ventrikel grenzenden Zellschicht der AP (E/F). Von blauer Farbe sind die Kresylviolett gegengefärbten Zellkerne (A-F). Eichbalken für A-F = 100µm.

3.2 Systemische Applikation (i.p.) von rekombinantem rattenspezifischem Interleukin-6 (*rrIL-6*) im Vergleich zur systemischen Applikation (i.p.) von 0.9%iger NaCl bei Ratten

Nachdem bekannt ist, daß die systemische Applikation von LPS nicht nur Fieber (Abbildung 23), sondern auch eine Erhöhung der Konzentration von bioaktivem IL-6 im Blutplasma (Abbildung 24) und eine zeitabhängige nukleäre STAT3-Translokation im OVLT und SFO induziert (Abbildung 23 und 24) und IL-6 als „Aktivator“ der JAK-STAT3-Signalkaskade beschrieben wurde, soll im folgenden Kapitel die direkte potentielle Wirkung von *rrIL-6* auf den Organismus nach i.p. Applikation bei Ratten analysiert werden.

3.2.1 *Verlauf der Körpertemperatur nach intraperitonealer Applikation von rrIL-6 bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl*

Abbildung 27 zeigt die kontinuierliche Messung des Verlaufs der abdominalen Körpertemperatur nach i.p. Applikation des endogenen Pyrogens *rrIL-6* (45µg/ml, n = 5) bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL, n = 5). Die Aufzeichnung wurde 120min vor dem Zeitpunkt der Injektion „0“ (Pfeil) begonnen und 480min nach Stimulation beendet. Die Applikation erzeugte in beiden Tiergruppen einen streßbedingten vorübergehenden Anstieg der abdominalen Körpertemperatur, die in der Kontrollgruppe wieder absank und sich auf einen Basalwert von ca. 37.2°C ± 0.2°C einpendelte. Bei Behandlung der Tiere mit *rrIL-6* konnte ein Anstieg der Körpertemperatur auf durchschnittlich ca. 37.8°C verzeichnet werden, der über vier Stunden anhielt. Dabei wurde nach 195min ein Temperaturmaximum von ca. 38.1°C erreicht. Zwischen 120min und 300min nach Injektion war die Körpertemperatur der IL-6-behandelten Tiere im Vergleich zur Körpertemperatur der Kontrollen signifikant erhöht (P < 0.05).

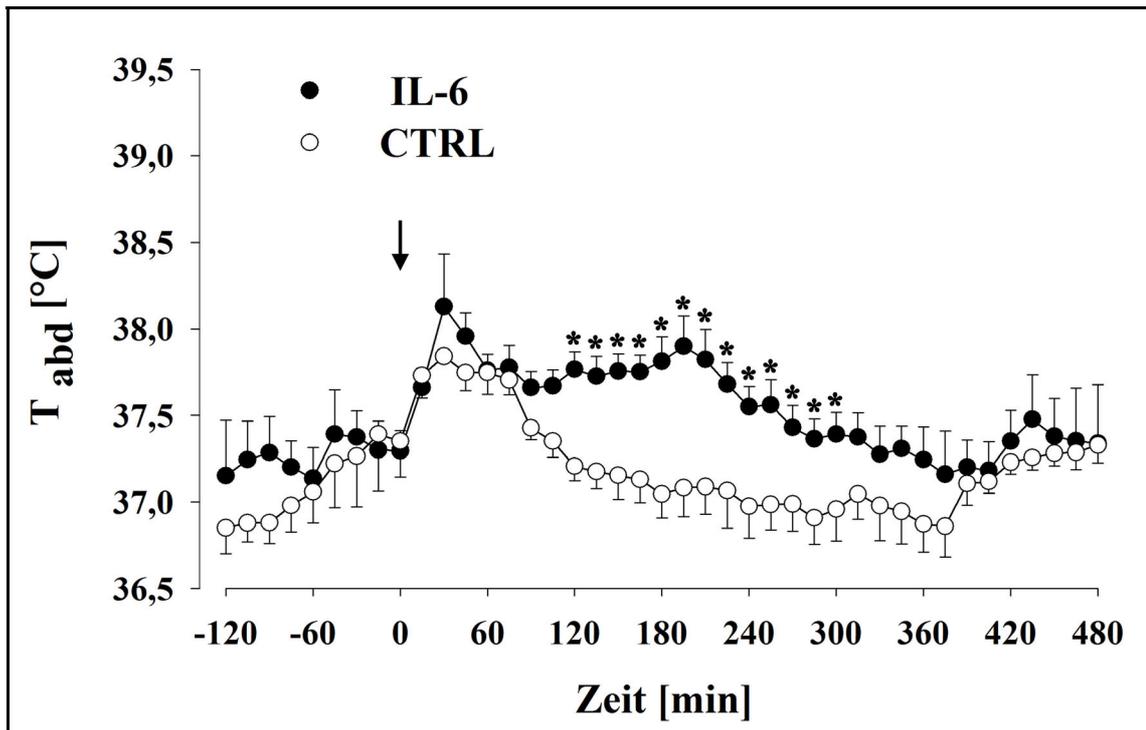


Abbildung 27:

Kontinuierliche Messung des Verlaufs der Körpertemperatur (T_{abd}) bei Ratten vor und nach i.p. Injektion von *rrIL-6* ($45\mu\text{g/ml}$, $n = 5$) oder eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL, $n = 5$). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Applikation. Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) dargestellt. *Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$). Die Fieberkurven der *rrIL-6*- bzw. NaCl-behandelter Tiere wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA und anschließendem post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen.

3.2.2 *Plasmakonzentration von bioaktivem IL-6 nach intraperitonealer Applikation von rrIL-6 oder eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl*

Die zirkulierenden Konzentrationen von bioaktivem IL-6 nach systemischer Applikation von *rrIL-6* ($45\mu\text{g/kg}$, $n = 3-8$ pro Säule) bzw. 0.9% NaCl (CTRL, $n = 3-12$ pro Säule) wurden aus Kostengründen nur zu den wichtigsten Zeitpunkten dargestellt (Abbildung 28). Die Plasma-IL-6-Konzentration erreichte bereits 30min nach IL-6-Applikation einen Wert von 692 ± 73 IU/ml und nach 60min einen Wert von 5116 ± 1291 IU/ml. Nach 120min war die IL-6-Konzentration wieder auf einen Wert von 656 ± 93 IU/ml abgesunken.

Bei den Kontrolltieren blieb die Plasma-IL-6-Konzentration während der dargestellten Meßperiode auf einem basalen Niveau von 35 ± 6 IU/ml. Die IL-6-Konzentrationen im Plasma *rr*IL-6-behandelter Tiere sind 30min, 60min und 120min nach *rr*IL-6-Applikation signifikant gegenüber den Plasma-IL-6-Konzentrationen der Kontrollen erhöht ($P < 0.05$).

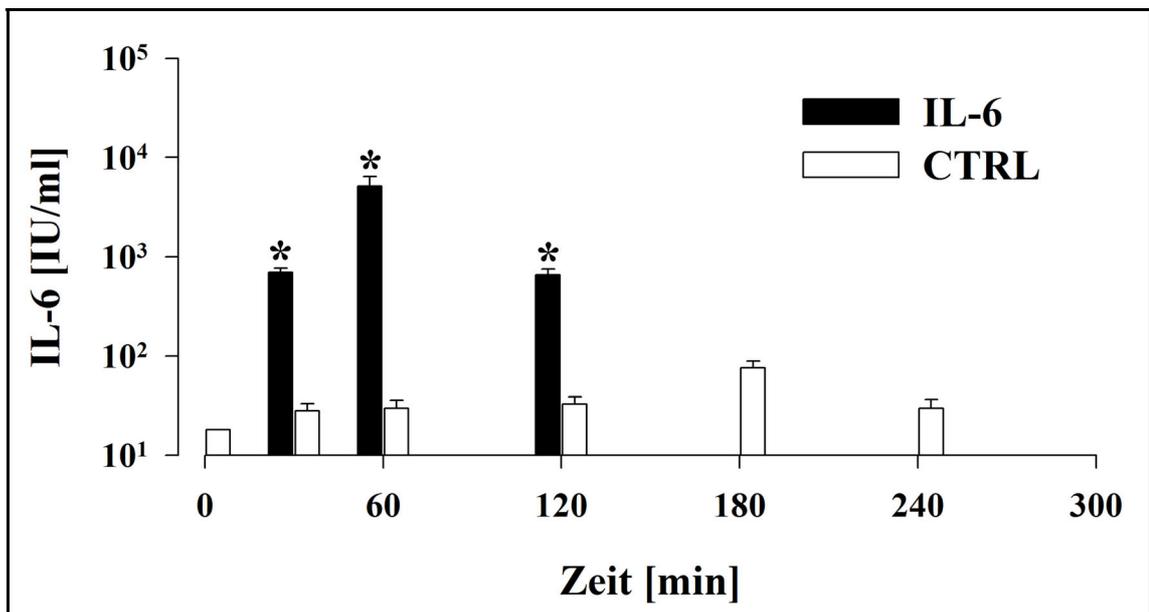


Abbildung 28:

Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 nach i.p. Applikation von *rr*IL-6 ($45\mu\text{g/kg}$, $n = 3-8$ pro Säule) bzw. eines gleichen Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL, $n = 3-12$ pro Säule) zu ausgewählten Zeitpunkten. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Applikation. *Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($P < 0.05$). Die IL-6-Konzentrationen im Plasma *rr*IL-6- und NaCl-behandelter Tiere wurden durch eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls post-hoc-Test verglichen.

3.2.3 *Neuroanatomische Analyse der Rattengehirne nach intraperitonealer Applikation von rrIL-6 bzw. 0.9%iger NaCl*

Verteilung der zytoplasmatischen und nukleären STAT3-Translokation im Rattengehirn nach Applikation von rrIL-6 bzw. 0.9% NaCl

In diesem Abschnitt soll die Verteilung zytoplasmatischer und nukleärer STAT3-Translokation im Rattengehirn nach Applikation von rrIL-6 bzw. 0.9% NaCl beschrieben werden. In Kontroll- als auch rrIL-6-behandelten Tieren konnte eine basale zytoplasmatische STAT3-Expression in verschiedenen Gehirngebieten (Tabelle 14) beobachtet werden, die zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (30min, 60min, 120min) ein ähnliches Aussehen besitzt.

Im Zusammenhang mit der Analyse der Verteilung wird der Zeitpunkt von 60min gewählt, der nachgewiesenermaßen für die Darstellung der rrIL-6-induzierten nukleären STAT3-Translokation von Bedeutung ist (Abbildung 22 und 23). Vor allem im Hypothalamus und der Medulla oblongata wurden Gehirngebiete mit einer mittleren bis starken zytoplasmatischen STAT3-Expression nach Applikation von rrIL-6 bzw. 0.9%iger NaCl gefunden. Bezüglich des Hypothalamus gehörten dazu der Nucleus arcuatus, die Area periarquata, die Area lateralis hypothalami, der Nucleus praeopticus magnocellularis und ventromedialis, die Eminentia mediana, der Nucleus periventricularis, die Area retrochiasmatica und der Nucleus supraopticus. Innerhalb der Medulla oblongata konnte eine intensive zytoplasmatische STAT3-Expression im Nucleus ambiguus, Nucleus cuneatus, Nucleus dorsalis nervi vagi, Nucleus gracilis, Nucleus nervi hypoglossi und Nucleus reticularis lateralis beobachtet werden.

In den für diese Studie im Vordergrund stehenden CVOs war eine moderate zytoplasmatische STAT3-Translokation in der AP und eine niedrige zytoplasmatische STAT3-Expression im OVLT und im SFO vorhanden. Diese Beobachtung konnte unabhängig von der Art der Behandlung und dem Untersuchungszeitpunkt gemacht werden. Im Gegensatz dazu konnte eine nukleäre STAT3-Immunreaktivität nur in einer limitierten Anzahl von Gehirnregionen nach systemischer Injektion von rrIL-6 bzw. 0.9% NaCl gefunden werden. Die stärkste nukleäre STAT3-Expression war innerhalb des OVLT und SFO 60min nach systemischer Applikation von rrIL-6 beobachtet worden, jedoch nicht in den entsprechenden Kontrollen zu diesem Zeitpunkt.

Gehirnstrukturen	Zytoplasmatische STAT3-Expression		Nukleäre STAT3-Expression	
	CTRL 60 min	<i>rrIL-6</i> 60min	CTRL 60min	<i>rrIL-6</i> 60 min
Zirkumventrikuläre Organe (CVOs) & Liquorstrukturen				
Area postrema (AP)	++	++	+	+
Organum subfornicale (SFO)	+	+	-	++
Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)	+	+	-	++
Ependymale Auskleidung der Ventrikel	++	+	-	+
Meninges	++	++	-	+
Plexus chorioideus	++	++	-	+
Hypothalamus				
Area retrochiasmatica	++	+	-	-
Eminentia mediana	++	++	-	+
Nucleus arcuatus	+++	+++	-	-
Nucleus dorsomedialis hypothalami	-	-	-	-
Nucleus paraventricularis	-	-	-	-
subnucleus parvocellularis	+	+	-	-
subnucleus magnocellularis	+	+	-	-
Nucleus periventricularis	+	+	-	-
Nucleus praeopticus magnocellularis	++	++	-	-
Nucleus praeopticus medialis	-	-	-	-
Nucleus praeopticus medianus	-	-	-	-
Nucleus praeopticus ventromedialis	++	++	-	+
Nucleus suprachiasmaticus	-	-	-	-
Nucleus supraopticus	++	++	-	-
Nucleus ventromedialis hypothalami	-	-	-	-
Regio lateralis hypothalami	++	++	-	-
Regio praeoptica lateralis	-	-	-	-
Regio praeoptica medialis	-	-	-	-
Regio periarquata	++	++	-	-
Telencephalon				
Bandeletta diagonalis Broca	++	++	-	-
Cortex (5. Schicht)	+	++	-	-
Cortex piriformis (2. Schicht)	-	-	-	-
Nucleus medialis septi	++	++	-	-
Septum laterale	-	-	-	-
Medulla oblongata				
Nucleus ambiguus	++	++	-	-
Nucleus cuneatus	+++	++	-	-
Nucleus cuneatus externus	+	+	-	-
Nucleus dorsalis nervi vagi	+++	+++	-	-
Nucleus gracilis	++	++	-	-
Nucleus nervi hypoglossi	+++	+++	-	-
Nucleus reticularis lateralis	+	++	-	-
Nucleus tractus solitarius	+	+	+	+
Nucleus spinalis nervi trigemini	+	-	-	-
Substantia nigra	+	+	-	-

Tabelle 14:

Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 im Rattengehirn. Die Analyse der Distribution der zytoplasmatischen und nukleären STAT3-Translokation erfolgte 60min nach Applikation von *rrIL-6* (45µg/ml) bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL). Anhand einer Vier-Punkte-Skala wurde die Expressionsdichte beurteilt: +++ = hohe Dichte; ++ = mittlere Dichte; + = niedrige Dichte und - = kein zytoplasmatisches oder nukleäres Signal. Die hier angegebene Rattengehirnnomenklatur ist nach Paxinos & Watson (1998) modifiziert.

Anders verhielt es sich bei der AP und teilweise bei dem Nucleus tractus solitarius. In diesen Regionen war unabhängig von der Art der Behandlung nach 60min eine niedrige nukleäre STAT3-Translokation vorhanden. Andere Gehirnstrukturen, die nach i.p. Applikation von *rrIL-6* eine geringe nukleäre STAT3 Expression aufwiesen, waren der Nucleus arcuatus, der Plexus chorioideus, die ependymale Auskleidung der Ventrikel und die Meninges. Dennoch war die Anzahl der Zellen, die eine positive nukleäre STAT3 Expression aufwiesen, in diesen Strukturen um ein Vielfaches geringer als derjenigen im OVLT und SFO.

Die systemische Applikation von rrIL-6 induziert eine zeitabhängige nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im OVLT und SFO

Weiterhin soll sich im folgenden Abschnitt mit der *rrIL-6*-induzierten nukleären STAT3-Translokation im OVLT und SFO beschäftigt werden. Die zytoplasmatische STAT3-Translokation im OVLT und SFO war sowohl unter Kontrollbedingungen (Abbildung 29A/C/E) als auch nach Stimulation mit *rrIL-6* (Abbildung 29B/D/F und Abbildung 30) sehr schwach, so daß sie schwer von der Hintergrundfärbung unterschieden werden konnte. Im Gegensatz dazu war 60min nach *rrIL-6*-Applikation eine nukleäre STAT3-Translokation und ein Anstieg der STAT3-Immunreaktivität im OVLT (Abbildung 29B) und SFO (Abbildung 29D) vorhanden. Diese braun-gefärbten nukleären STAT3-Signale in Zellen des OVLT besaßen eine runde Form (Inset Abbildung 29B). Ein Vergleich von Form und der Größe dieser nukleären STAT3-Signale mit Kresylviolett gegengefärbten Zellkernen des OVLT (Inset Abbildung 29A) führte zur Spekulation, daß die nukleäre STAT3-Translokation vorwiegend in Neuronen des OVLT auftreten würde. Im SFO trat die nukleäre STAT3-Translokation vor allem in Zellen der sogenannten "Core-Region" auf (Abbildung 29D). Die nukleären STAT3-Signale im SFO waren eher unregelmäßig geformt (Inset Abbildung 29D). Ein Vergleich der Form und der Größe dieser nukleären STAT3-Signale im SFO mit den Kresylviolett gegengefärbten Zellkernen (Inset Abbildung 29C) ließ nicht auf eine überwiegend nukleäre STAT3-Translokation in Neuronen des SFO schließen.

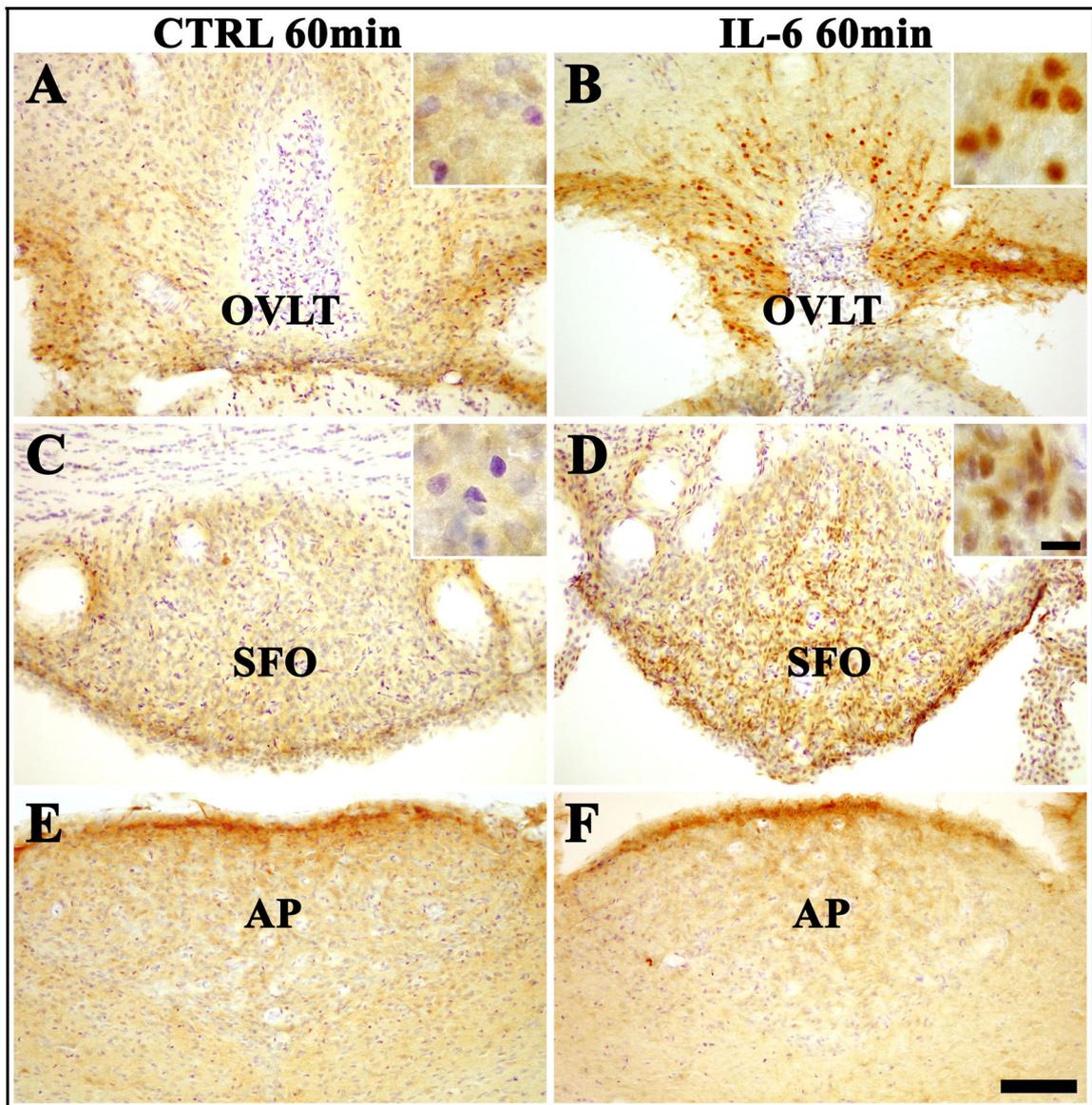


Abbildung 29:

Die CVOs OVLT (A/B), SFO (C/D) und AP (E/F) 60min nach Applikation 0.9% NaCl (A/C/E, n = 5) bzw. *rrIL-6* (B/D/F, n = 5). Die i.p. von *rrIL-6* (45µg/kg) erzeugte nach 60min eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im OVLT (B) und SFO (D), jedoch nicht in der AP (F). Allerdings konnte in der AP beider Tiergruppen eine zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität und einige wenige nukleäre STAT3-Signale in der an den vierten Ventrikel grenzenden Zellschicht beobachtet werden (E/F). Die Injektion eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl verursachte nach 60min keine derartige STAT3-Translokation im OVLT (A) und SFO (C). Die STAT3-Immunreaktivität stellte sich als braunes Reaktionsprodukt dar, das durch die immunhistochemische Analyse mit DAB sichtbar gemacht wurde. Die spezifische nukleäre STAT3-Translokation, die 60min nach *rrIL-6*-Stimulation erschien, wird in einer höheren Vergrößerung im Inset B für das OVLT und im Inset D für das SFO wiedergegeben. Einzelne braun gefärbte Zellkerne konnten mit den Kresylviolett gegengefärbten blauen Zellkernen im OVLT (Inset A) und SFO (Inset C) 60min nach Applikation 0.9% NaCl verglichen werden. Eichbalken für A-F = 100µm, Eichbalken für die Insets = 10µm.

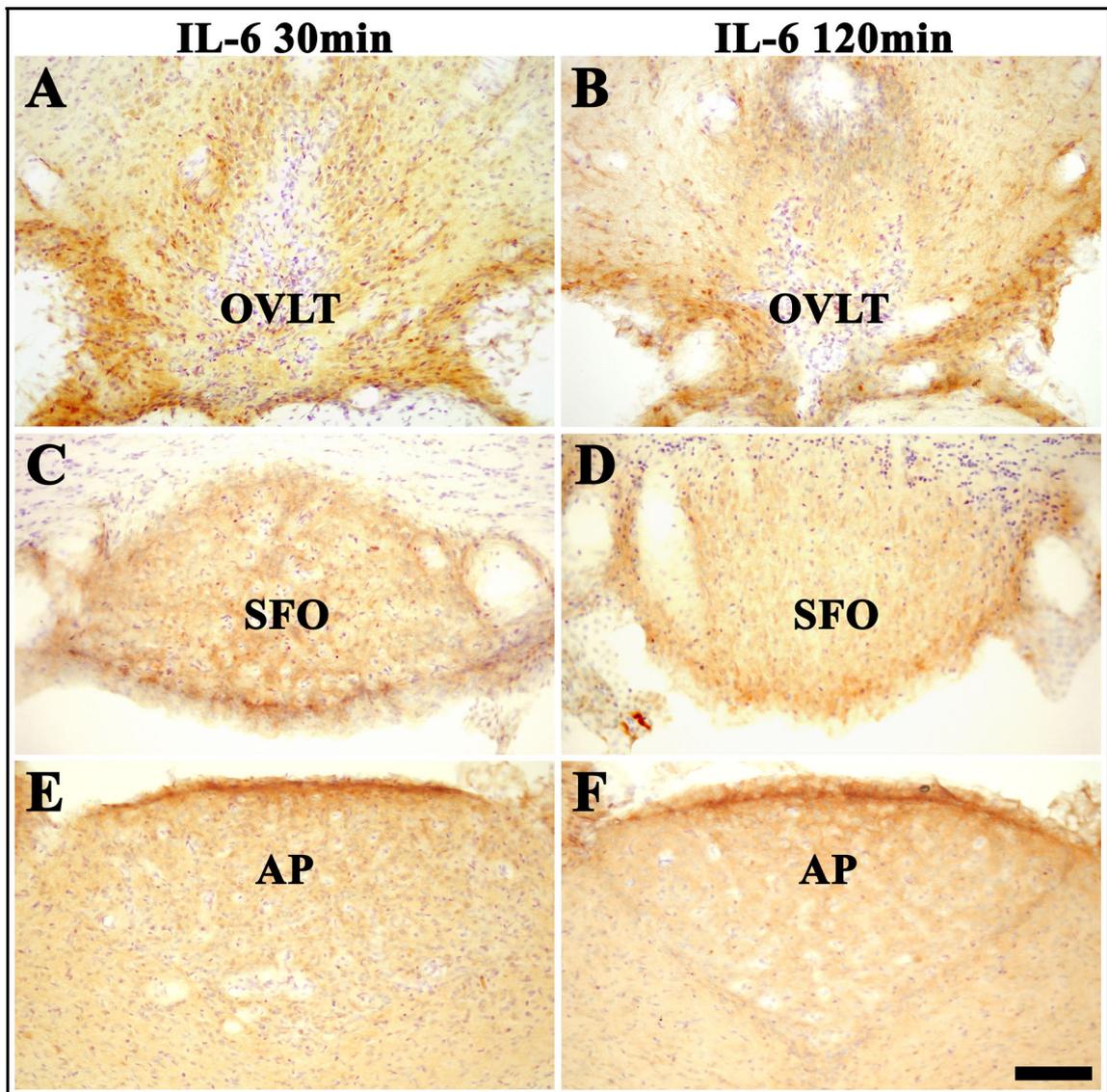


Abbildung 30:

Darstellung der CVOs OVLT (A/B), SFO (C/D) und AP (E/F) 30min (A/C/E, n = 2) und 120min (B/D/F, n = 2) nach i.p. Applikation von *rr*IL-6 (45µg/kg). Nach 60min war keine nukleäre STAT3-Translokation und kein Anstieg in der STAT3-Immunreaktivität im OVLT (A), SFO (C) und der AP (E) zu sehen. Ebenso verhielt es sich 120min nach IL-6-Stimulation im OVLT (B), SFO (D) und der AP (F). Dennoch war eine zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität sowohl 30min als auch 120min nach IL-6-Stimulation in allen CVOs zu erkennen. Hinzu kamen einige wenige nukleäre STAT3-Signale in der an den vierten Ventrikel grenzenden Zellschicht der AP (E/F). Von blauer Farbe waren die Kresylviolett gegengefärbten Zellkerne (A-F). Eichbalken für A-F = 100µm.

Kapitel 3: Ergebnisse

Zu den anderen Stimulationszeitpunkten (30min, 120min) konnte eine derartige nukleäre STAT3-Translokation in Zellen des OVLT und SFO nach i.p. Applikation von *rrIL-6* (Abbildung 30) nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde weder 30min (Abbildung 30A/C/E) noch 120min (Abbildung 30B/D/F) nach *rrIL-6*-Applikation ein Unterschied in der STAT3-Immunreaktivität zwischen *rrIL-6*- und NaCl-behandelten Tieren festgestellt. Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang bildete als weiteres CVO die AP. Diese zeigte nach 60min keine spezifische *rrIL-6*-induzierte nukleäre STAT3-Translokation (Abbildung 30F), ähnlich den mit 0.9%iger NaCl-behandelten Kontrollen (Abbildung 29E). Allerdings waren unabhängig von der Stimulationszeit und der Art der Substanz einige wenige nukleäre STAT3-Signale vorhanden, die sich in der AP in einer Zellschicht nahe dem vierten Ventrikel befanden. Diese Signale wurden jedoch oft durch eine dichte Zellschicht der AP verdeckt, die sich entlang des vierten Ventrikels zog und eine moderate zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität exprimierte (Abbildung 29E/F und 30E/F).

3.3 Systemische Applikation (i.p.) von LPS im Vergleich zur systemischen Applikation (i.p.) von *rrIL-6*

3.3.1 *Verlauf der Körpertemperatur nach intraperitonealer Applikation von LPS bzw. *rrIL-6* bei Ratten*

In diesem Abschnitt soll die Wirkung eines exogenen Pyrogens mit der Wirkung eines endogenen Pyrogens auf den Rattenorganismus direkt verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde den Ratten als exogenes Pyrogen LPS (100µg/kg, n = 7) und als endogenes Pyrogen *rrIL-6* (45µg/kg, n = 5) systemisch appliziert.

Dabei wurde die abdominale Körpertemperatur LPS- und *rrIL-6*-behandelter Ratten kontinuierlich aufgezeichnet. Veränderungen der Körperkerntemperatur als Reaktion auf die Applikation werden in Abbildung 31 wiedergegeben. In beiden Tiergruppen erhöht sich durch die Applikationsprozedur zum Zeitpunkt "0" (Pfeil) die Körpertemperatur vorübergehend um ca. 0.8°C.

Nach diesem Streß-induzierten Anstieg entwickelt sich bei den LPS-behandelten Tieren ein ausgeprägter biphasischer Fieberverlauf, der sein erstes Temperaturmaximum von 38,0°C bei 180min und sein zweites Maximum von 38,8°C zwischen 300min bis 345min besitzt. In *rrIL-6*-behandelten Tieren ist ebenfalls ein Anstieg der abdominalen Körpertemperatur über drei bis vier Stunden zu verzeichnen, mit einem Temperaturgipfel von 37,8°C nach 225min. Insgesamt verläuft die Fieberantwort von Tieren nach *rrIL-6*-Applikation wesentlich moderater als in LPS-behandelten Tieren. Dies wird dadurch bestätigt, daß die LPS-induzierte Fieberantwort zwischen 255min bis 465min nach Injektion signifikant höher ist als in Tieren nach systemischer *rrIL-6*-Applikation ($P < 0.05$).

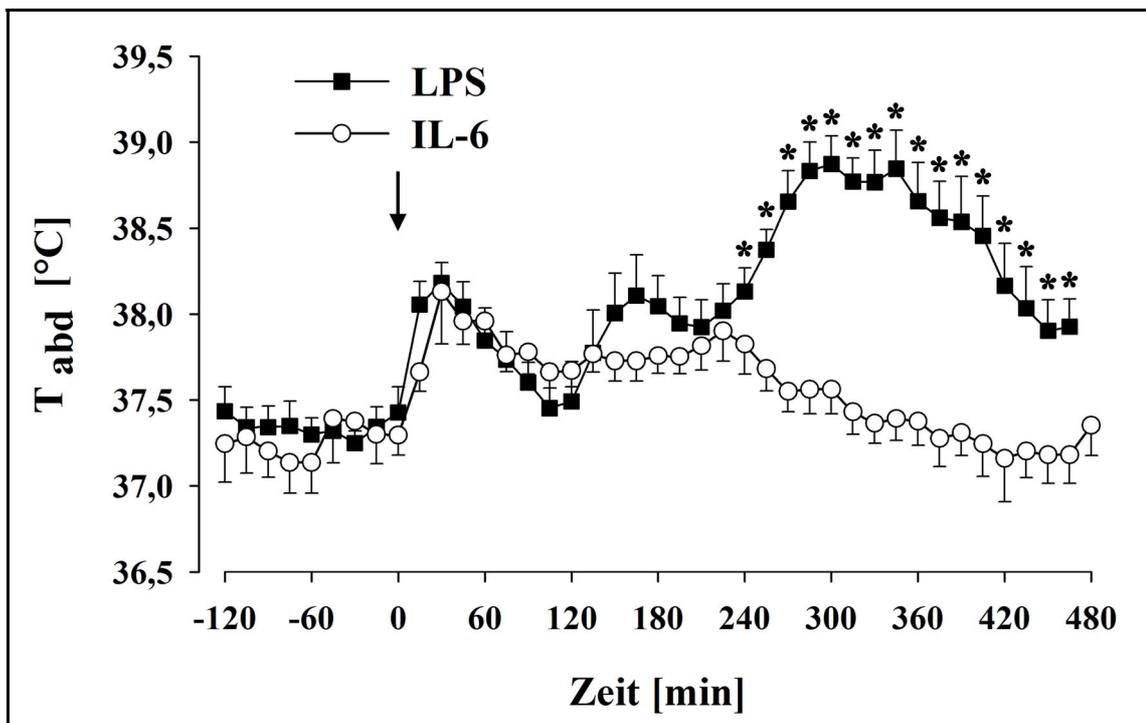


Abbildung 31:

Kontinuierliche Aufzeichnung des Verlaufs der abdominalen Körpertemperatur (T_{abd}) vor und nach i.p. Injektion von LPS (100 μ g/kg, $n = 7$) oder *rrIL-6* (45 μ g/kg, $n = 5$). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Applikation. Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) dargestellt. *Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$). Die Fieberkurven der LPS- bzw. *rrIL-6*-behandelten Tiere wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA und anschließend post-hoc-Test nach Bonferroni verglichen.

3.3.2 Vergleich der Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 nach intraperitonealer Applikation von rrIL-6 bzw. LPS

Die bisherigen Ergebnisse haben ergeben, daß im Zusammenhang mit der i.p. Applikation von LPS (100µg/kg) und rrIL-6 (45µg/kg) vor allem die Zeitpunkte 120min bzw. 60min nach Applikation für die nukleäre STAT3-Translokation von Bedeutung waren. Aus diesem Grund wurden diese Zeitpunkte nach Gabe der beiden pyrogenen Substanzen zum direkten Vergleich der entsprechenden IL-6-Plasmakonzentrationen herausgegriffen (Abbildung 32). Die IL-6-Plasmakonzentrationen erreichten 60min nach rrIL-6-Stimulation Werte von 5116 ± 1291 IU/ml und nach LPS-Stimulation Werte von 470 ± 236 IU/ml, während die Kontrollen einen basalen Wert von 29 ± 5 IU/ml aufwiesen.

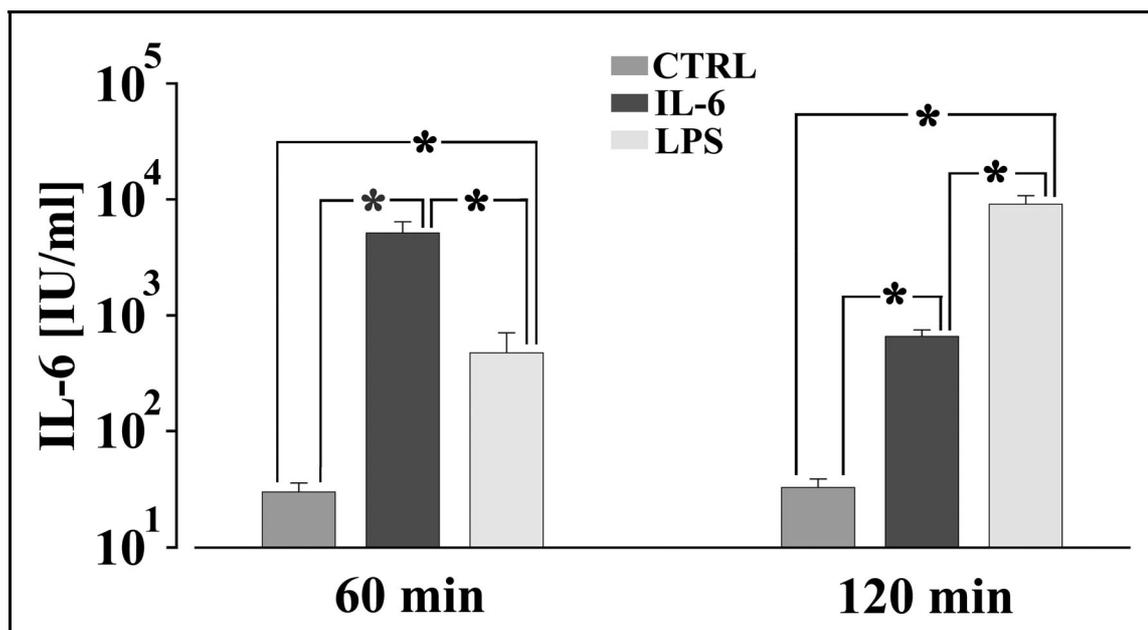


Abbildung 32:

Plasmakonzentrationen von bioaktivem IL-6 60min und 120min nach i.p. Applikation von LPS (100µg/kg) bzw. rrIL-6(45µg/kg) sowie eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL). Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) dargestellt (n = 4 -12 pro Säule). *Signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen (P < 0.05). Die IL-6-Plasmakonzentrationen der LPS- und rrIL-6-behandelten Tiere wurden untereinander und mit denen der Kontrollen verglichen. Die statistische Analyse ist mit einer einfaktoriellen ANOVA bestimmt worden, der sich ein Student-Newman-Keuls post-hoc-Test anschloß.

120min nach Stimulation sank die IL-6-Plasmakonzentration *rrIL-6*-stimulierter Tiere auf 656 ± 93 IU/ml ab, während die IL-6-Plasmakonzentration nach LPS-Stimulation auf 9088 ± 1678 IU/ml anstieg und in Kontrolltieren mit 32 ± 6 IU/ml gleich blieb.

Sowohl 60min als auch 120min nach i.p. Applikation waren die Konzentrationen von bioaktivem IL-6 im Plasma Pyrogen-stimulierter Tiere im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht ($P < 0.05$). Zusätzlich war 60min nach i.p. Applikation die IL-6-Plasmakonzentration *rrIL-6*-stimulierter Tiere signifikant gegenüber der IL-6-Plasmakonzentration LPS-stimulierter Tiere erhöht. 120min nach Injektion ergab sich ein umgekehrtes Bild, indem die IL-6-Plasmakonzentration LPS-stimulierter Tiere gegenüber der Plasma-IL-6-Konzentration *rrIL-6*-stimulierter Tiere signifikant erhöht war.

3.3.3 *Quantitative Analyse der Anzahl nukleärer STAT3 Signale 60min bzw. 120min nach intraperitonealer Applikation von rrIL-6 bzw. LPS*

Wie schon in den vorherigen Kapiteln beschrieben, war eine geringe nukleäre STAT3 Translokation in der ependymalen Auskleidung der Ventrikel, in den Meninges, im Plexus chorioideus und in der Eminentia mediana 60min bzw. 120min nach i.p. Applikation von LPS bzw. *rrIL-6* vorhanden. Dies galt auch für die AP. Diese wies nicht nur 60min und 120min nach Pyrogenapplikation eine geringe nukleäre STAT3-Immunreaktivität auf, sondern auch nach systemischer Applikation 0.9%iger NaCl. Im Gegensatz dazu konnte eine intensive nukleäre STAT3-Immunreaktivität bzw. eine hohe nukleäre STAT3-Translokation vornehmlich 60min nach *rrIL-6*-Applikation und 120min nach LPS-Applikation in zwei der CVOs, dem OVLT und dem SFO beobachtet werden. Das zeitabhängige Auftreten der nukleären-STAT3 Translokation 60min nach Injektion von *rrIL-6* bzw. 120min nach Injektion von LPS im OVLT und SFO bildete die Grundlage der quantitativen Analyse der Anzahl der STAT3-positiven Zellkerne in diesen beiden CVOs (Abbildung 33). Während in den NaCl-behandelten Kontrolltieren 60min und 120min nach Applikation nur wenige (0-2) Zellkerne eine nukleäre STAT3-Translokation im OVLT und SFO aufwiesen, stieg die Anzahl der STAT3-markierten Zellkerne nach Pyrogenapplikation drastisch an.

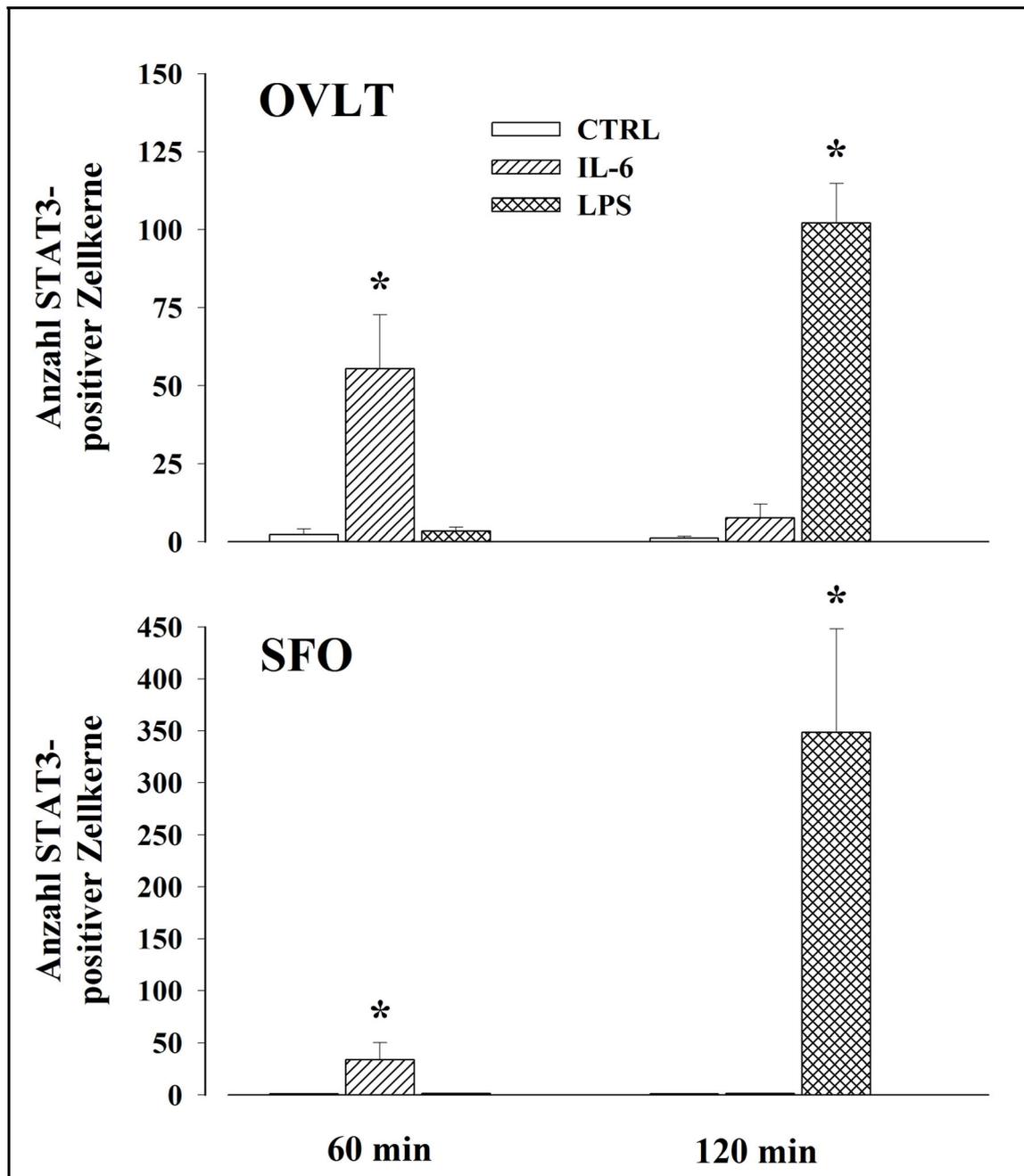


Abbildung 33: Quantitative Auswertung der Anzahl nukleärer STAT3 Signale im OVLT (obere Abbildung) und im SFO (untere Abbildung) 60min nach i.p. Applikation von *rr*IL-6 (45µg/kg) und 120min nach LPS Gabe (100µg/kg). Die gezählten Zellkerne werden als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) wiedergegeben. Für jede Gruppe wurden vier bis fünf Tiere mit jeweils drei Schnittebenen pro OVLT und SFO analysiert. Die statistische Analyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem post-hoc-Test durchgeführt, wobei mit $P < 0.05$ eine statistische Signifikanz (*) zwischen den Pyrogen-behandelten Tieren und den jeweiligen Kontrollen auftrat.

Kapitel 3: Ergebnisse

In *rrIL-6*-behandelten Ratten konnte 60min nach Injektion ein Anstieg der Anzahl STAT3-positiver Zellkerne auf 56 ± 17 Kerne im OVLT und auf 34 ± 16 Kerne im SFO beobachtet werden, der 120min nach Stimulation mit einer Anzahl von 8 ± 4 im OVLT und 1 ± 1 im SFO jedoch fast wieder verschwunden waren. In LPS-stimulierten Ratten war 60min nach i.p. Injektion kein Anstieg der STAT3-positiven Zellkerne mit 3 ± 1 Kernen im OVLT und 1 ± 1 Kernen im SFO zu verzeichnen. Wurde jedoch 120min nach LPS Stimulation die Anzahl der STAT3-markierten Zellkerne ermittelt, war ein signifikanter Anstieg auf 102 ± 13 Kerne im OVLT und 348 ± 100 Kerne im SFO zu beobachten. Dieser LPS-induzierte Anstieg der STAT3-markierten Zellkerne im OVLT und SFO verschwand 180min nach LPS-Stimulation wieder (1-2 Kerne, ohne Abbildung). Ähnlich war es bei den *rrIL-6*-stimulierten Tieren 30min nach Stimulation, wo noch kein Anstieg der STAT3-markierten Zellkerne (1-2 Kerne) vorhanden ist (ohne Abbildung). Bei einem Vergleich der Anzahl nukleärer STAT3-Signale mit den entsprechenden Konzentrationen des bioaktiven Interleukin-6 im Blutplasma lies sich jeweils eine Korrelation für das OVLT ($r^2 = 0.82$) und das SFO ($r^2 = 0.62$) ableiten (Abbildung 34). Dabei wurde die Anzahl der nukleären STAT3-Signale für jedes OVLT und jedes SFO mit den entsprechenden Plasmakonzentrationen des bioaktiven IL-6 60min nach systemischer *rrIL-6*- ($45\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 4$) und 120min nach systemischer LPS- ($100\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 4$) Applikation verglichen.

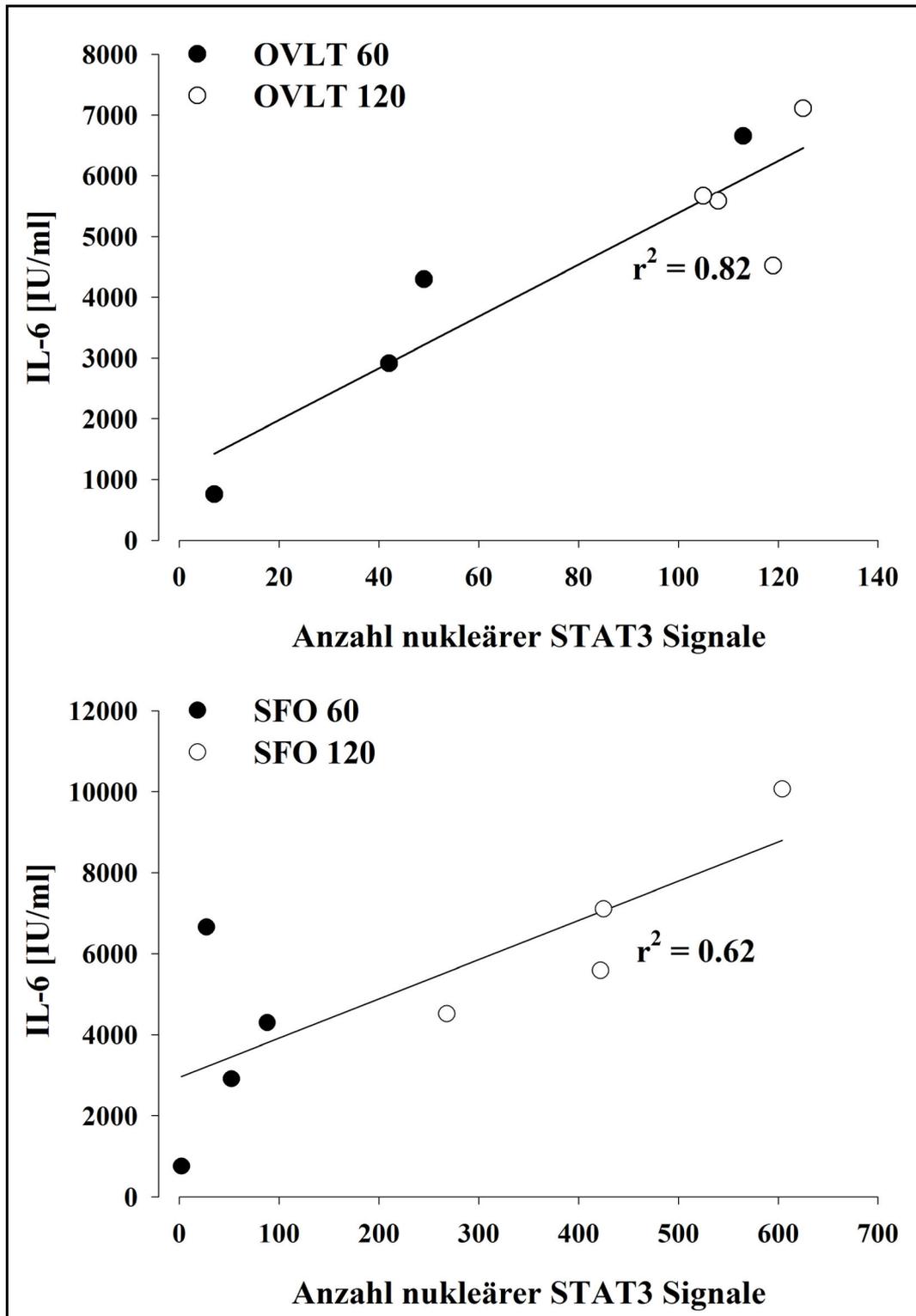


Abbildung 34:

Korrelation der Anzahl nukleärer STAT3 Signale des OVLT (n = 8) und SFO (n = 8) mit der entsprechenden Konzentration des bioaktiven IL-6 (IU/ml) im Blutplasma 60min nach i.p. Applikation von *rr*IL-6 (45µg/kg, n = 4) und 120min nach Injektion von LPS (100µg/kg, n = 4). Die Anzahl der nukleären STAT3-Signale wurde durch Zählung von drei Schnittebenen pro OVLT bzw. SFO und Tier ermittelt. Korrelationskoeffizient OVLT: $r^2 = 0.82$, Korrelationskoeffizient SFO: $r^2 = 0.62$.

3.4 Neuroanatomische Charakterisierung des zellulären Ursprungs der nukleären STAT3-Signale im OVLT und SFO 60min nach systemischer Applikation (i.p.) von *rrIL-6* sowie 120min nach systemischer Applikation (i.p.) von LPS

Die vorangegangenen Analysen ergaben ein zeitabhängiges Auftreten der nukleären STAT3-Signale in den CVOs OVLT und SFO. Ein Maximum der nukleären STAT3-Expression konnte 60min bzw. 120min nach Stimulation mit *rrIL-6* bzw. LPS nachgewiesen werden. Zu allen anderen Zeitpunkten sowie nach i.p. Injektion 0.9%iger NaCl war keine derartige bzw. nur eine sehr geringe nukleäre STAT3-Translokation im OVLT und SFO sowie wenigen anderen Strukturen zu sehen.

Nun war es von weiterem Interesse zu erfahren, welchen zellulären Ursprung die nukleäre STAT3-Translokation im OVLT und SFO besaß. Aus diesem Grund wurden *rrIL-6* (45µg/kg) oder LPS (100µg/kg) systemisch appliziert und die Gehirnschnitte von OVLT und SFO im Anschluß durch Doppel- und Dreifachmarkierungen des STAT3-Antikörpers mit zellspezifischen Markerproteinen durch indirekte Immunfluoreszenz immunhisto-chemisch analysiert (Siehe Kapitel 2.7.2.3). Zu diesem Zweck wurden Marker für Astro- und Oligodendroglia, endotheliale, mikrogliale sowie neuronale und ein zellkernspezifischer Marker in Kombination mit dem STAT3-Antikörper eingesetzt. Die Ähnlichkeit der nukleären STAT3-Signale im OVLT mit den Kresylviolett gefärbten neuronalen Zellkernen ließ annehmen, daß vorwiegend neuronale Zellen des OVLT mit einer nukleären STAT3-Translokation auf einen pyrogenen Stimulus reagieren würden. Von großem Interesse waren somit neben den anderen zellspezifischen Markerproteinen die neuronalen Zellmarker. Abbildung 35 stellt eine Übersicht über die verschiedenen Markierungen dar. Nukleäre STAT3-Signale werden grün, zellspezifische Markerproteine rot und DAPI-markierte Zellkerne blau 120min nach LPS-Stimulation dargestellt. Dies gilt stellvertretend auch für die Ergebnisse, die sich 60min nach *rrIL-6*-Stimulation ergaben. Nukleäre STAT3-Signale traten pyrogenspezifisch 60min und 120min nach systemischer Applikation von *rrIL-6* (45µg/kg) bzw. LPS (100µg/kg) fast ausschließlich im OVLT (Abbildung 35A und 35A-D) und SFO (Abbildung 35D und 36E-H) auf.

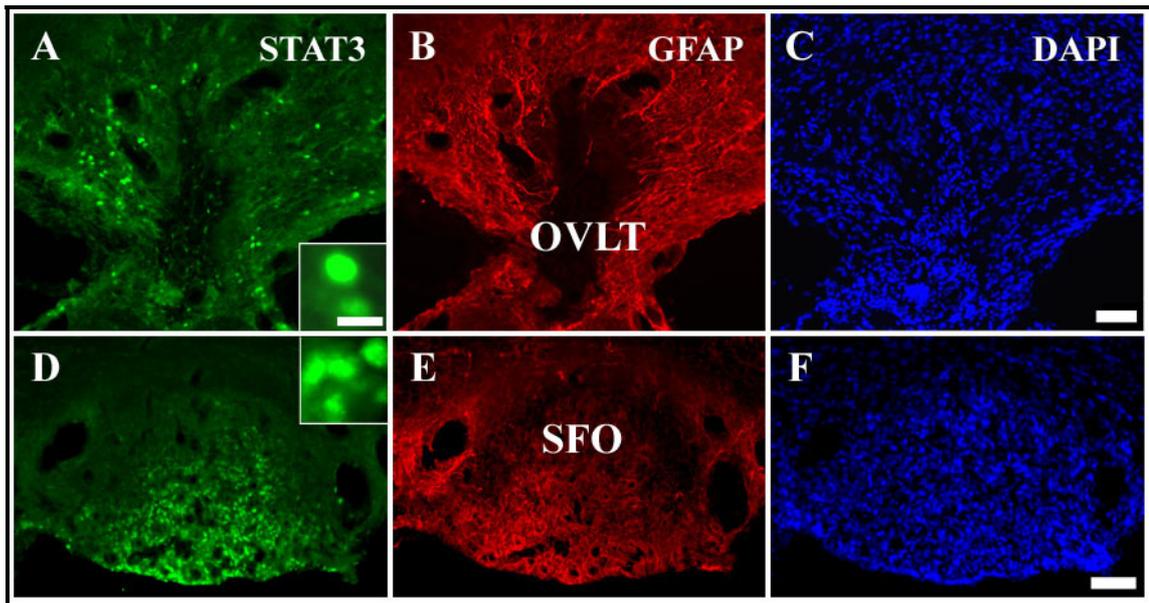


Abbildung 35:

Immunfluoreszenzhistochemische Abbildung des OVLT (A-C) und des SFO (D-F) 120min nach Stimulation mit LPS (100µg/kg). Die nukleären STAT3-Signale sind grün gefärbt (A/D) und von runder Form im OVLT (Inset A) bzw. von unregelmäßiger Form im SFO (Inset D). Als Beispiel für ein zellspezifisches Markerprotein wird in rot der gleiche Ausschnitt mit GFAP-markierten Astrozyten dargestellt (B/E). Die zur Zellkernfärbung verwendete DAPI Färbung wird blau (C/F) abgebildet. Eichbalken für A - C = 50µm, für D-F = 50µm und für die Insets A und B = 10µm.

Die nukleäre DAPI-Färbung (blau, Abbildungen 35C/F und 35C/D/G/H) wurde als ubiquitärer Zellkernmarker eingesetzt, der die Zellkerne auch in Kontrolltieren unter anderem im OVLT und SFO detektierte. Die Überlagerung gleicher Ausschnitte von OVLT und SFO zeigten, daß alle grünen STAT3 Signale mit DAPI-markierten Zellkernen kolokalisiert waren und dadurch eine grünblaue Färbung erhielten (Abbildung 35C/D/G/H). Dies konnte für alle Kolokalisationsstudien nachgewiesen werden, wobei die zellspezifischen Markerproteine variierten. Alle eingesetzten spezifischen Zellmarker, wie z.B. GFAP (Abbildung 35B/E), wurden rot dargestellt. Auch die zellspezifischen Markerproteine waren, wie die nukleäre DAPI-Färbung, ubiquitär im Gehirn nachweisbar und auch in Kontrolltieren vorhanden.

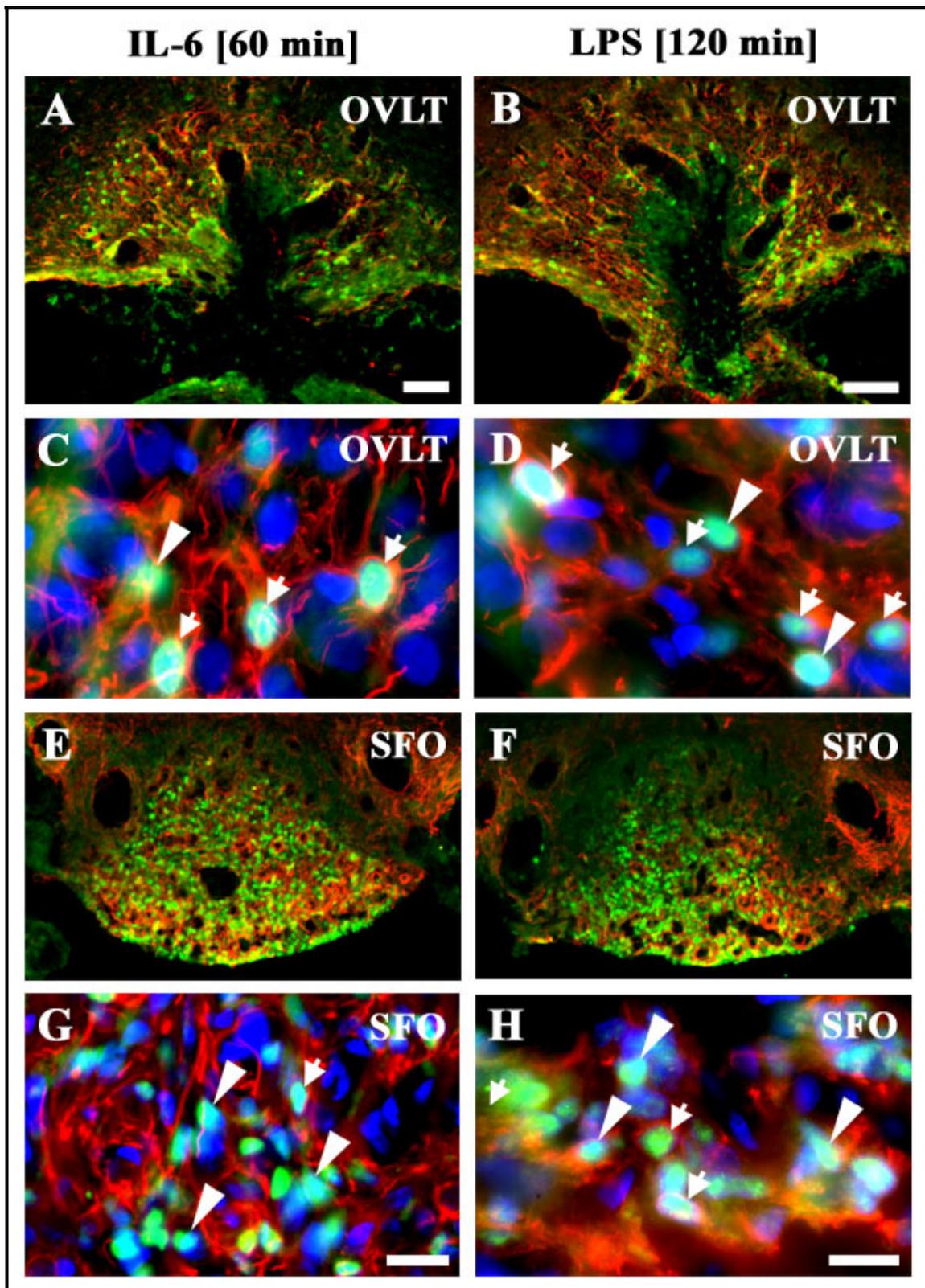


Abbildung 36:
Legende siehe Seite 112.

Legende zur Abbildung 36 (Seite 111):

Pyrogen-induzierte nukleäre STAT3-Translokation (grün) 60min (A/C/E/G) nach i.p. Stimulation mit *rrIL-6* (45µg/kg) und 120min (B/D/F/H) nach i.p. Applikation von LPS (100µg/kg) in Zellen des OVLT (A-D) und SFO (E-H). Ebenfalls war eine intensive GFAP-Markierung (rot) im OVLT (A-D) und SFO (E-H) vorhanden. Die höheren Vergrößerungen des OVLT (C/D) und SFO (G/H) zeigen, daß alle grünen STAT3-Signale mit dem blauen Zellkernmarker DAPI kolokalisiert waren (hellblau, C/D/G/H). Die Übereinanderlagerung nukleärer STAT3-Signale (hellblau) und GFAP-markierter Astrozyten (rot) im OVLT (A/B) und SFO (E/F) ergab, daß ein Teil der nukleären STAT3-Signale mit Astrozyten kolokalisiert war (C/D/G/H, weißer Pfeil), während der andere Teil keine Kolokalisation aufwies (C/D/G/H, weiße Pfeilspitze). Eichbalken für A/E/F = 100µm, für B = 100µm, für C/D/H = 25µm und G = 50µm.

Die Koinkubation des STAT3-Antikörpers mit den verschiedenen zellspezifischen Markerproteinen, die neuronale, endotheliale, mikrogliale und astrogliale Zellen sowie Oligodendrozyten detektierten, resultierte in einer ausschließlichen Kolokalisation der nukleären STAT3-Signale mit GFAP-markierten Astrozyten. Auch konnte keine Kolokalisation von STAT3-Signalen mit c-Fos-markierten Zellen festgestellt werden. Die Überlagerung der nukleären STAT3-Signale mit den rot GFAP-markierten Astrozyten ist in einer Übersicht für das OVLT (Abbildung 36A/B) und das SFO (Abbildung 36E/F) für 60min nach i.p. Gabe von *rrIL-6* (Abbildung 36A/E) und 120min nach i.p. Gabe von LPS (Abbildung 36B/F) wiedergegeben. In den höheren Vergrößerungen des OVLT (Abbildung 36C/D) und des SFO (Abbildung 36G/H) sind die mit DAPI kolokalisierten nukleären STAT3-Signale als blaugüne Kerne gut zu erkennen (Abbildung 36C/D/G/H). Ein Teil der nukleären STAT3-Signale (blaugrün) war nach *rrIL-6* bzw. LPS Applikation mit den rot-markierten Astrozyten im OVLT (Abbildung 36C/D, weißer Pfeil) und im SFO (Abbildung 36G/H, weißer Pfeil) kolokalisiert. Dennoch waren auch nukleäre STAT3-Signale vorhanden, die keine Kolokalisation mit den GFAP-markierten Astrozyten 60min und 120min nach Pyrogenapplikation im OVLT (Abbildung 36C/D, weiße Pfeilspitze) und SFO (Abbildung 36G/H, weiße Pfeilspitze) aufwiesen. Diese nukleären STAT3 Signale waren weder mit Astrozyten noch mit einem spezifischen Zellmarker für endotheliale, mikrogliale, oligodendrogliale oder neuronale Zellen kolokalisiert, so daß deren zellulärer Ursprung unklar bleibt.

3.5 Zentrale Applikation (i.c.v.) von *rrIL-6*

Neben der Erkenntnis, daß die zentrale Applikation von *rrIL-6* eine Fieberantwort induzieren kann, wird weiterhin vermutet, daß das Gehirn nach einem entsprechenden Stimulus (LPS) in der Lage ist, IL-6 selbst zu synthetisieren. In der folgenden Studie sollte festgestellt werden, ob durch i.c.v. Applikation von *rrIL-6* (100ng/Tier und 200ng/Tier) eine Fieberantwort induziert werden kann, die mit einer Aktivierung zentraler Hirnstrukturen einhergeht und ob eine eventuelle Aktivierung mit der STAT3-Immunhistochemie nachgewiesen werden kann.

3.5.1 Verlauf der abdominalen Körpertemperatur nach intrazerebroventrikulärer Injektion von *rrIL-6* bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl

Abbildung 37 zeigt den Verlauf der abdominalen Körpertemperatur nach i.c.v. Applikation von *rrIL-6* (100ng/Tier, n = 6 und 200ng/Tier, n = 7) bzw. 0.9% NaCl (n = 7). Die zentrale Applikation 0.9% NaCl verursachte einen streß-induzierten Anstieg der Körpertemperatur in den Kontrolltieren. Der Anstieg hielt ca. 60min an und pendelte sich, im Gegensatz zu den *rrIL-6*-behandelten Tieren, wieder auf einen Basalwert von ca. $37 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ein. In *rrIL-6*-behandelten Tieren war sofort nach dem Streß-induzierten Anstieg der Körpertemperatur ein weiterer fieberhafter Anstieg zu verzeichnen, wobei die basale Körpertemperatur von ca. $37 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ auf Werte von ca. $39.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (200ng/Tier, n = 7) bzw. $38.4 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ (100ng/Tier, n = 6) anstieg. Die Körpertemperaturen der Pyrogen-behandelten Tiere blieben über einen Zeitraum von 6h erhöht, so daß sie am Ende der Meßperiode, nach 480min, mit Werten von $38.4 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ (200ng/Tier) und $38.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (100ng/Tier) immer noch über den Temperaturen der Kontrolltiere mit $37.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ lagen.

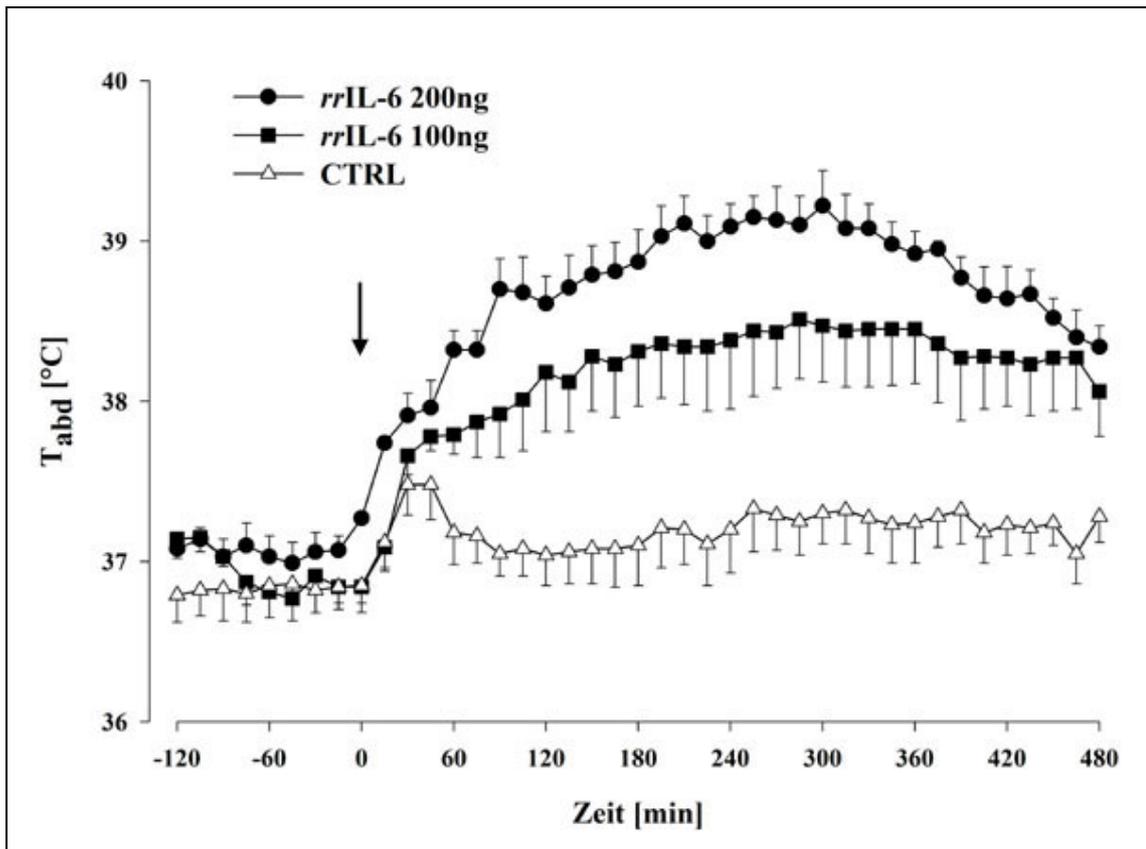


Abbildung 37:

Verlauf der Körpertemperatur in Ratten nach i.c.v. Applikation von *rrIL-6* mit einer Bolusinjektion von 200ng/Tier ($n = 7$) und 100ng/Tier ($n = 6$) bzw. eines vergleichbaren Volumens (5 μ l) 0.9%iger NaCl (CTRL, $n = 7$). Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich vor und nach der Pyrogenapplikation gemessen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Applikation. Die Meßwerte werden als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) angegeben.

3.5.2 *Die intrazerebroventrikuläre Applikation von rrIL-6 induziert eine zeitabhängige nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 in verschiedenen Gehirnstrukturen*

Der zentralen *rrIL-6* Applikation wurde die STAT3-Immunhistochemie angeschlossen. In Kontrolltieren ($n = 14$) war zu allen Zeitpunkten (15min, 30min, 60min, 90min) nach i.c.v. Applikation 0.9%iger NaCl eine sehr niedrige basale STAT3-Expression im Gehirn vorhanden.

Kapitel 3: Ergebnisse

Die zytoplasmatische STAT3-Expression war sowohl in NaCl- als auch Pyrogenstimulierten Tieren kaum von der Hintergrundfärbung zu unterscheiden, so daß die Kresylviolett gegengefärbten Zellkerne in diesem Fall besonders hervortraten (Abbildung 38). Im Gegensatz dazu war 30min nach i.c.v. Bolusapplikation von *rrIL-6* (200ng/Tier, n = 17) neben einem starken Anstieg der STAT3-Immunreaktivität in verschiedenen Gehirnbereichen auch ein Optimum der nukleären STAT3-Translokation zu verzeichnen. Diese nukleär translozierte STAT3-Immunreaktivität war im OVLT (Abbildung 38A/C) und im anliegenden Nucleus praeopticus ventromedialis (VMPO, Abbildung 38A/C) sowie im Nucleus supraopticus (Abbildung 38E) zu beobachten. Weiterhin war eine starke nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 im Nucleus tractus solitarius (NTS, Abbildung 38F) zu sehen. Zusätzlich zeigten Zellen der Umgebung des dritten Ventrikels sowie einige Meningealzellen eine intensive nukleäre STAT3-Immunreaktivität 30min nach zentraler *rrIL-6*-Applikation (Abbildung 38A/C/F). Eine leichte nukleäre STAT3-Translokation war im SFO (Abbildung 32D) anzutreffen. Die AP hingegen wies keine nukleäre STAT3-Translokation auf (AP, Abbildung 38C). Die Größe und die runde Form der STAT3-markierten braunen Zellkerne lies ein überwiegendes Vorkommen der STAT3-Expression in neuronalen Zellkernen vermuten. Diese nukleäre STAT3-Translokation konnte zu keiner anderen Stimulationszeit in dieser Intensität beobachtet werden. Während die Kontrollen zu allen Stimulationszeitpunkten eine schwache basale STAT3-Immunreaktivität aufwiesen, konnte der Beginn der nukleären Translokation der STAT3-Immunreaktivität 15min nach Pyrogenstimulation beobachtet werden, der nach 30min sein Maximum erreichte und deshalb als Dokumentationszeitpunkt ausgewählt wurde. Danach ging die Stärke der nukleären STAT3-Expression zurück, so daß 90min nach *rrIL-6*-Injektion die nukleäre STAT3-Translokation nur noch schwach vorhanden war.

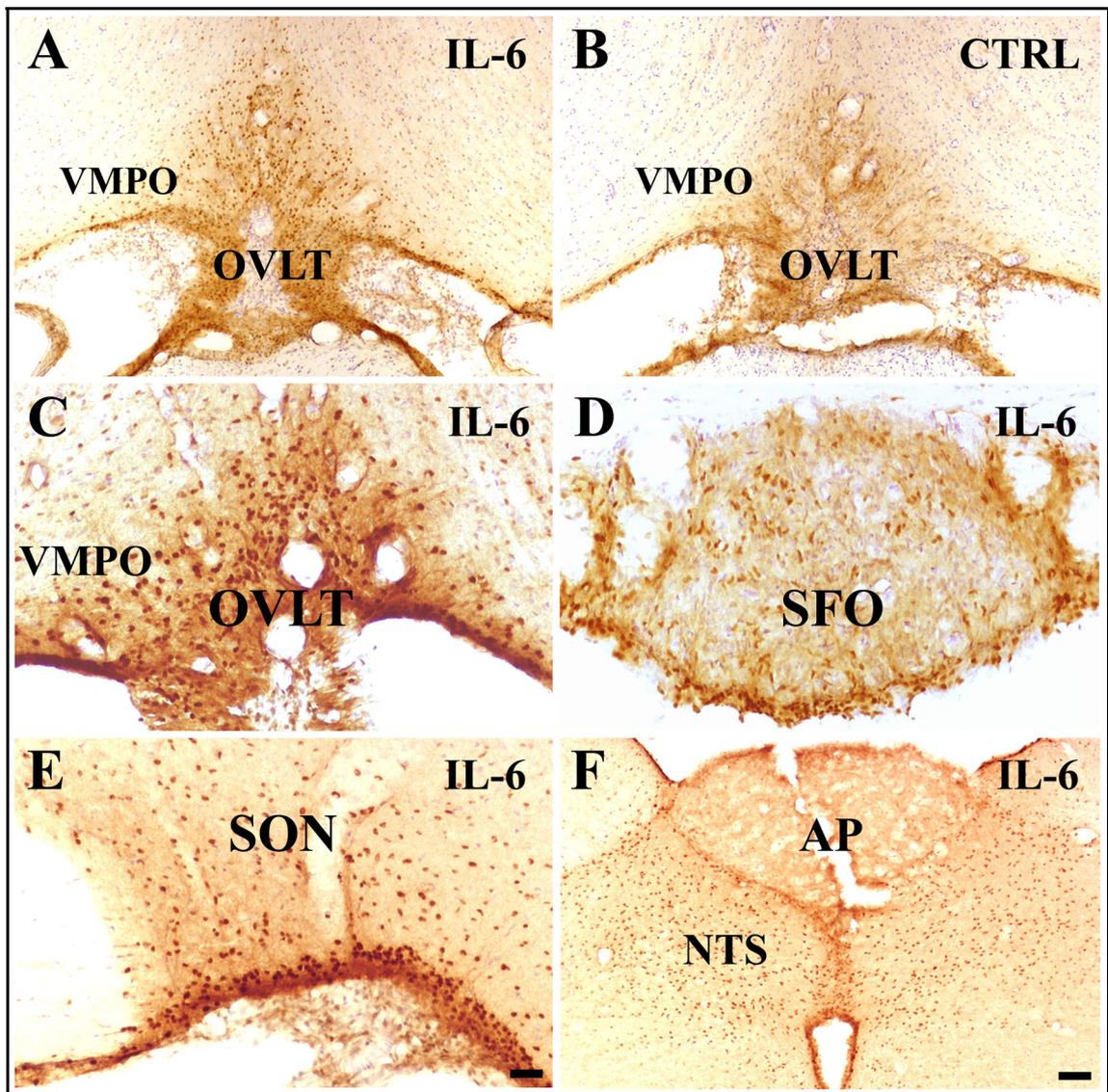


Abbildung 38:

Immunhistochemischer Nachweis der nukleären STAT3-Translokation in Schnittpräparaten von Rattengehirnen 30min nach i.c.v. Applikation von *rrIL-6* (200ng/Tier, n = 7) oder eines vergleichbaren Volumens (5µl) 0.9%iger NaCl (CTRL, n = 5). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die starke nukleäre STAT3-Translokation 30min nach *rrIL-6* Stimulation in verschiedenen Gehirnarealen, wie dem OVLT (A/C) mit angrenzendem Nucleus ventromedialis praeopticus (VMPO, A/C) im Vergleich zu den NaCl-behandelten Tieren (B). Weiterhin zeigten der Nucleus supraopticus (SON, E), der Nucleus tractus solitarius (NTS, F) eine starke sowie das SFO (D) eine mittlere bis schwache nukleäre STAT3-Translokation 30min nach *rrIL-6* Injektion. Eichbalken für A/B/F = 100µm, für C-E = 50µm.

3.5.3 *Nachweis des nukleären Ursprungs der STAT3 Signale durch Markierung der Zellkerne mit DAPI*

Mit Hilfe des nukleären Zellmarkers DAPI soll durch eine konfokale Mikroskopanalyse der nukleäre Ursprung der STAT3-Signale analysiert werden. Rekombinantes rattenspezifisches Interleukin-6 (200ng/Tier) wurde in einer Bolusinjektion i.c.v. verabreicht. Die STAT3-Signale wurden durch Immunfluoreszenz im OVLT und VMPO als grüne und runde Signale wiederum 30min nach Stimulation nachgewiesen (Abbildung 39A). Der Zellkernmarker DAPI markierte in diesem Ausschnitt alle Zellkerne dieser Gehirnregion blau (Abbildung 39B). Die Überlagerung der intensiv grünen und runden STAT3 Signale und der blau markierten Zellkerne zeigte, daß alle STAT3 Signale mit blau markierten Zellkernen kolokalisiert waren, wodurch sie hellblau erschienen (Abbildung 39C).

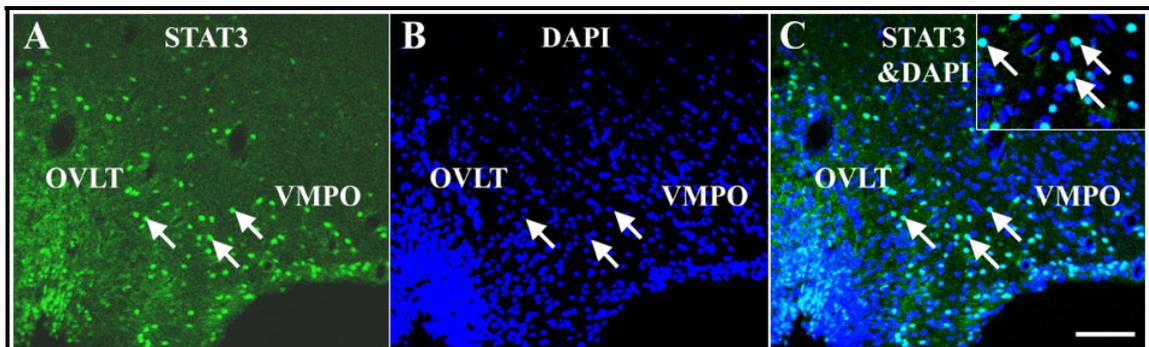


Abbildung 39:

Nukleäre STAT3-Translokation im OVLT und VMPO 30min nach i.c.v. Applikation von *rrIL-6* (200ng/Tier). Die konfokalen Immunfluoreszenzbilder stellen die *rrIL-6*-induzierte STAT3-Immunreaktivität grün (A) und die DAPI-gefärbten Zellkerne blau (B) im OVLT und VMPO dar. Die Überlagerung der grünen STAT3-Signale (A, weiße Pfeile) und der blauen Zellkerne (B, weiße Pfeile) zeigt in Bild C, daß alle grünen STAT3-Signale mit blau gefärbten Zellkernen kolokalisiert (C, weiße Pfeile), wodurch sie eine grünblaue Farbe erhielten (Inset C, weiße Pfeile). Eichbalken für A-C = 100µm.

3.5.4 Vergleich der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 60min bzw. 30min nach intraperitonealer bzw. intrazerebroventrikulärer Applikation von rrIL-6

Der Vergleich der nukleär translozierten STAT3-Immunreaktivität erfolgte 60min bzw. 30min nach i.p. bzw. i.c.v. Applikation von rrIL-6 (100µg/kg bzw. 200ng/Tier). Die nukleäre STAT3-Translokation war nach i.p. Injektion vor allem in den CVOs OVLT und SFO zu sehen. Eine leichte, nukleär translozierte STAT3-Immunreaktivität war zusätzlich in der AP, der ependymalen Auskleidung des dritten Ventrikels, den Meninges, dem Plexus chorioideus, der Eminentia mediana und dem Nucleus praeopticus ventromedialis (Tabelle 15). Nach i.p. Applikation der Kontrollsubstanz (NaCl, 0.9%) war nach 60min eine leichte nukleäre STAT3-Translokation nur in der AP und im Nucleus tractus solitarius vorhanden. Nach i.c.v. Applikation konnte eine starke nukleäre STAT3-Translokation in verschiedensten Gehirnbereichen beobachtet werden, so daß diese neben dem OVLT auch in Zellen der ependymalen Auskleidung und der Ventrikelumgebung, den Meningealzellen sowie dem SON, VMPO, den Nuclei raphes, der Area tegmentalis ventralis, dem ventromedialen Bereich der Medulla oblongata und dem Nucleus tractus solitarius auftrat (Tabelle 15). Weiterhin trat eine mittlere nukleäre STAT3-Translokation in einer Vielzahl von Strukturen auf (Tabelle 17), und im Nucleus arcuatus und in der ependymalen Auskleidung der Ventrikel war sie in den Kontrollen konstitutiv vorhanden (Tabelle 15). In der AP konnte 30min nach rrIL-6 Applikation keine und im SFO nur eine geringe nukleäre STAT3-Translokation gesehen werden.

Legende zur Tabelle 15 (Seite 119):

Semiquantitative Analyse der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3. Die Analyse der Distribution der nukleären STAT3-Translokation erfolgte 60min nach i.p. (45µg/kg) sowie 30min nach i.c.v. (200ng/Tier) Applikation von rrIL-6 bzw. eines vergleichbaren Volumens 0.9%iger NaCl (CTRL). Die Analyse wurde anhand einer Vier-Punkte-Skala durchgeführt, um eine starke = +++, mittlere = ++, oder schwache = + von keiner = - nukleären STAT3 Translokation zu unterscheiden. Die hier angegebenen Gehirnregionen sind nach Paxinos & Watson (1998) modifiziert.

Tabelle 15:

**Nukleäre STAT3 Expression nach *rrIL-6*
Applikation**

Gehirnstrukturen	i.p.		i.c.v.	
	CTRL	<i>rrIL-6</i>	CTRL	<i>rrIL-6</i>
	60min	60 min	30min	30min
Zirkumventrikuläre Organe (CVOs) & Liquorstrukturen				
Area periventricularis				
- Ventriculi laterales	-	-	-	+++
- Ventriculus quartus	-	-	-	++
- Ventriculus tertius	-	-	-	+++
Area postrema (AP)	+	+	-	-
Organum subfornicale (SFO)	-	++	-	+
Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)	-	++	-	++
Ependymale Auskleidung der Ventrikel	-	+	+	+++
Meninges	-	+	-	+++
Plexus chorioideus	-	+	n.d.	n.d.
Hypothalamus				
Area anterioris hypothalami	-	-	-	++
Area dorsalis hypothalami	-	-	-	++
Area posterioris hypothalami	-	-	-	++
Area retrochiasmatica	-	-	-	++
Eminentia mediana	-	+	n.d.	n.d.
Nucleus arcuatus	-	-	+	+
Nucleus dorsomedialis hypothalami	-	-	-	+
Nucleus paraventricularis	-	-	-	+
- subnucleus parvocellularis	-	-	n.d.	n.d.
- subnucleus magnocellularis	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus periventricularis	-	-	-	+
Nucleus praeopticus magnocellularis	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus praeopticus medialis	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus praeopticus medianus	-	-	-	+
Nucleus praeopticus ventromedialis	-	+	-	+++
Nucleus suprachiasmaticus	-	-	-	+
Nucleus supraopticus	-	-	-	+++
Nucleus ventromedialis hypothalami	-	-	-	+
Regio lateralis hypothalami	-	-	-	++
Regio praeoptica lateralis	-	-	-	++
Regio praeoptica medialis	-	-	-	++
Regio periarquata	-	-	-	+++
Telencephalon & Thalamus				
Bandeletta diagonalis Broca	-	-	n.d.	n.d.
Cortex (5. Schicht)	-	-	-	+
Cortex piriformis (2. Schicht)	-	-	-	+
Nuclei habenulae thalami	-	-	-	++
Nuclei mediodorsales thalami	-	-	-	+++
Nucleus medialis septi	-	-	n.d.	n.d.
Septum laterale	-	-	-	++
Medulla oblongata				
Area tegmentalis ventralis	-	-	-	+++
Medulla ventromedialis	-	-	-	+++
Medulla ventrolateralis	-	-	-	++
Nucleus ambiguus	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus cuneatus	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus cuneatus externus	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus dorsalis nervi vagi	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus gracilis	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus nervi hypoglossi	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus olivaris inferioris medialis	-	-	-	++
Nuclei raphes	-	-	-	+++
Nucleus reticularis lateralis	-	-	n.d.	n.d.
Nucleus tractus solitarius	+	+	-	+++
Nucleus spinalis nervi trigemini	-	-	n.d.	n.d.
Substantia nigra	-	-	n.d.	n.d.

Kapitel 4: Diskussion

In der folgenden Diskussion sollen die Ergebnisse der experimentellen Studien in der Reihenfolge des Ergebnisteils besprochen werden.

IL-6 als Mediator der LPS-induzierten Fieberantwort

In den meisten experimentellen Infektions- oder Entzündungsmodellen ist IL-6 eines der wenigen proinflammatorischen Zytokine, welches über einen längeren Zeitraum in einer erhöhten Konzentration in der Zirkulation nachgewiesen werden kann (Cartmell et al. 2000, Roth & De Souza 2001). IL-6 gilt als humoraler Vermittler, der zur Manifestation zentral kontrollierter Krankheitsmechanismen wie Fieber, Übelkeit und Anorexie beiträgt und eine Stimulation der Hypothalamisch-Hypophysären-Achse (HHA) induzieren kann (LeMay et al. 1990, Plata-Salaman 1996, Lenczowski et al. 1999). Nicht nur vorherige Studien (LeMay et al. 1990, Roth et al. 1993, Roth et al. 1994), sondern auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten dies erneut bestätigen. Es wurde eine exzellente Korrelation zwischen der Konzentration von bioaktivem IL-6 im Plasma (Abbildung 24) und dem Anstieg der Körperkerntemperatur nach LPS-Applikation (Abbildung 23) beobachtet. Jedoch ist die Korrelation zwischen einem fieberhaften Anstieg der Körperkerntemperatur und dem Plasmaspiegel von bioaktivem IL-6 für sich genommen nicht ausreichend, um zu behaupten, daß LPS-induziertes Fieber durch zirkulierendes IL-6 ausgelöst wird.

In den letzten Jahren wurde die Schlüsselrolle von IL-6 in der Fieberentstehung durch zusätzliche experimentelle Beweise gestärkt. Zirkulierendes IL-6 wurde bei lokalen Entzündungen als eine wichtige Komponente der Fieberentstehung identifiziert (Cartmell et al. 2000). Darüber hinaus wurden Fieberversuche mit IL-6-defizienten ("knock-out") Mäusen durchgeführt. Durch die Applikation von LPS oder IL-1 β konnte keine Fieberantwort bei diesen Mäusen induziert werden (Chai et al. 1996), jedoch nach zentraler Applikation von exogenem murin-rekombinantem IL-6 (*mrIL-6*). So konnte auf elegante Art eine essentielle Beteiligung von IL-6 für die Entwicklung einer Fieberantwort über zentral vermittelte Krankheitsmechanismen nachgewiesen werden

(Chai et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte durch i.p. Applikation von *rrIL-6* (45µg/kg) eine Fieberantwort in Ratten (Abbildung 27) induziert werden. Ein direkter Vergleich der Fieberantworten nach i.p. Gabe von LPS (100µg/kg) bzw. *rrIL-6* (Abbildung 31) zeigte, daß IL-6 an der Fieberentstehung nach i.p. Gabe von LPS zwar beteiligt ist, aber nicht allein dafür verantwortlich sein kann. Denn die i.p. Applikation der relativ hohen Dosis von *rrIL-6* fiel im Vergleich zu der LPS-induzierten Fieberantwort deutlich schwächer aus (Abbildung 31). Auf Grund dieser Feststellung wird vermutet, daß zirkulierendes IL-6 einen oder mehrere bislang noch nicht bekannte Kofaktoren benötigt, um eine stärkere Fieberantwort zu entwickeln (Cartmell et al. 2000). Dabei könnte es sich um TNF- α und IL-1 β handeln (Neta et al. 1992), deren Synthese und Freisetzung durch LPS induziert wird und die wiederum die Fähigkeit besitzen, die Synthese von IL-6 zu induzieren. In diesem Zusammenhang könnte auch der lösliche IL-6R (sIL-6R, Kapitel 1.6.3.3) von Bedeutung sein. Durch diesen besitzt IL-6 theoretisch die Möglichkeit, selbst an Zellen, die keine IL-6R auf ihrer Oberfläche besitzen, seine Wirkung zu entfalten oder die Wirkung IL-6R-tragender Zellen zu verstärken. Schöbitz et al. (1995) konnten zeigen, daß die i.c.v. Applikation von sIL-6R 60min vor i.c.v. Applikation von *hrIL-6* die zentralen Effekte von IL-6 wie Fieber und Anorexie verstärken konnte. Als weitere Kofaktoren kämen auch die Prostaglandine (PG) in Frage, deren Synthese durch IL-6 induziert wird und die für die weitere Vermittlung der IL-6-Signale verantwortlich sind (Katsuura et al. 1989, Zeisberger & Merker 1992). Auch kann bei der Fieberentstehung die Beteiligung der noch nicht näher definierten Transportsysteme, die einen aktiven Transport von IL-6 in das Gehirn vermitteln (Blatteis & Sehic 1997), nicht ausgeschlossen werden.

Die Beteiligung der zirkumventrikulären Organe an der Fieberentstehung nach intraperitonealer Applikation von LPS oder rrIL-6

Wenn zirkulierendes IL-6 an der LPS-induzierten Fieberentstehung beteiligt sein sollte, stellt sich die Frage, wie diese pyrogene Nachricht zu den thermoregulatorischen Zentren im Gehirn gelangt, um eine Fieberantwort zu induzieren. Eine gängige Hypothese der fiebervermittelnden Wege, an denen das ZNS beteiligt ist, involviert die CVOs. Diese CVOs können auf Grund ihrer fehlenden BHS als mögliche Zielstrukturen für zirkulierende Pyrogene angesehen werden (Blatteis 1992, Scammel et al. 1996). Im

perivaskulären Spalt der CVOs interagieren die Zytokine mit Rezeptoren verschiedener Zelltypen, um in ihnen die Produktion und Freisetzung von Prostaglandinen, wie z.B. Prostaglandin E₂ (PGE₂) zu induzieren (Stitt 1992, Zeisberger 2000). Diese kleinen Moleküle können anschließend in thermosensitive Regionen diffundieren und zur Induktion einer Fieberantwort führen (Abbildung 8, Kapitel 1.7). Zu den kritischen pyrogenen Zonen im Gehirn gehören die Area praeoptica medialis des rostralen Hypothalamus sowie die sensorischen CVOs, die initial durch Läsionen und chirurgische Durchtrennung nervaler Strukturen entdeckt wurden (Blatteis et al. 1983 & 1987, Hashimoto et al. 1994, Lee et al. 1998, Takahashi et al. 1997). Bei Meerschweinchen und Schafen konnte durch Läsion des anteroventralen 3. Ventrikels (AV3V), inklusive des OVLT, die Fieberantwort nach systemischer Pyrogenapplikation unterdrückt werden (Blatteis et al. 1983 & 1987, Morimoto et al. 1988, Blatteis 1990, Hunter et al. 1994). Eine reduzierte Fieberantwort war auch nach intravenöser Applikation von IL-1 β und TNF- α in Kaninchen zu sehen, bei denen die neuronalen Konnektivitäten zwischen der anteroventralen Region des dritten Ventrikels (AV3V) und dem vorderen Hypothalamus durchtrennt wurden (Hashimoto et al. 1994). Versuche an Gehirnpräparaten des OVLT zeigten, daß sich durch Zytokinstimulation mit IFN- γ und TNF- α die elektrische Aktivität von Neuronen des OVLT veränderte (Shibata & Blatteis 1991). Auch konnte eine Veränderung der elektrischen Aktivität einzelner OVLT-Neurone nach systemischer (i.v. und i.a.) Applikation von IL-1 β sowie nach antidromer Aktivierung durch Elektrostimulation thermosensitiver Regionen beobachtet werden (Ota et al. 1997). Elektrolytische Läsionen des SFO (Takahashi 1997) oder Mikroinjektionen eines IL-1R-Antagonisten in diese Struktur (Cartmell et al. 1999) führten ebenfalls zu einer reduzierten Fieberantwort. Durch *“in situ Hybridisierung“* wurde die konstitutive Expression der IL-6R-mRNA im Rattengehirn untersucht. Dabei wurden starke Signale in Neuronen der Area praeoptica medialis (Schöbitz et al. 1993) und geringe Signale in den sensorischen CVOs, wie der AP, dem OVLT und SFO entdeckt (Vallières & Rivest 1997). Damit einher ging die Beobachtung, daß die Expression der IL-6R-mRNA unter LPS-Behandlung nach 180min von einer niedrigen auf eine hohe Konzentration im OVLT und auf eine mittlere Konzentration im SFO anstieg, wobei in der AP keine Veränderungen zu sehen waren (Vallières & Rivest 1997). IL-6R konnten innerhalb des OVLT und SFO nachgewiesen werden, wobei ihre Expression in beiden CVOs durch Applikation von LPS oder *rrIL-6* gesteigert wurde (Vallières & Rivest 1997).

Alles in allem liegt deshalb die Vermutung nahe, daß die sensorischen CVOs insbesondere das OVLT und das SFO Zielstrukturen für LPS-induziertes zirkulierendes IL-6 darstellen. Hinzu kommt die unmittelbare Nähe des OVLT zu den rostralen Anteilen der ventromedialen Region der Area praeoptica, die diese beiden hypothalamischen Gebiete zu einer attraktiven pyrogenen Zone macht, die eine LPS-induzierte Fieberantwort initiieren oder mediiieren, wobei IL-6 als Pyrogen-wirkender, endogener Mediator zwischengeschaltet sein könnte.

Zeitabhängige nukleäre STAT3-Translokation nach intraperitonealer Applikation von LPS bzw. rrIL-6 und molekulare Aspekte der STAT3-induzierten genomischen Aktivierung während der rrIL-6- oder LPS-induzierten Fieberantwort

Der Transkriptionsfaktor STAT3 wird durch Interaktion von IL-6 mit seinem Rezeptor aktiviert. In der danach ablaufenden Signalkaskade kommt es letztendlich zur Anlagerung von STAT3 an die Promotorregionen IL-6-spezifischer Zielgene und nachfolgend zu deren Transkription (Takeda & Akira 2000). In einer Studie von Kongsman et al. (2000) wurde STAT3 nach LPS-Applikation immunhistochemisch nachgewiesen und postuliert, daß die Signale durch IL-6 induziert worden sind. Aus diesem Grund wurde STAT3 die Funktion als molekularer und neuroanatomischer Marker der direkten IL-6R-Aktivierung mit nachfolgender genomischer Aktivierung zugewiesen. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie der STAT3-Antikörpers zur Detektion einer STAT3-induzierten genomischen Aktivierung während einer LPS- bzw. rrIL-6-induzierten Fieberantwort benutzt. Bei der Auswertung funktional aktiver und zentraler IL-6-Zielstrukturen wurde eine zeitabhängige nukleäre STAT3-Translokation vornehmlich in den CVOs OVLT und SFO beobachtet. Dies traf sowohl für rrIL-6-behandelte Tiere 60min nach Stimulation (Abbildung 25) als auch für LPS-stimulierte Tiere 120min nach Applikation zu (Abbildung 29).

Auf der Basis der initialen Erscheinung der nukleären STAT3-Translokation könnte man annehmen, daß keine offensichtliche Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der nukleären STAT3-Translokation und der Pyrogen-induzierten Fieberantwort existiert. Allerdings muß in Anlehnung an die vorherrschende Hypothese, wie eine Fieberantwort im Gehirn ausgelöst wird, die Zytokin-induzierte genomische Aktivierung der Prostaglandinsynthese und die Bedeutung der Cyclooxygenase (COX) in der

Fiebervermittlung einbezogen werden (Scammell et al. 1996, Cao et al. 1997a & 1997b, Matsumura et al. 1998, Roth & de Souza 2001). Das wäre exakt der Punkt bei dem STAT3 seiner Rolle als Transkriptionsfaktor gerecht werden könnte. Die pyrogenen Effekte von LPS oder IL-6 – zentral oder peripher appliziert – können durch COX-Inhibitoren wie Indomethacin und Ibuprofen blockiert werden (Navarra et al. 1991, Yasin et al. 1994). Die COX, die unter anderem für die Synthese der Prostaglandine, wie z.B. PGE₂, zuständig ist, besitzt somit ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Fieberentwicklung. Dabei handelt es sich in erster Linie um die induzierbare COX2 und nicht um die konstitutiv exprimierte COX1. Studien dazu ergaben, daß nach Gabe von LPS oder Zytokinen die COX-2-Synthese aktiviert werden kann (Herschman 1996), und daß COX-2-spezifische Inhibitoren in der Lage sind eine Fieberantwort zu unterdrücken (Futaki et al. 1993, Cao et al. 1997a). Des Weiteren konnte in COX-2-defizienten Mäusen im Vergleich zu COX-1-defizienten Mäusen keine Fieberantwort induziert werden (Li et al. 1999). Bei der zellulären Charakterisierung der COX-2-Vorkommen konnte COX-2-mRNA in Blutgefäßen des Gehirns (Cao et al. 1995) und in Endothelzellen nach systemischer LPS- (Matsumura et al. 1998) und IL-1 β - (Cao et al. 1996) sowie zentraler LPS- (Cao et al. 1999) oder IL-1 β - (Cao et al. 1997b) Injektion nachgewiesen werden. PGE₂ vermittelt also die Effekte verschiedener Pyrogene im ZNS und im Blut (Blatteis 1988, Rotondo et al. 1988, Milton 1989) und ist dadurch bei der Fiebermediation von wichtiger Bedeutung (Matsumura et al. 1998).

Zentrale Mikroinjektionen des Arachidonsäurederivats PGE₁ (Milton & Wendtland 1970) zeigten, daß es sich bei den Orten, bei denen PGE₂ Fieber erzeugen konnte, um den vorderen Anteil der präoptischen Region und das OVLT handelte (Stitt 1985, Scammell et al. 1996). Rezeptorstudien wiesen eine hohe Dichte von PGE₂ Bindungsstellen in der vorderen Wand des dritten Ventrikels (AV3V) auf, vor allem in dem an das OVLT angrenzenden Bereich (Matsumura et al. 1990). Dabei scheint einer der vier Rezeptorsubtypen des PGE₂, EP3, von besonderer Bedeutung zu sein (Matsumura et al. 1998). Versuche mit “knock-out“- (K.O.-) Mäusen, die keinen EP3-Rezeptor besaßen, unterstützen diese Theorie, denn diese Mäuse entwickelten nach zentraler Gabe von PGE₂ keine Fieberantwort (Ushikubi et al. 1998). Auf zellulärer Ebene ist eine PGE₂-Immunoreaktivität in Blutgefäßen des Gehirns in Tieren nachweisbar, die mit LPS behandelt wurden (Van Dam et al. 1993). In diesem Zusammenhang wurde die Sequenz für das Gen der induzierbaren COX2 in Ratten (*Rattus norvegicus*) analysiert. Dabei wurde in der Promotorregion (66CTGGRAA74)

des COX2-Gens eine STAT3-Konsensussequenz entdeckt (Stephanou et al. 1998). Damit würde die Zeitlücke zwischen der Pyrogen-induzierten nukleären STAT3-Translokation (60min nach *rrIL-6*- und 120min nach LPS-Stimulation) und dem Maximum der Fieberantwort (nach ca. 200min bei *rrIL-6*- und nach 300min bei LPS-Applikation) genau den Zeitraum umfassen, der nötig wäre, die Transkription des COX2-Gens mit der nachfolgenden PGE₂-Synthese zu induzieren. Damit liegt jedoch noch kein endgültiger Beweis für die ausschließliche Rolle von IL-6 als endogenem Mediator bei LPS-induziertem Fieber vor, der die nukleäre STAT3-Translokation in den beiden CVOs OVLT und SFO induziert. Die große Ähnlichkeit der Verteilung der nukleären STAT3-Translokation im OVLT und SFO (Abbildung 25 und 29) nach Gabe von LPS oder *rrIL-6* spricht jedoch dafür, daß die LPS-induzierte nukleäre STAT3-Translokation durch IL-6 vermittelt wird. Ein Maximum der STAT3-markierten Zellkerne lag 60min nach *rrIL-6*-Stimulation vor, wobei LPS weitere 60min brauchte, bis sein Optimum der nukleär translozierten STAT3-Immunreaktivität erreicht war. Diese zeitliche Differenz korreliert mit der Vorstellung der LPS-induzierten IL-6-Synthese (LeMay et al. 1990) und fördert die Sichtweise, daß die nukleäre STAT3-Translokation im OVLT und SFO nach LPS-Stimulation durch IL-6 vermittelt wird. Während 60min nach i.p. LPS-Applikation schon erhöhte IL-6-Konzentrationen im Plasma auftraten (Abbildung 24), wurde das Maximum der nukleären STAT3-Translokation erst nach 120min erreicht. Diese Zeitdifferenz von 60min scheint LPS zu benötigen, um möglicherweise über weitere Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , die IL-6-Synthese zu veranlassen. Bereits 30min nach i.p. *rrIL-6*-Applikation war ein Anstieg der IL-6-Konzentration im Blutplasma vorhanden (Abbildung 28). Ein Maximum der nukleären STAT3-Translokation trat jedoch erst 60min nach Stimulation auf. Die ersten 30min könnten den Zeitraum umfassen, den *rrIL-6* benötigt, um aus der Abdominalhöhle in das Blutkreislaufsystem überzutreten. Die weiteren 30min würden dann benötigt, damit zirkulierendes IL-6 das Gehirn erreicht, um seine Wirkung zu vermitteln. Die maximale nukleäre STAT3-Translokation, die 120min nach LPS und 60min nach *rrIL-6*-Applikation auftrat (Abbildung 33), spiegelte sich in einem entsprechenden Maximum der IL-6-Konzentration im Plasma wieder (Abbildung 24, 28 und 32). Damit könnte behauptet werden, daß eine gewisse Grundkonzentration von bioaktivem IL-6 notwendig ist, um eine nukleäre STAT3-Translokation in den CVOs nach Pyrogenstimulation auszulösen. Dafür spricht die Korrelation der Anzahl nukleärer STAT3-Signale und der Höhe der IL-6-Konzentration im Plasma (Abbildung

34). Je höher die im Plasma vorhandene IL-6-Konzentration war, desto höher war auch die Anzahl nukleärer STAT3-Signale im OVLT und SFO (und umgekehrt) 120min nach LPS- bzw. 60min nach *rrIL-6*- Applikation. Selbst zu den Zeitpunkten der maximalen nukleären STAT3-Translokation, die mit einer maximalen IL-6-Konzentration im Plasma einherging, waren individuelle Unterschiede vorhanden, wobei Tiere mit einer geringeren IL-6-Konzentration auch weniger nukleäre STAT3-Signale besaßen. Eine weitere Bestätigung ist, daß 120min nach *rrIL-6*-Stimulation die nukleäre STAT3-Translokation wieder verschwunden war und mit einer abgesunkenen IL-6-Plasmakonzentration einherging. Somit gibt es nicht nur eine individuelle sondern auch eine zeitliche Abhängigkeit der nukleären STAT3-Translokation von der IL-6-Konzentrationsmenge im Plasma. Anders verhält es sich jedoch bei der LPS-induzierten nukleären STAT3-Translokation. Diese ist zwar 180min nach Stimulation ebenfalls größtenteils verschwunden, doch bleibt die entsprechende Plasma-IL-6-Konzentration zu diesem Zeitpunkt maximal erhöht (Abbildung 24).

Dies könnte anhand spezieller endogener IL-6-Hemmungsmechanismen erklärbar sein. Zu diesen Hemmungsmechanismen gehört unter anderem ein Netzwerk intrazellulärer Moleküle, das ein entscheidendes Gegengewicht zur Zytokinwirkung bildet, indem es die Effekte der pleiotropen Zytokine wie IL-6 schwächt oder vollständig hemmt. Diese negative Rückkopplung (negatives “feedback“) wird durch die Zytokine selbst erzeugt und spielt eine zentrale Rolle in der “*neuro-immun-endokrinen*“ Homöostase. Diese Proteine, die die Signaltransduktion der Zytokine hemmen, besitzen auf Grund ihrer unterschiedlichen Entdeckungen auch unterschiedliche Synonyme. Sie werden als “Unterdrücker der Zytokinwirkung“ bzw. “*suppressors of cytokine signalling*“ (SOCS) (Starr et al. 1997) bezeichnet, weil sie die Liganden- (IL-6-) induzierte Tyrosinphosphorylierung der STAT-Moleküle (STAT3) und der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren (gp130) hemmen. Zwei weitere Synonyme sind JAK-bindende Proteine (JAB) (Endo et al. 1997) und STAT-induzierte STAT-Inhibitoren (SSI) (Naka et al. 1997). Diese SOCS-Proteinfamilie (Hilton et al. 1998) umfaßt acht Mitglieder. Dazu gehören unter anderem SOCS1 (Endo et al. 1997, Starr et al. 1997, Ohya et al. 1997) und SOCS3 (Starr et al. 1997), die im Fall der IL-6-Signalkaskade die wichtigsten Inhibitoren darstellen. Sie gelten als die potentesten und häufigsten Suppressoren der Zytokinvermittlung mit einer stark hemmenden Wirkung auf den JAK-STAT-Weg verschiedener gp130-Zytokine (Endo et al. 1997, Starr et al. 1997, Song et al. 1998, Nicholson et al. 1999, Duval et al. 2000, Hamanaka et al. 2001).

Durch Anlagerung von IL-6 an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges. Die in diesem Zusammenhang stattfindenden Phosphorylierungen der gp130-Rezeptoruntereinheiten, der Janus-Kinase-1 und nachfolgend des Transkriptionsfaktors STAT3 werden durch Anwesenheit der SOCS reduziert (Abbildung 40).

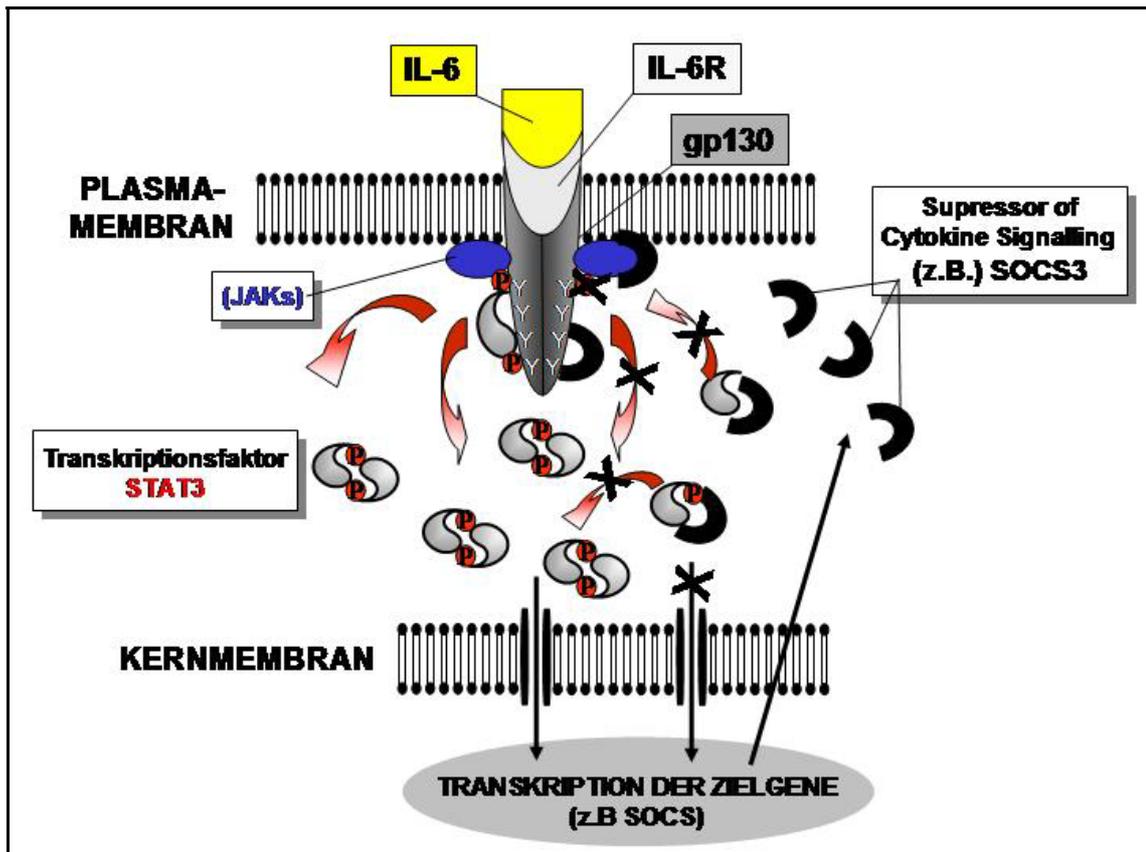


Abbildung 40: Schematische Darstellung der JAK-STAT3-Signaltransduktion nach Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor (Beschreibung siehe Text). Die Anlagerung der STAT3-Homodimere an die Promotorregion der IL-6-Zielgene führt unter anderem zur Transkription der SOCS (SOCS3), die ihrerseits eine hemmende Wirkung auf verschiedene Reaktionsschritte zu Beginn der Signaltransduktion ausüben (Beschreibung im Text). Dadurch besitzt z.B. SOCS3 einen regulierenden Einfluß auf die Wirkung von IL-6.

Es wird vermutet, daß die SOCS Proteine relativ am Anfang des JAK-STAT-Weges angreifen (Endo et al. 1997, Naka et al. 1997, Starr et al. 1997), wobei SOCS-1 und SOCS-3 ähnliche Effekte über ähnliche Mechanismen vermitteln. Grundlage ihrer Funktion ihre gemeinsame Proteinstruktur, die durch eine variable

Kapitel 4: Diskussion

N-terminale Region, eine zentrale SH2-Domäne und eine C-terminale SOCS-Box gekennzeichnet ist (Hilton et al. 1998, Narazaki et al. 1998). Sie können direkt die intrinsische Kinaseaktivität inhibieren, indem sie mit ihrer SH2-Domäne die katalytische Domäne der Janus-Kinase besetzen (Endo et al. 1997, Yawata et al. 1999). SOCS3 agiert auch indirekt, indem es mit seiner SH2-Domäne, die der SH2-Domäne von STAT3 ähnelt, an die tyrosinphosphorylierten STAT3-Andockstellen (Tyrosin 759, Terstegen et al. 2000) der intrazellulären Domäne der gp130-Rezeptoruntereinheit (Nicholson et al. 2000) bindet und / oder mit aktivierten und nicht aktivierten STAT Molekülen reagiert (Hansen et al. 1999). Die Expression der SOCS-Moleküle wird durch den JAK-STAT-Weg induziert. Die im Verlauf der Kaskade entstehenden STAT-Dimere lagern sich dem SOCS-kodierenden DNA-Abschnitt an und aktivieren die Genexpression der SOCS-Moleküle. Die Expression von SOCS-1 (Naka et al. 1997) und SOCS-3 wird durch STAT3-Homodimere (Auernhammer & Melmed 2001), bzw. durch IL-6 vermittelt (Lebel et al. 2000). Damit sind SOCS-1 und SOCS-3 verantwortlich für einen negativen Feedback-Mechanismus des JAK-STAT3-Signalweges, der durch STAT3 nach IL-6-Stimulation induziert wird. Diese unterschiedlichen Möglichkeiten der SOCS Proteine in den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg einzugreifen, könnte in einer unterschiedlich starken Hemmung des IL-6-vermittelten Signalweges resultieren.

Neben den SOCS gibt es weitere Proteine, die durch IL-6 induziert werden und zur Regulation der IL-6- bzw. STAT3-vermittelten Fieberantwort beitragen. Die "T-Zell Tyrosin Phosphatase" (TC-PTP) deaktiviert z.B. phosphoryliertes bzw. aktiviertes STAT3 durch Dephosphorylierung, so daß die weitere JAK-STAT3-Signalkaskade unterbrochen wird (Yamamoto et al. 2002). Auch der "Protein Inhibitor des aktivierten STAT3" (PIAS3) besitzt eine hemmende Wirkung auf STAT3. PIAS3 verhindert die Bindung von STAT3 an seine Ziel-DNA-Sequenz, indem es die Bindungsaktivität von STAT3 blockiert, so daß keine Anlagerung an den Promotor erfolgen kann, und somit die nachfolgende Genexpression unterdrückt wird (Chung et al. 1997). Diese unterschiedlichen Hemmungsmechanismen tragen zur Feinregulierung der IL-6-induzierten und damit der Wirkungsentfaltung von IL-6-induzierten Zellantworten bei. Diese negativen Rückkopplungsmechanismen könnten den Umstand des zeitabhängigen Auftretens der maximalen nukleären STAT3-Translokation ausschließlich 60min nach *rr*IL-6- bzw. 120min nach LPS-Applikation in der vorliegenden Arbeit erklären. Da die IL-6-Konzentration im Plasma 120min nach *rr*IL-6 Stimulation wieder abgesunken war,

könnte die nach 120min so gut wie nicht mehr vorhandene nukleäre STAT3-Translokation auch auf diesen Umstand zurückzuführen sein. Obwohl die nukleäre STAT3-Translokation 180min nach LPS-Applikation zwar verschwunden war, waren noch erhöhte Plasma-IL-6-Konzentrationen nach 180min meßbar (Abbildung 24), so daß das Verschwinden der nukleären STAT3-Translokation nicht durch den Umstand einer gesunkenen Plasma-IL-6-Konzentration verursacht wird. In diesem Fall wäre die STAT3-induzierte und SOCS-, TC-PTP- oder PIAS3-vermittelte Hemmung des JAK-STAT3-Signaltransduktionsweges nach IL-6-Wirkung die Erklärung für eine nicht mehr vorhandene nukleäre STAT3-Translokation 180min nach LPS Stimulation.

Insgesamt kann behauptet werden, daß eine Aktivierung der nukleären STAT3-Translokation innerhalb von 60min durch IL-6 stattfindet (*rrIL-6*), wobei nach LPS Applikation eine Verzögerung von 60min auftritt, in der wahrscheinlich die Synthese einer ausreichenden Menge an IL-6 stattfindet (60 + 60min). Innerhalb weiterer 60min kommt es durch STAT3 zur Transkription der JAK-STAT3-inhibierenden Proteine und dadurch zur Hemmung JAK-STAT3-Signaltransduktion, so daß 120min nach *rrIL-6*- und 180min nach LPS-Applikation eine nukleäre STAT3-Translokation nicht mehr beobachtet werden kann. Auch die Internalisierung der IL-6R führt zur Regulation der IL-6-Aktivierung (Zolnhöfer et al. 1992), weil IL-6 seine Wirkung nicht vermitteln kann und dadurch eine Überexpression IL-6-induzierter Immunantworten verhindert werden kann.

Nachweis des zellulären Ursprungs der nukleären STAT3-Translokation nach intraperitonealer Applikation von LPS und rrIL-6

Wie die vorliegende Arbeit berichten auch andere Quellen (Konsman et al. 2000, Gautron et al. 2002), daß die systemische Applikation von bakteriellem LPS eine zeit- und dosisabhängige nukleäre STAT3-Translokation in verschiedenen Gehirnarealen induziert, wobei es sich vornehmlich um Zellen der CVOs handelt. Mögliche endogene Mediatoren der LPS-induzierten STAT3-Aktivierung sind Zytokine, die die sogenannte gp130-Rezeptorfamilie stimulieren können (Takeda & Akira 2000), wie z.B. IL-6. Als ein weiteres hormonähnliches Zytokin, dessen Synthese durch LPS induziert wird, kann Leptin durch Bindung an seinen Rezeptor eine nukleäre Translokation des

phosphorylierten STAT3 induzieren (Hübschle et al. 2001). Vorausgesetzt, daß zirkulierendes IL-6 das Signal ist, welches die nukleäre STAT3-Translokation in Zellen des OVLT und SFO induziert (siehe vorn), stellt sich die Frage welcher Zelltyp durch zirkulierendes IL-6 aktiviert wird und die Frage nach der funktionalen Relevanz der genomischen Aktivierung der beiden sensorischen CVOs durch dieses Zytokin. Als weiteres Ziel dieser Studie galt es deshalb, den zellulären Ursprung der IL-6-induzierten nukleären STAT3-Translokation im OVLT und SFO 60min nach *rr*IL-6 Applikation (45µg/kg) bzw. 120min nach LPS Stimulation (100µg/kg) zu identifizieren. In der Studie von Gautron et al. (2002) wurde LPS in einer Dosis von 250µg/kg eingesetzt, worauf eine nukleäre STAT3-Translokation nicht nur in den sensorischen CVOs und der Hypophyse, sondern auch zu einem gewissen Teil im Hypothalamus, der Area praeoptica, dem Cortex sowie dem Hippocampus zu sehen war. Basierend auf Doppelmarkierungsstudien mit dem STAT3-Antikörper und dem astroglialen Marker GFAP, behaupten die Autoren, daß fast alle STAT3 positiven Zellen des Gehirnparenchyms von einer GFAP Immunreaktivität umgeben sind (Gautron et al. 2002). Dies wurde als eine mehr oder weniger exklusive Aktivierung der Astrozyten durch den gegebenen inflammatorischen Stimulus gewertet.

Prinzipiell können in der vorliegenden Studie diese Ergebnisse insofern bestätigt werden, als daß ein gewisser Anteil (ca. 40%) STAT3-positiver Zellen nach LPS- (Abbildung 36D/H) bzw. *rr*IL-6- (Abbildung 36C/G) Stimulation in den CVOs OVLT (Abbildung 36C/D) und SFO (Abbildung 36G/H) mit dem Astrozytenmarker GFAP markiert war. Zusätzlich konnten wir eine annähernd identische Verteilung von GFAP-kolokalisierten nukleären STAT3-Signalen nach LPS- bzw. *rr*IL-6-Stimulation sehen (Abbildung 36A/B/E/F). Allerdings war ein großer Anteil (ca. 60%) der nukleären STAT3-Signale nach Stimulation mit LPS oder *rr*IL-6 in beiden sensorischen CVOs nicht mit GFAP-positiven Zellen kolokalisiert. Deshalb besteht die Möglichkeit, daß auch andere Zelltypen durch zirkulierendes IL-6 aktiviert werden können. Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP2), ein neuronaler Marker, war bei Ratten nach fokaler zerebraler Ischämie mit phosphoryliertem nukleären STAT3 kolokalisiert (Suzuki et al. 2001). Diese Beobachtung zeigte deutlich, daß eine Aktivierung von STAT3 durch ischämisch induzierte Zytokine der IL-6-Familie in neuronalen Gehirnzellen auftreten kann. Der Einsatz von c-Fos als neuronaler Aktivitätsmarker konnte den Beweis einer Kolokalisation von STAT3 mit c-Fos-markierten Neuronen in der vorliegenden Studie nicht liefern. Aus diesem Grund wurden in der Studie weitere neuronale Marker wie

NeuN, einem neuronalen (Zellkern-) Marker, eingesetzt oder eine NADPH-Diaphorasefärbung angeschlossen, die nitrorege Neurone detektiert, um zu klären, ob die nukleären STAT3-Signale im OVLT und SFO in Neuronen lokalisiert sind. Eine nukleäre STAT3-Translokation wurde allerdings weder in NeuN- noch NADPH-Diaphorase-positiven Zellen des OVLT und SFO beobachtet. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Doppelmarkierung von STAT3 mit endothelialen oder mikroglialen Zellmarkern. Einige endotheliale Zellen, die eine nukleäre STAT3-Translokation aufwiesen, befanden sich jedoch außerhalb der untersuchten CVOs. Eine Bestimmung des zellulären Ursprungs der STAT3 Signale im OVLT und SFO, die nicht mit GFAP kolokalisiert waren, war deshalb bislang nicht möglich. Die Daten der vorliegenden Studie und die Daten, die von Gautron et al. (2002) präsentiert wurden, unterstützen die Sichtweise, daß ein nicht unerheblicher Teil der IL-6-stimulierten Zellen von OVLT und SFO astroglialen Ursprungs sind. Die Rolle von STAT3 als Transkriptionsfaktor läßt vermuten, daß eine modifizierte Genexpression in diesen Astrozyten nach nukleärer STAT3-Translokation nach LPS- oder *rr*IL-6-Stimulation auftritt. Zum jetzigen Zeitpunkt kann nur spekuliert werden, ob IL-6-aktivierte Astrozyten und Zellen unbekanntem Ursprungs, Gene von beispielsweise Zytokinen, Zytokinrezeptoren, Cyclooxygenase oder Prostaglandinrezeptoren exprimieren, die wichtig für die Aufrechterhaltung von Fieber und sowie anderer Krankheitssymptome sind.

Bekannt ist allerdings, daß Astrozyten als größte IL-6-Quelle bei pathologischen Erkrankungen gelten (Mucke & Eddleston 1993) und die IL-6-Synthese in diesen Zellen durch TNF- α und / oder IL-1 β sowie LPS induziert werden kann (Gruol & Nelson 1997). Ein synergistischer Effekt auf die IL-6-Expression in Astrozyten konnte bei der Kombination von TNF- α und IL-1 β beobachtet werden (Benveniste et al. 1990). Während IL-6 allein keinen Effekt auf die IL-6-Expression in Astrozyten erzeugte, gelang die Induktion der IL-6-Synthese in Kombination mit dem sIL-6R (Van Wagoner et al. 1999). Ein verstärkender Effekt auf die IL-6-Synthese war ebenfalls zu beobachten, wenn IL-6 und sIL-6R entweder mit TNF- α oder IL-1 β verabreicht wurden, wobei dieser Effekt auch in Abwesenheit von IL-6 vorhanden war, so daß die Beteiligung von TNF- α und IL-1 β an der IL-6-Synthese bestätigt wurde (Van Wagoner et al. 1999, Van Wagoner & Benveniste 1999). Bezüglich der vorliegenden Arbeit könnte man die Hypothese aufstellen, daß LPS über TNF- α und IL-1 β die Induktion der IL-6-Synthese in Astrozyten induziert, wobei IL-6 wiederum die nukleäre STAT3-Translokation in einer autokrinen oder parakrinen Weise in Astrozyten aktiviert.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit, die direkte Aktivierung von STAT3 nach *rrIL-6*-Applikation in Astrozyten nachgewiesen werden, während Van Wagoner et al. (1999) eine direkte IL-6-Expression nach IL-6-Applikation in Astrozyten nicht nachweisen konnten. Dies könnte einerseits daran liegen, daß Van Wagoner et al. (1999) keine "in vivo" Versuche durchgeführt bzw. die IL-6-Transkription und nicht die STAT3-Aktivierung nachgewiesen haben. Bekannt ist auch, daß die Gabe von *rrIL-6* die Induktion von IL-6R unter anderem in den CVOs bei noch nicht bekannten Zelltypen induziert (Vallières & Rivest 1997). Die Kombination aus diesen Resultaten läßt eine Induktion der IL-6R-Synthese bei Astrozyten nach *rrIL-6*-Applikation vermuten, die im weiteren Schritt mit IL-6 interagieren und die JAK-STAT3-Kaskade in Gang setzen. Es ist nicht auszuschließen, daß es dadurch auch zur Aktivierung von IL-6-Transkripten kommt und dadurch wieder andere Zellen in einem auto- oder parakrinen Modus aktiviert werden. Da Astrozyten auf Grund ihrer Fähigkeit zur Produktion inflammatorischer Zytokine auch als Vermittler von Entzündungs- und Immunreaktionen im ZNS gelten (Aschner 1998), könnte die LPS- und *rrIL-6*-induzierte nukleäre STAT3 Translokation, ebenfalls als Vermittler einer LPS- bzw. *rrIL-6*-vermittelten Immunantwort gelten. Somit wären die Astrozyten sowohl Produzenten als auch Vermittler einer IL-6-induzierten Fieberantwort.

Induktion einer Fieberantwort nach intrazerebroventrikulärer Applikation von rrIL-6

Die IL-6 Dosis, die in den vorliegenden Versuchen verwendet wurde, richtete sich nach vorherigen i.c.v. Studien in Sprague-Dawley Ratten (Vallières et al. 1997, Lenczowski et al. 1999). In der vorliegenden Studie wurden Wistarratten verwendet, bei denen eine maximale Fieberantwort durch i.c.v. Applikation von 200ng *rrIL-6* induziert werden konnte. Wie schon angesprochen gilt die Area praeoptica des rostralen Hypothalamus inklusive des OVLT als wichtige hypothalamische Zielstruktur in der Fiebermediation, was die Bedeutung der CVOs in der Vermittlung und Induktion einer zentralen Fieberantwort unterstreicht. Die unmittelbare Nähe der rostralen Anteile des VMPO zum OVLT macht den VMPO zu einer interessanten Struktur, die Fieberantworten initiieren und vermitteln kann. In der Tat zeigten neuroanatomische Fos-Studien den VMPO als eine kritische pyrogene Zone, die in die Initiierung einer Fieberantwort

involviert ist (Sagar et al. 1995, Elmquist et al. 1996, Scammell et al. 1996, Niimi et al. 1997, Vallières et al. 1997).

In der aktuellen Studie wurde die STAT3-Immunhistochemie nach i.c.v. *rrIL-6* Applikation angewendet, um eine direkte IL-6-Wirkung und, im Gegensatz zur Fos-Analyse, sowohl aktivierte als auch inhibierte Neurone nachzuweisen. Studien, in denen eine basale Expression von IL-6R-mRNA im Rattenhirn durch "in-situ-Hybridisierung" nachgewiesen werden konnte, zeigten auch starke Signale in Neuronen der Area praeoptica und teilweise im ventromedialen Bereich in direkter Nachbarschaft zum dritten Ventrikel (Schöbitz et al. 1993). In der vorliegenden Studie konnte bei der Bestimmung funktional aktiver IL-6-responsiver Strukturen im Gehirn durch die STAT3-Immunhistochemie, eine IL-6-induzierte nukleäre STAT3-Translokation 15-30min nach i.c.v. Applikation in verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen werden, wobei intensive STAT3-Signale in Neuronen der anteroventralen Area praeoptica entdeckt wurden. Die Verteilung der vorhandenen nukleären STAT3-Markierung in der Area praeoptica ähnelte dabei der in der Fos-Analyse detektierten Verteilung nach systemischer LPS-Applikation (Elmquist et al. 1996). Dennoch gab es einen Zeitunterschied bezüglich der Induktion der nukleären Translokation der zwei Transkriptionsfaktoren. Während die nukleären STAT3-Signale 15-30min nach zentraler IL-6-Applikation nachgewiesen werden konnten, erschien das Maximum des nukleären Fos-Proteins erst 90min nach Stimulation. Dies könnte darauf hinweisen, daß der Transkriptionsfaktor STAT3 die Genexpression des anderen Transkriptionsfaktors c-Fos in Neuronen des VMPO induziert. Auf Grund der Ähnlichkeit der STAT3- und c-Fos-markierten Gebiete, wird eine neuronale Aktivierung zur zentralen Mediation der Fieberantworten im VMPO nach i.c.v. Applikation von *rrIL-6* angenommen. Ein gemeinsames Vorkommen von STAT3 und c-Fos in der selben Zelle, kann insofern bestätigt werden, als daß Schuringa et al. (2001) eine Kooperation von c-Fos und STAT3 nach IL-6-Applikation bei der Aktivierung von IL-6-Zielgenen beobachten konnten. Auch wenn c-Fos als Aktivitätsmarker von Neuronen gilt und eine Kolokalisation von STAT3 mit c-Fos angenommen wird, sollte eine eventuelle Kolokalisation und damit der mögliche neuronale Ursprung durch eine immunhistochemische Mehrfachmarkierung direkt nachgewiesen werden.

Bezüglich anderer thermoregulatorischer Schlüsselstrukturen im Hypothalamus, ist der Nucleus paraventricularis (PVN) eines der wichtigsten Kerngebiete, das in die

Integration der efferenten Kontrolle thermoregulatorischer Funktionen involviert ist. Er besitzt darüber hinaus einen autonomen dorsalen Subnucleus parvocellularis, der direkte Projektionen aus der anteroventralen Area praeoptica erhält (Elmqvist & Saper 1996, Zhang et al. 2000). Interessanterweise induziert die Behandlung mit endogenem (IL-1 β) und exogenem (LPS) Pyrogen eine massive Fos-Antwort innerhalb der autonomen und endokrinen Komponente des PVN (Sagar et al. 1995, Elmqvist et al. 1996, Callahan & Piekut 1997, Zhang et al. 2000). Im Gegensatz dazu führt weder eine systemische noch zentrale IL-6-Behandlung zu einer signifikanten Fos-Aktivierung im PVN (Callahan & Piekut 1997, Vallières et al. 1997). Dies konnte ebenfalls in der vorliegenden Studie für die STAT3-Immunreaktivität nach i.c.v. Applikation von *rr*IL-6 im PVN der Ratte bestätigt werden. Einhergehend mit diesen Beobachtungen wurde im PVN keine basale Expression der IL-6R-mRNA gesehen (Schöbitz et al. 1993). So kann, im Gegensatz zum PVN, die anteroventrale Area praeoptica als eine bedeutende Zielstruktur von IL-6 angesehen werden. Dennoch ist der Nucleus paraventricularis als bedeutende integrative und regulatorische Einheit des Hypothalamus zu betrachten, in dem die thermoregulatorischen Signale, die auch für die Initiierung und Mediation des IL-6-vermittelten Fiebers zuständig sind, zum autonomen Nervensystem vermittelt werden (Zhang et al. 2000).

Vergleich der intraperitonealen und der intrazerebroventrikulären Applikation von *rr*IL-6

Wie schon erwähnt, ist IL-6 an der Aktivierung der APR und somit an der Auslösung einer Reihe von zentral kontrollierten Krankheitssymptomen beteiligt, zu denen Übelkeit, Anorexie und ein gestörtes Allgemeinbefinden gehören. Diese Krankheitssymptome werden unter anderem auch außerhalb der Präoptischen Region in Gebieten der Medulla oblongata vermittelt. Während die i.p. Applikation von *rr*IL-6 (45 μ g/kg) einen eher moderaten Fieberverlauf (Abbildung 27) verursachte, war in i.c.v. behandelten Tieren dosisabhängig (100ng bzw. 200ng pro Tier) eine vergleichsweise starke Fieberantwort zu beobachten (Abbildung 31). Eine weitere Entdeckung beim Vergleich der unterschiedlichen Art der Applikation war der zeitliche Unterschied bezüglich der nukleären STAT3-Translokation. Während 30min nach i.c.v. Applikation ein Maximum der nukleär translozierten STAT3 Immunreaktivität zu sehen ist, werden

weitere 30min benötigt, um nach i.p. Stimulation ein Maximum zu erzeugen. Diese beiden Beobachtungen könnten auf die unterschiedliche Applikationsart zurückzuführen sein. Die i.c.v. Applikation würde eine höhere Fieberantwort verursachen, weil nach zentraler Gabe eine direktere Wirkung mit einer höheren Konzentration als nach i.p. Applikation an entsprechenden "pyrogenen" Gehirnstrukturen möglich wäre. Auch der Zeitunterschied, bis zum Erreichen einer maximalen nukleären STAT3-Translokation, könnte auf dem Umstand der unterschiedlichen Applikation basieren. Durch die i.c.v. Applikation von *rrIL-6* direkt ins ZNS kann dieses sofort seine Wirkung an den fiebervermittelnden Strukturen entfalten. Im Gegensatz dazu muß *rrIL-6* nach i.p. Applikation erst aus der Abdominalhöhle in das Blutkreislaufsystem übertreten und anschließend durch die Zirkulation zum ZNS transportiert werden, um seine fieberinduzierende Wirkung zu entfalten.

Bezüglich der stärkeren Fieberantwort ist zu sagen, daß sich die gewählte Dosis nach Vorexperimenten in Sprague-Dawley Ratten richtete (Vallières et al. 1997, Lenczowski et al. 1999) und in der vorliegenden Studie als Dosis zur Induktion einer maximalen Fieberantwort verwendet wurde. Bei der Applikation von *rrIL-6* in einer Dosis von 100ng/Tier fiel die Fieberantwort schwächer aus als bei der Dosis von 200ng/Tier, aber war dennoch stärker als nach i.p. Applikation von 45µg/kg *rrIL-6*. Die Erklärung, daß nach i.p. Applikation eine geringere Konzentration von *rrIL-6* das Gehirn erreicht, um seine Wirkung zu entfalten, wird somit sehr wahrscheinlich. Das würde bedeuten, daß die gesamte Konzentration (200ng/Tier) von *IL-6* nach i.c.v. Applikation eine Wirkung auf das Gehirn ausübt, ist nicht bekannt, welche *IL-6*-Konzentration nach systemischer *rrIL-6*-Applikation zum oder ins Gehirn gelangt. Diese könnte niedriger sein und die geringere Fieberantwort erklären. Andererseits ist auch nicht bekannt, welche *IL-6*-Konzentration das Gehirn nach i.p. LPS-Applikation erreicht. Allerdings war eine stärkere Fieberantwort (Abbildung 23) vorhanden als nach i.p. Applikation von *rrIL-6* (Abbildung 27). Daran könnten – wie schon am Anfang angesprochen – weitere LPS-induzierte Fiebermediatoren wie *IL-1β* oder *TNF-α* beteiligt sein, die entweder selbst ihre pyrogene Wirkung vermitteln und / oder die *IL-6*-Synthese induzieren, so daß eine erhöhte *IL-6*-Konzentration nach i.p. LPS-Applikation ins Gehirn gelangen könnte. Die im Plasma nach i.p. Applikation von *rrIL-6* gemessenen *IL-6*-Konzentrationen unterscheiden sich zum Zeitpunkt der jeweiligen maximalen nukleären STAT3-Translokation zwar kaum (60min *rrIL-6*, 120min LPS), allerdings ist im weiteren Verlauf ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen. Während die

Kapitel 4: Diskussion

Plasma-IL-6-Werte nach LPS-Stimulation im Verlauf weiter ansteigen (Abbildung 24) sinken die Plasma-IL-6-Werte nach *rr*IL-6 Stimulation wieder ab (Abbildung 28). Damit könnten beide Theorien, die direkte Wirkung weiterer Zytokine und die IL-6-Synthese durch weitere Zytokine, die verstärkte Fieberantwort nach LPS-Stimulation erklären. Weiterhin konnte ein Unterschied in der Aktivierung der zerebralen Strukturen nach i.c.v. bzw. i.p. Applikation beobachtet werden. In systemisch stimulierten Tieren ist eine signifikante nukleäre STAT3 Translokation nur in den CVOs OVLT und SFO zu beobachten. In diesen CVOs wird eine nukleäre STAT3 Translokation auch nach i.c.v. Applikation gesehen, wobei noch eine große Anzahl weiterer Strukturen STAT3 Signale zeigen (Tabelle 15), wie z.B. der Nucleus ventromedialis hypothalami, der Nucleus supraopticus, die ependymale Auskleidung der Ventrikel und der Nucleus tractus solitarius. Diese Aktivierung weiterer Strukturen nach i.c.v. Applikation kann wiederum auf die unterschiedliche Applikationsart zurückzuführen sein. Durch i.c.v. Applikation gelangt *rr*IL-6 direkt ins Gehirn, nach i.p. Stimulation kommt es aus der Peripherie und muß die BHS überwinden. Das könnte erklären, daß nach i.c.v. Applikation von *rr*IL-6 mehr Strukturen als nach i.p. Applikation aktiviert wurden. Denn nach i.c.v. Gabe verteilt sich die pyrogene Nachricht über das CSF des Lateralventrikels innerhalb kürzester Zeit im gesamten Ventrikelsystem und besitzt damit die Möglichkeit im gesamten ZNS seine Wirkung zu entfalten. Auffällig ist, daß es sich dabei um Strukturen handelt, die sich in Ventrikelnähe befinden (VMPO, NTS, ependymale Auskleidung der Ventrikel), so daß eine Diffusion von IL-6 durch die Ventrikelwand wahrscheinlich ist und mehr Strukturen erreicht werden können und mit einer nukleären STAT3-Translokation antworten als nach i.p. Applikation von LPS. Der sich ebenfalls in Ventrikelnähe befindliche PVN ist davon jedoch ausgenommen. Nach systemischer Applikation erreichen die IL-6-vermittelten Signale das Gehirn über die Blutzirkulation das Gehirn, so daß die CVOs mit ihrem fenestrierten Kapillarendothel für die Vermittlung der zirkulierenden und hochmolekularen pyrogenen "IL-6 Botschaft" von besonderer Bedeutung sind, und dies durch eine nukleäre STAT3-Translokation bestätigen. Weiterhin könnte mit der Aktivierung weiterer Gehirnstrukturen zusätzlich zu den CVOs auch die stärkere Fieberantwort nach i.c.v. Applikation erklärt werden. Wie schon oben angesprochen werden die Krankheitssymptome außerhalb der Präoptischen Region unter anderem im Hirnstamm zentral vermittelt. Dabei besitzt der NTS in der LPS-vermittelten Entstehung von Krankheitssymptomen eine bedeutende Rolle.

Kapitel 4: Diskussion

In den vorliegenden Versuchen konnte eine nukleäre STAT3-Translokation im NTS nach i.c.v. Applikation beobachtet werden. Hübschle et al. (2001) konnten ebenfalls eine nukleäre STAT3-Translokation im NTS beobachten, jedoch nach Stimulation mit Leptin, ein Zytokin, das an der Regulation der Futteraufnahme durch deren Reduktion beteiligt ist. Da der NTS nach Leptingabe eine nukleäre STAT3-Translokation aufwies, ist es wahrscheinlich, daß dieser an einer zentralen Vermittlung der Futterreduktion beteiligt ist. Auch die Applikation von LPS führt dosisabhängig nicht nur Fieber, sondern auch zu einer reduzierten Futteraufnahme bzw. Anorexie. Im Zusammenhang mit der systemischen LPS-Applikation ist eine c-Fos- Aktivierung des NTS beobachtet worden (Elmquist et al. 1996). Basierend auf diesen Ergebnissen, und daß LPS die Synthese von IL-6 induziert, könnte man bei der vorliegenden nukleären STAT3-Translokation im NTS nach i.c.v. Applikation von *rrIL-6* auf eine zentrale Vermittlung der Futterreduktion durch IL-6 schließen. Auch könnte die nukleäre STAT3-Translokation für eine IL-6-vermittelte Aktivierung des NTS stehen, die für die höhere Fieberantwort nach i.c.v. Stimulation verantwortlich ist. Die Involvierung des NTS in der Fieberentstehung konnte nach Applikation von LPS nachgewiesen werden (Sehic & Blatteis 1996).

Zusammenfassend wird durch die Experimente der vorliegenden Arbeit, die Rolle von IL-6 als endogenes Pyrogen, sowie die Bedeutung der CVOs – insbesondere des OVLT und des SFO – in der Mediation der Fieberantwort unterstützt. Weiterhin wird die Wichtigkeit der anteroventralen Area praeoptica als pyrogene Zone innerhalb des Hypothalamus gestärkt. Die beobachtete IL-6-induzierte nukleäre STAT3-Translokation nach systemischer LPS- bzw. *rrIL-6*- oder zentraler *rrIL-6*-Applikation, fördert die Sichtweise der direkten Wirkung von IL-6 auf funktional aktive IL-6R in diesen Regionen, auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt die exakten Mechanismen der IL-6-induzierten genomischen Aktivierung und die Folgen für die Fieberantwort noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Perspektiven

Die vorliegenden Ergebnisse repräsentieren den Beweis einer genomischen Aktivierung wichtiger thermoregulatorischer Gehirnstrukturen durch zirkulierende Zytokine unter Mithilfe des Transkriptionsfaktor STAT3. Obwohl diese genomische Aktivierung wahrscheinlich durch endogen produziertes IL-6 vermittelt wird, scheinen auch andere endogene Mediatoren der LPS-induzierten Fieberantwort, wie z.B. TNF- α und IL-1 β , die Fieberantwort auf bakterielle Endotoxine zu unterstützen. Diese Zytokine bedienen sich einer ähnlichen intrazellulären Signaltransduktion. Auch sollte die Involvierung weiterer Mitglieder der STAT Familie und anderer Signalwege in die Überlegungen mit einbezogen werden.

Die STAT-Immunhistochemie bietet die Möglichkeit einer funktionellen Kartierung der Zytokinwirkung am Gehirn. Durch den Einsatz verschiedener STAT-Moleküle als neuroanatomische Marker, kann die Markierung einer zytokinspezifischen genomischen Aktivierung im Gehirn erfolgen.

Kapitel 5: Zusammenfassung

Im Verlauf von Infektionen oder Entzündungsprozessen werden zirkulierende Zytokine als humorale Botenstoffe des aktivierten Immunsystems angesehen, die unter anderem das Gehirn beeinflussen und dort an der Entstehung von Fieber und weiteren zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen mitwirken. Eine direkte Beeinflussung des Gehirns durch hochmolekulare Zytokin-Proteine kann nach gängiger Vorstellung nur an Stellen mit unvollständig ausgebildeter Blut-Hirn-Schranke erfolgen. Eine besondere Bedeutung in diesem Zusammenhang haben die sogenannten sensorischen zirkumventrikulären Organe (CVOs), zu denen das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), das Organum subfornicale (SFO) und die Area postrema (AP) gehören.

In der vorliegenden Studie wurde an Ratten ein Modell etabliert, welches die Beteiligung des Zytokins IL-6 an der zentralnervösen Vermittlung der Fieberantwort aufklären sollte. Als Stimulus zur Fieberinduktion wurden als exogenes Pyrogen bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), als endogenes Pyrogen rekombinantes rattenspezifisches Interleukin-6 (*rrIL-6*) verwendet, da dieses Zytokin als einziges fieberrelevantes Pyrogen während des Gesamtverlaufes der LPS-induzierten Fieberreaktion in erhöhter Konzentration im Blut auftrat. Die intraperitoneale (i.p.) Applikation von LPS (100µg/kg) führte bei Ratten innerhalb von 60min zu einem moderaten und danach über einen Zeitraum von 2-8h zu einem starken Anstieg von IL-6 im Blut. Parallel dazu entwickelte sich eine robuste biphasisch verlaufende Fieberreaktion. In Zellen des OVLT und SFO, nicht aber der AP war 120min nach LPS-Injektion eine starke nukleäre STAT3 (*“Signal Transducer and Activator of Transcription 3“*) Translokation zu sehen, die nach einer weiteren Stunde nahezu nicht mehr nachzuweisen war. STAT3 wird als spezifischer Transkriptionsfaktor der IL-6-vermittelten Signaltransduktion angesehen. Die direkte Beteiligung des Zytokins IL-6 wurde deshalb durch intraperitoneale Injektion von *rrIL-6* (45µg/kg) überprüft. Die Applikation von *rrIL-6* führte innerhalb von 60min zu einem starken Anstieg der zirkulierenden Konzentration dieses Zytokins in der Blutbahn und zur Ausbildung einer moderaten Fieberreaktion. Eine nukleäre STAT3-Translokation war in Zellen des

Kapitel 5: Zusammenfassung

OVLT und SFO nach Behandlung mit IL-6 dementsprechend bereits nach 60min festzustellen. Auch diese nukleären Signale waren 120min nach IL-6-Injektion nicht mehr zu detektieren. Der zelluläre Ursprung der nukleären STAT3-Signale sollte mit Hilfe immunhistochemischer Doppel- und Dreifachmarkierungen durch zellspezifische Markerproteine nachgewiesen werden. Durch Verwendung von neuronalen, glialen oder endothelialen Zellmarkerproteinen konnte gezeigt werden, daß es sich bei einem hohen Prozentsatz der Zellen, in denen eine nukleäre STAT3-Translokation 60min nach *rrIL-6*- bzw. 120min nach LPS-Gabe auftrat, um Astrozyten handelte. Diese Befunde legen nahe, daß bei Ratten durch das Zytokin IL-6 im Verlauf des LPS-induzierten Fiebers eine genomische Aktivierung von Astrozyten im Bereich des OVLT und SFO erfolgt. Da bekannt ist, daß im Verlauf des LPS-induzierten Fiebers auch innerhalb des Gehirns eine Bildung und Freisetzung von IL-6 erfolgt, wurde dieses Zytokin auch zentral mittels intrazerebroventrikulärer (i.c.v.) Mikroinjektion in den lateralen Gehirnvtrikel appliziert. Neben einer robusten Fieberreaktion wurde durch das i.c.v. applizierte *rrIL-6* (200ng/Tier) eine nukleäre STAT3-Translokation nicht nur in den CVOs OVLT und SFO induziert, sondern auch in anderen Hirnstrukturen, die zur Ausbildung einer Fieberantwort als wichtig angesehen werden. Diese befinden sich jedoch innerhalb der Blut-Hirn-Schranke, so daß sie für zirkulierendes IL-6 (nach i.p. Applikation) nicht direkt zugänglich sind.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen eine wichtige Rolle für peripher und zentral gebildetes IL-6 bei der Manifestation einer Fieberantwort. Erstmals wurde hierbei ein Nachweis für die direkte Beeinflussung von Gehirnzellen durch dieses Zytokin mittels der Dokumentation einer nukleären STAT3-Translokation geführt. Die Charakterisierung der Gene, die durch STAT3 im Fieberverslauf aktiviert wurden, bleibt künftigen Studien vorbehalten.

Kapitel 6: Summary

During infection or inflammation circulating cytokines are regarded as humoral signals of the activated immune system, which influence the brain and induce fever and other brain-controlled signs of illness. With regard to their high molecular weight cytokines can target the brain only within areas which lack a tight blood-brain-barrier, namely the so-called sensory circumventricular organs such as the vascular organ of the lamina terminalis (OVLT), the subfornical organ (SFO) and the area postrema (AP).

Fever was induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an exogenous pyrogen, or rat-recombinant Interleukin-6 (*rrIL-6*), a representative endogenous pyrogen, since IL-6 is the only cytokine implicated in fever, which is circulating in increased amounts during the whole time course of LPS-induced fever. Intraperitoneal (i.p.) injection of LPS (100µg/kg) led to a slight (1h) and then a strong increase (2-8h) in plasma IL-6 levels and a pronounced biphasic fever. Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 (“signal transducer and activator of transcription 3”) was observed within the OVLT and SFO, but not in the AP, 120min after LPS treatment, which almost disappeared again within the following 60min. Intraperitoneal administration of *rrIL-6* (45µg/kg) caused a strong increase of circulating concentrations of this cytokine within 60min and a rather moderate febrile response. Accordingly, nuclear translocation of STAT3 in response to IL-6 within the OVLT and SFO occurred already after 60min and almost disappeared again within the following hour. STAT3 immunohistochemistry was combined with the detection of marker proteins for cells of neuronal, glial or endothelial origin to phenotype LPS- or IL-6-activated cells. At time points with high pyrogen-induced IL-6 plasma levels (60min after injection of IL-6 and 120min after injection of LPS) a high percentage of STAT3 positive cells was co-localized with astrocytic cell marker. IL-6 might therefore mediate genomic cell activation of OVLT and SFO astrocytes during LPS-induced fever. During LPS-fever endogenous IL-6 is also produced and released locally within the brain. Therefore IL-6 was microinjected into the lateral cerebral ventricle (intracerebroventricular, i.c.v.).

Kapitel 6: Summary

Intracerebroventricular microinjections of IL-6 caused a robust fever and nuclear translocation of STAT3 besides the CVOs OVLT and SFO in additional brain areas which are implicated in fever, but located within the blood-brain-barrier and thus not directly accessible for i.p. administered circulating IL-6.

The results of this study support the evidence for an important role of peripheral and brain intrinsic IL-6 in the manifestation of a febrile response. For the first time the demonstration of nuclear STAT3 translocation under the influence of IL-6 provides direct evidence for a genomic activation of brain cells by this cytokine. Identification and functional characterization of target genes which are activated in the brain during fever requires further studies.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Aarden L., De Groot E., Schaap O., Lansdorp P. (1987). *Production of hybridoma growth factors by human monocytes*. Eur J Immunol, **17**, 1411-6.
- Akira S., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. (1990). *Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF)*. FASEB J, **4**, 2860-7.
- Akira S., Nishio Y., Inoue M., Wang X.J., Wei S., Matsusaka T., Yoshida K., Sudo T., Naruto M., Kishimoto T. (1994). *Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signalling pathway*. Cell, **77**, 63-71.
- Alonzi T., Fattori E., Cappelletti M., Gennaro C., Poli V. (1998) *Impaired STAT3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6-deficient mice*. Cytokine, **10**, 13-8.
- Andersson B. & Larsson B. (1961). *Influence of local temperature changes in the preoptic area and rostral hypothalamus on the regulation of food and water intake*. Acta Physiol Scand, **52**, 75-89.
- Andus T., Geiger T., Hirano T., Northoff H., Ganter U., Bauer J., Kishimoto T., Heinrich P.C. (1987). *Recombinant human B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2 / IFN- β_2) regulates β -fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells*. FEBS Lett, **221**, 18-22.
- Andus T., Geiger T., Hirano T., Kishimoto T., Tran-Thi T.A., Decker K., Heinrich P.C. (1988). *Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2 / IL-6) in hepatocyte primary cultures*. Eur J Biochem, **173**, 287-93.
- Aschner M. (1998). *Astrocytes as Mediators of Immune and Inflammatory Responses in the CNS*. NeuroToxicology, **19**, 269-82.
- Auernhammer C.J. & Melmed S. (2001). *The central role of SOCS-3 in integrating neuro-immunoendocrine interface*. J Clin Invest, **108**, 1735-40.
- Atkins E. (1984). *Fever: The old and the new*. J Infect Dis, **149**, 339-48.
- Azam M., Erdjument-Bromage H., Kreider B.L., Xia M., Quelle F., Basu R., Saris C., Tempst P., Ihle J.N., Schindler C. (1994). *Interleukin-3 signals through multiple isoforms of STAT5*. EMBO J, **14**, 1402-11.
- Banks W.A. & Kastin A.J. (1987). *Saturable transport of peptides across the blood-brain-barrier*. Life Sci, **41**, 1319-38.
- Banks W.A., Kastin A.J., Durham D.A. (1989). *Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain-barrier*. Brain Res Bull, **23**, 433-7.
- Banks W.A. & Kastin A.J. (1991). *Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous system*. Life Sci, **48**, PL 117-21.
- Banks W.A., Ortiz L., Plotkin S.R., Kastin A.J. (1991). *Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism*. J Pharmacol Exp Ther, **259**, 988-996.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Banks W.A., Kastin A.J., Guitierrez E.G. (1994). *Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain-barrier*. *Neurosci Lett*, **179**, 53-6.
- Banks W.A., Plotkin S.R., Kastin A.J. (1995). *Permeability of the blood-brain-barrier to soluble cytokine receptors*. *Neuroimmunomodulation*, **2**, 161-5.
- Banks W.A. & Kastin A.J. (1996). *Reversible association of the cytokines MIP-1 α and MIP-1 β with the endothelia of the blood-brain-barrier*. *Neurosci Lett*, **205**, 202-6.
- Barbieri G., Velazquez L., Scorbogna M., Fellous M., Pellegrini S. (1994). *Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon alpha/beta*. *Eur J Biochem*, **223**, 427-35.
- Bazan J.F. (1989). *A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-6 receptor-chain*. *Biochem Biophys Res Commun*, **164**, 788-95.
- Bazan J.F. (1990a). *Haemopoietic receptors and helical cytokines*. *Immunol Today*, **11**, 350-4.
- Bazan J.F. (1990b). *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, **87**, 6934-8.
- Bazan J.F. (1991). *Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold*. *Neuron*, **7**, 197-208.
- Beeson P.B. (1948). *Temperature elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leukocytes*. *J Clin Invest*, **27**, 524-48.
- Behnsen G. (1927). *Über die Farbstoffspeicherung im Zentralnervensystem der weißen Maus in verschiedenen Alterszuständen*. *Z Zellforsch*, **4**, 515-72.
- Bennett I.L. & Beeson P.B. (1953a). *Studies of the pathogenesis of fever: I. The effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits*. *J Exp Med*, **98**, 477-92.
- Bennett I.L. & Beeson P.B. (1953b). *Studies on the pathogenesis of fever: II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exsudates*. *J Exp Med*, **98**, 493-508.
- Benveniste E.N., Sparacio S.M., Norris J.G., Grenett G.E., Fuller G.M. (1990). *Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes*. *J Neuroimmunol*, **30**, 201-12.
- Benveniste E.N. (1992). *Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function and mechanism of action*. *Am J Physiol*, **263**, C1-16.
- Bernard C. (1876). *Leçons sur la chaleur animale, sur les effets de la chaleur et sur la fièvre*. J.B. Ballière, Paris.
- Bernheim H.A. & Kluger M.J. (1976). *Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival*. *Science*, **192**, 237-9.
- Benzinger T.H. (1977). *Temperature, Part I – Arts and Concepts: Hippokrates von Kos: Book on aphorism and book on ancient medicine*. Dowden, Hutchinson and Ross Inc., pp. 12-8, Stroudsburg, PA.
- Bequerel A.C. & Breschet G. (1839). *Recherches sur la chaleur animale, au moyen des appareils thermo-electrique*. Archives du Museum d'Histoire Naturelle, Paris.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Besedovsky H., Sorkin E., Keller M., Muller J. (1995). *Changes in blood hormone levels during the immune response*. Proc Soc Exp Biol Med, **150**, 466-70.
- Beutler B. (1989). *Orchestration of septic shock by cytokines*. In: Molecular and Cellular Mechanisms of Septic Shock, eds. R. Alan, pp. 219-35, Liss Inc, New York.
- Beutler B. & Cerami A. (1986). *Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin*. Nature, **320**, 584-7.
- Beutler B. & Cerami A. (1989). *The biology of cachectin / TNF: a primary mediator of the host response*. Annu Rev Immunol, **7**, 625-55.
- Blatteis C.M. (1988). *Neural mechanisms in the pyrogenic and acute-phase response to interleukin-1*. Int J Neuroscience, **38**, 223-32.
- Blatteis C.M. (1990). *Neuromodulative actions of cytokines*. Yale J Biol Med, **63**, 133-46.
- Blatteis C.M. (1992). *Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens*. Prog Brain Res, **91**, 409-12.
- Blatteis C.M., Bealer S.L., Hunter W.S., Llanos Q.-J., Ahokas R.A., Mashburn T.A.J. (1983). *Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs*. Brain Res Bull, **11**, 519-26.
- Blatteis C.M., Hales J.R.S., McKinley M.J., Fawcett A.A. (1987). *Role of anteroventral third ventricle region in fever in sheep*. Can J Physiol Pharmacol, **65**, 1255-60.
- Blatteis C.M. & Sehic E. (1997). *Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis*. Ann N.Y. Acad Sci, **813**, 445-7.
- Blatteis C.M., Quan N., Xin L., Unger A.L. (1990). *Neuromodulation of acute-phase responses to interleukin-6 in guinea pigs*. Brain Res Bull, **25**, 895-901.
- Bligh J. (1972). *Neuronal models of mammalian temperature regulation*. In: Essays on Temperature Regulation, eds. J. Bligh & R.E. Moore, pp. 105-20, North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Boulant J.A. (1991). *1. Thermoregulation*. In: Fever: Basic Mechanisms and Management, ed. P. Mackowiak, pp.1-22, Raven Press Ltd., New York.
- Bradbury M.W.B. (1984). *The structure and function of the blood-brain-barrier*. Fed Proc, **43**, 186-90.
- Breder C.D., Hazuka C., Ghayur T., Klug C., Huginin M., Yasuda K., Keng M., Saper C.B. (1994). *Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration*. Proc Natl Acad Sci USA, **91**, 11393-7.
- Broadwell R.D. & Brightman M.W. (1976). *Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral blood*. J Comp Neurol, **166**, 257-84.
- Callahan T.A. & Piekut D.T. (1997). *Differential Fos expression induced by IL-1beta and IL-6 in rat hypothalamus and pituitary gland*. J Neuroimmunol, **73**, 207-11.
- Cao C., Matsumura K., Ozaki M., Watanabe Y. (1999). *Lipopolysaccharide injected into the cerebral ventricle evokes fever through induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells*. J Neurosci, **19**, 716-25.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Cao C., Matsumura K., Yamagata K., Watanabe Y. (1995). *Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain: its possible role in the febrile response*. Brain Res, **697**, 187-96.
- Cao C., Matsumura K., Yamagata K., Watanabe Y. (1996). *Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever*. Brain Res, **733**, 263-72.
- Cao C., Matsumura K., Yamagata K., Watanabe Y. (1997a). *Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA in the rat brain by LPS*. Am J Physiol, **272**, R1712-25.
- Cao C., Matsumura K., Watanabe Y. (1997b). *Induction of cyclooxygenase-2 in the rat brain by cytokines*. Ann NY Acad Sci, **813**, 307-9.
- Cartmell T., Luheshi G.N., Rothwell N.J. (1999). *Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat*. J Physiol, **518**, R1712-25.
- 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**, 653-61.
- Castell J.V., Gomez-Lechon M.J., David M., Fabra R., Trullenque R., Heinrich P.C. (1990). *Acute phase response of human hepatocytes: Regulation of acute phase protein synthesis by interleukin-6*. Hepatology, **12**, 1179-86.
- Castell J.V., Gomez-Lechon M.J., David M., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.C. (1988). *Recombinant human interleukin-6 (IL-6 / BSF-2 / HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes*. FEBS Lett, **232**, 347-50.
- Chaby R. & Girard R. (1993). *Interaction of lipopolysaccharides with cells of immunological interest*. Eur Cytokine Netw, **4**, 399-414.
- Chai Z., Gatti S., Toniatti C., Poli V., Bartfai T. (1996). *Interleukin-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 β : a study on IL-6-deficient mice*. J Exp Med, **183**, 311-6.
- Chung C.D., Liao J., Liu B., Rao Y., Jay P., Berta P., Shuai K. (1997). *Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3*. Science, **278**, 1803-5.
- Cohen S., Bigazzi P.E., Yoshida T. (1974). *Commentary: Similarities of T-cell function in cell mediated immunity and antibody production*. Cell Immunol, **12**, 150-9.
- Coons A.H. (1958). *Fluorescent antibody methods*. In: General Cytochemical methods, ed. J.F. Danielli, pp. 399-422, Academic Press, New York.
- Cooper A.L., Blähser S., Malkinson T.J., Merker G., Roth J., Zeisberger E. (1988). *Changes in body temperature and vasopressin content to brain neurons in pregnant and nonpregnant guinea pigs, during fevers produced by poly I:poly C*. Pflügers Archiv, **412**, 292-6.
- Cooper K.E. (1995). *Fever and Antipyresis: The role of the Nervous System*. Cambridge University Press, GB.
- Cosman D. (1993). *The hematopoietin receptor superfamily*. Cytokine, **5**, 95-106.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Couraud P.O. (1994). *Interactions between lymphocytes, macrophages and central nervous system cells*. J Leukocyte Biol, **56**, 407-15.
- Dantzer R. (1994). *How do cytokines say hello to the brain? Neural versus humoral mediation*. Eur Cytokine Netw, **5**, 271-3.
- Dantzer R., Bluthé R.-M., Gheusi G., Cremona S., Layé S., Parnet P., Kelley K. (1998). *Molecular basis of sickness behavior*. Ann NY Acad Sci, **865**, 132-8.
- Darnell J.E., Jr., Kerr I.M., Stark G.R. (1994). *JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins*. Science, **264**, 1415-21.
- Dascombe M.J. & Milton A.S. (1989). *Study on the possible entry of bacterial endotoxin and prostaglandin E₂ into the central nervous system from the blood*. Brit J Pharmacol, **66**, 562-72.
- Davatelis G., Wolpe S.D., Sherry B., Dayer J.M., Chicheportiche R., Cerami A. (1989). *Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen*. Science, **243**, 1066-88.
- Davis S., Aldrich T.H., Stahl N., Pan L., Taga T., Kishimoto T., Ip N.Y., Yancopoulos G.D. (1993). *LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor*. Science, **260**, 1805-8.
- Decker T., Kovarik P., Meinke A. (1997). *GAS-elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression*. J Interferon Cytokine Res, **17**, 121-34.
- de Haen A. (1757-1773). *Ratio medendi in nosiocomio practico Vindobonensi*. 15 Bände, Joannis Thomae Trattner, Wien.
- Dellmann H.D. (1987). *Fine structure*. In: Circumventricular Organs and Body Fluids, ed. P.M. Gross, pp. 245-61, **Vol 1**, CRC Press, Boca Raton.
- Dellman H.D. & Simpson J.B. (1979). *The subfornical organ*. Int Rev Cytol, **58**, 333-421.
- Dinarello C.A., Bernheim H.A., Duff G.W., Le H.V., Nagabhushan T.L., Hamilton N.C., Coceani F. (1984). *Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon*. J Clin Invest, **74**, 906-13.
- Dinarello C.A., Cannon J.G., Mancilla J., Bissai I., Lees J., Coceani F. (1991). *Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells*. Brain Res, **562**, 199-206.
- 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**, 1433-50.
- Dunn A.J. & Wang J. (1995). *Cytokine effects on CNS biogenic amines*. Neuroimmunomodulation, **2**, 319-28.
- Duval D., Reinhardt B., Kedinger C., Boeuf H. (2000). *Role of suppressors of cytokine signalling (SOCS) in leukemia inhibitory factor (LIF) - dependent embryonic stem cell survival*. FASEB, **14**, 1577-84.
- Eddleston M. & Mucke L. (1993). *Molecular profile of reactive astrocytes-implications of their role in neurologic disease*. Neuroscience, **54**, 15-36.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Eisenman 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.
- Elmquist J.K. & Saper C.B. (1996). *Activation of neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus by intravenous lipopolysaccharide*. J Comp Neurol, **371**, 85-103.
- Elmquist J.K., Scammell T.E., Jacobson C.D., Saper C.B. (1996). *Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration*. J Comp Neurol, **371**, 85-103.
- Endo T.A., Masuhara M., Yokouchi M., Suzuki R., Sakamoto H., Mitsui K., Matsumoto A., Tanimura S., Ohtsubo M., Misawa H., Miyazaki T., Leonor N., Taniguchi T., Fujita T., Kanakura Y., Komiya S., Yoshimura A. (1997). *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*. Nature, **387**, 921-4.
- Fabry Z., Fitzsimmons K.M., Herlein J.A., Moninger T.O., Dobbs B.M., Hart M.N. (1993). *Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes*. J Neuroimmunol, **47**, 23-34.
- Faggioni R., Benigni F., Ghezzi P. (1995). *Proinflammatory cytokines as pathogenetic mediators in the central nervous system: brain – periphery – connections*. Neuroimmunomodulation, **2**, 2-15.
- Fann M.J. & Patterson P.H. (1994). *Neurotrophic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons*. Proc Natl Acad Sci, USA, **91**, 142-5.
- Fontana A., Weber E., Dayer J.M. (1986). *Synthesis of interleukin-1 / endogenous pyrogen in the brain of endotoxin-treated mice. Step in fever induction?* J Immunol, **133**, 1696-8.
- Foucault M. (1975). *The Birth of the Clinic: an Archaeology of Medical Perception*. Vintage Books, New York, pp. 174-94.
- Freudenberg M.A. & Galanos C. (1990). *Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanism of action*. Intern Rev Immunol, **6**, 207-21.
- Furie M.B. & McHugh D.D. (1989). *Migration of neutrophils across endothelial monolayers are stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor alpha*. J. Immunol, **143**, 3309-17.
- Futaki N., Yoshikawa K., Hamaska Y., Arai I., Higuchi S., Iizuka H., Otomo S. (1993). *NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions*. Gen Pharmacol, **24**, 105-10.
- Gadient R.A. & Otten U. (1994). *Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development*. Brain Res, **637**, 10-4.
- Gadient R.A. & Otten U. (1997). *Interleukin-6 (IL-6) – a molecule with both beneficial and destructive potentials*. Prog Neurobiol, **52**, 379-90.
- Gauldie J., Richards C., Harnish D., Landsdorp P., Baumann H. (1987). *Interferon- β_2 / B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells*. Proc Natl Acad Sci USA, **84**, 7251-5.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Gautron L., Lafon M., Chaingau G., Tramu G., Layé S. (2002). *Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge*. *Neuroscience*, **112**, 717-29.
- Gehrmann J., Matsumoto Y., Kreutzberg G.W. (1995). *Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain*. *Brain Res Rev*, **20**, 269-87.
- Geiger T., Andus T., Klapproth J., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.C. (1988). *Induction of rat acute-phase protein by interleukin-6 in vivo*. *Eur J Immunol*, **18**, 717-21.
- Gery I. & Waksman B.H. (1972). *Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens II. The cellular source of potentiating mediators*. *J Exptl Med*, **136**, 143-55
- Giulian D. (1987). *Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system*. *J Neurosci Res*, **18**, 155-71.
- Giulian D. & Baker T.J. (1986). *Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain*. *J Neurosci*, **6**, 2163-78.
- Goldgaber D., Harris H.W., Hlo T., Maciag T., Donnelly R.J., Jacobsen J.S., Vitek M.P., Gajdusek D.C. (1989). *Interleukin-1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 7606-10.
- Green M.H. & Vermeulen C.W. (1994). *Fever and the control of gram-negative bacteria*. *Res Microbiol*, **145**, 269-72.
- Gross P.M. (1992). *Circumventricular organ capillaries*. In: *Progress in Brain Research*, eds. A. Ermisch, R. Landgraf & H.J. Rühle, pp. 219-33, **Vol 1**, Elsevier, Amsterdam.
- Gruol D.L. & Nelson T.E. (1997). *Physiological and Pathological Roles of Interleukin-6 in the Central Nervous System*. *Mol Neurobiol*, **15**, 307-39.
- Gutierrez E.G., Banks W.A., Kastin A.J. (1993). *Murine tumor necrosis factor alpha is transported from the blood to brain in the mouse*. *J Neuroimmunol*, **47**, 169-76.
- Guschin D., Rogers N., Briscoe J., Witthuhn B.A., Wathing D., Horn F., Pellegrini S., Yasukawa K., Heinrich P., Stark G.R., Ihle J.N., Kerr I.M. (1995). *A major role for the protein kinase JAK1 in the JAK/STAT signalling pathway in response to interleukin-6*. *EMBO J*, **14**, 1421-9.
- Hampton R.Y., Golenbock D.T., Penman M., Krieger M., Raetz C.R.H. (1991). *Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors*. *Nature*, **352**, 342-4.
- Heaney M.L. & Golde D.W. (1996). *Soluble cytokine receptors*. *Blood*, **87**, 875-57.
- Hamanaka I., Saito Y., Yasukawa H., Kishimoto I., Kuwahara K., Miyamoto Y., Harada M., Ogawa E., Kajiyama N., Takahashi N., Izumi T., Kawakami R., Masuda I., Yoshimura A., Nakao K. (2001). *Induction of JAB/SOCS-1/SSI-1 and CIS3/SOCS-3/SSI-3 is involved in gp130 resistance in cardiovascular system in rat treated with cardiotrophin-1 in vivo*. *Circ Res*, **88**, 727-32.
- Hammel H.T., Hardy J.D., Fusco M.M. (1960). *Thermoregulatory responses to hypothalamic cooling in unanesthetized dogs*. *Am J Physiol*, **198**, 481-6.
- Hammel H.T. (1965). *Neurons and temperature regulation*. In: *Physiological Controls and Regulation*, eds. W.S. Yamamoto & J.R. Brobeck, pp. 71-97, W.B. Saunders, Philadelphia.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Hammel H.T., Jackson D.C., Stolwijk J.A.J., Hardy J.D., Stramme S.B. (1963). *Temperature regulation by hypothalamic proportional control with an adjustable set point*. J Appl Physiol, **18**, 1146-54.
- Hansen J.A., Lindberg K., Hilton D.J., Nielsen J.H., Billestrup N. (1999). *Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressors of cytokine signaling proteins*. Mol Endocrinol, **13**, 1832-43.
- Hanson D.F., Murphy P.A., Windle B.E. (1980). *Failure of rabbit neutrophils to secrete endogenous pyrogen when stimulated with staphylococci*. J Exptl Med, **151**, 1360-71
- Harlow E. & Lane D. (1988). *Antibodies – A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory.
- Hashimoto M., Keno T., Iriki M. (1994). *What role does the organum vasculosum laminae terminalis play in fever in rabbits?* Pflügers Arch, **429**, 50-7.
- Heim M.H., Kerr I.M., Stark G.R., Darnell J.E., Jr. (1995). *Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway*. Science, **267**, 1347-9.
- Heinrich P.C., Castell J., Andus T. (1990). *Interleukin-6 and the acute-phase response*. Biochem J, **265**, 621-36.
- Heinrich P.C., Horn F., Graeve L., Dittrich E., Kerr I., Müller-Newen G., Grötzinger J., Wollmer A. (1998). *Interleukin-6 and related cytokines: Effect on the acute phase reaction*. In: Nutrition and Cytokines, Z Ernährungswiss, **37**, Suppl 1, 43-9, Steinkopff Verlag, Germany.
- Hellon R.F. (1972). *Central thermoreceptors and thermoregulation*. In: Handbook of Sensory Physiology, ed. E. Neil, Vol. **3**, pp.161-86, Springer Verlag, Heidelberg.
- Herschman H.R. (1996). *Prostaglandin synthase 2*. Biochem Biophys Acta, **1299**, 125-40.
- Hibi M., Murakami M., Saito M., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. (1990). *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, **63**, 573-81.
- Hibi M., Nakajima K., Hirano T. (1996). *IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system*. J Mol Med, **74**, 1-12.
- Hickey W.F. & Kimura H. (1988). *Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo*. Science, **239**, 290-2.
- Hilton D.J., Richardson R.T., Alexander W.S., Viney E.M., Willson T.A., Sprigg A.S., Starr R., Nicholson S.E., Metcalf D., Nicola N.A. (1998). *Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes*. Proc Natl Acad Sci USA, **95**, 114-9.
- Hirano T., Matsuda T., Nakajima K. (1994). *Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin-6 related cytokine subfamily*. Stem Cells, **12**, 262-277.
- Hirano T., Taga T., Nakano N., Yasukawa K., Kashiwamura S., Shimizu 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**, 5490-4.
- Hirano T., Taga T., Yamasaki K., Matsuda T., Yasukawa K., Hirata Y., Yawata H., Tanabe O., Akira S., Kishimoto T. (1989). *Molecular cloning of the cDNA for interleukin-6 / B-cell stimulating factor-2 and its receptors*. Ann NY Acad Sci, **557**, 167-78.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Hofer H. (1958). *Zur Morphologie der zirkumventrikulären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere*. Deut Zool Ges Verh, **8**, 202-51.
- Hopkins S.J. & Rothwell N.J. (1995). *Cytokines and the nervous system I. Expression and recognition*. Trends Neurosci, **18**, 83-8.
- 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**, 577-80.
- Hübschle T., Thom E., Watson A., Roth J., Klaus S., Meyerhof W. (2001). Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. J Neurosci, **21**, 2413-24.
- Hunter W.S., Sehic E., Blatteis C.M. (1994). *Fever and the organum vasculosum laminae terminalis: another look*. In: Temperature Regulation: Recent Physiological and Pharmacological Advances, ed. A.S. Milton, pp. 75-79, Birkhäuser, Basel.
- Ibelgaufts H. (1995). *Dictionary of cytokines*. VCH Verlag, pp.537-8, D-Weinheim.
- Ihle J.N., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Yamamoto K., Silvennoinen O. (1995). *Signalling through the hematopoietic cytokine receptors*. Annu Rev Immunol, **13**, 369-98.
- Ihle J.N., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Yamamoto K., Thierfelder W.E., Kreider B., Silvennoinen O. (1994). *Signalling by the cytokine receptor superfamily, JAKs and STATs*. Trends Biochem Sci, **19**, 222-7.
- Improta T., Schindler C., Horvath C.M., Kerr I.M., Stark G.R., Darnell J.E., Jr. (1994). *Transcription factor ISGF-3 formation requires phosphorylated Stat91 protein, but Stat113 protein is phosphorylated independently of Stat91 protein*. Proc Natl Acad Sci USA, **91**, 4776-80.
- Ingram D.L., McLean J.A., Whittow G.C. (1963). *The effect of heating the hypothalamus and the skin on the rate of moisture vaporization from the skin of the ox (Bos taurus)*. J Physiol (Lond), **169**, 394-403.
- Johnson A.K., Zardetto-Smith A.M., Gross P.M. (1992). *Integrative mechanisms and the maintenance of cardiovascular and body fluid homeostasis: the cerebral processing of sensory input derived from the circumventricular organs of the lamina terminalis*. In: Progress in Brain Research, eds. A. Ermisch, R. Landgraf, H.J. Rühle, pp.381-91, **Vol 1**, Elsevier, Amsterdam.
- Johnson A.K. & Gross P.M. (1993). *Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways*. FASEB J, **7**, 678-86.
- Johnston J.A., Kawamura M., Kirken R.A., Chen Y.Q., Blake T.B., Shibuya K., Ortaldo J.R., McVicar D.W., O'Shea J.J. (1994). *Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2*. Nature, **379**, 151-3.
- Kampschmidt R.F. (1978). *Leucocytic endogenous mediator*. J Reticuloendothel Soc, **23**, 287-97.
- Katsuura G., Gottschall P.E., Arimura A. (1989). *Interleukin-1 β increases prostaglandins E₂ in rat astrocyte cultures: modulatory effects of neuropeptides*. Endocrinol, **8**, 3125-7.
- Kishimoto T. (1989). *The biology of Interleukin-6*. Blood, **74**, 1-10.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., Taga T. (1995). *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. *Blood*, **86**, 1243-54.
- Kishimoto T., Taga T., Akira S. (1994). *Cytokine signal transduction*. *Cell*, **76**, 253-62.
- Klir J.J., Roth J., Szelenyi Z., McClellan J.L., Kluger M.J. (1993). *Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rats*. *Am J Physiol*, **265**, R512-7.
- Klir J.J., McClellan J.L., Kluger M.J. (1994). *Interleukin-1 beta causes the increase in anterior hypothalamic interleukin-6 during LPS-induced fever in rats*. *Am J Physiol*, **266**, R1845-8.
- Kluger M.J. (1979). *Fever: its Biology, Evolution and Function*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Kluger M.J. (1991a). *Role of pyrogens and cryogens*. *Physiol Rev*, **71**, 93-127.
- Kluger M.J. (1991b). *The adaptive value of fever*. In: *Fever: Basic Mechanisms and Management*, ed. P. Mackowiak, pp. 105-24, Raven Press Ltd., New York.
- Kluger M.J., Ringler D.H., Anver M.R. (1975). *Fever and Survival*. *Science*, **188**, 166-8.
- Konsman J.P., Luheshi G.N., Bluthé R.-M., Dantzer R. (2000). *The vagus nerve mediates behavioral depression, but not fever, in response to peripheral immune signals: a functional anatomical analysis*. *Eur J Neurosci*, **12**, 4434-46.
- Krisch B., Leonhardt H., Oksche A. (1978). *Compartments of the organum vasculosum laminae terminalis of the rat and their delineation against the outer cerebrospinal fluid containing space*. *Cell Tissue*, **195**, 485-497.
- Krueger J.M. (1990). *Somnogenic activity of muramyl peptides*. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 122-6.
- Kushner I. (1982). *The phenomenon of the acute phase response*. *Ann N.Y. Acad Sci*, **389**, 39-49.
- Landas S. & Philipps M.I. (1987). *Comparative anatomy of the organum vasculosum of the lamina terminalis*. In: *Circumventricular Organs and Body Fluids*, ed. P.M. Gross, pp. 131-56, CRC Press, Vol 1, Boca Raton.
- Lansdorp P.M., Aarden L.A., Calafat J., Zeiljemaker W.P. (1986). *A growth-factor dependent B-cell hybridoma*. *Curr Top Microbiol Immunol*, **132**, 105-13.
- Lavoisier A.-L. (1793). *Elements of Chemistry in a New Systematic Order, Containing All the Modern Discoveries*. Creech W., Edinburgh.
- Lebel E., Vallières L., Rivest S. (2000). *Selective Involvement of Interleukin-6 in the Transcriptional Activation of the Suppressor of Cytokine Signaling-3 in the Brain during Systemic Immune Challenges*. *Endocrinology*, **141**, 3749-63.
- Lee S.C., Liu W., Dickson D.W., Brosnan C.F., Berman J.W. (1993). *Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes*. *J Immunol*, **150**, 2659-67.
- Lee H.Y., Whiteside M.C., Herkenham M. (1998). *Area postrema removal abolishes stimulatory effects of intravenous interleukin-1 β on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and c-fos mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *Brain Res Bull*, **46**, 495-503.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- LeMay D.R., LeMay L.G., Kluger M.J., DAlecy L.G. (1990a). *Plasma profiles of IL-6 and TNF with fever-inducing doses of lipopolysaccharide in dogs*. Am J Physiol, **259**, R126-32.
- LeMay L.G., Otterness I.G., Vander A.J., Kluger M.J. (1990b). *In vivo evidence that the rise in plasma IL-6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL-1 beta*. Cytokine, **2**, 199-204.
- LeMay L.G., Vander A.J., Kluger M.J. (1990c). *Role of interleukin-6 in fever in rats*. Am J Physiol, **258**, R798-803.
- Lenczowski M.J.P., Bluthé R.-M., Roth J., Rees G.S., Rushforth D.A., Van Dam A.-M., Tilders F.J.H., Dantzer R., Rothwell N.J., Luheshi G.N. (1999). *Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats*. Am J Phys, **276**, R652-8.
- Leonhardt H. (1980). *Ependym und zirkumventrikuläre Organe*. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, eds. A. Oksche & L. Vollrath, pp. 177-667, Springer Verlag, Berlin.
- Lesnikov V.A., Efremov O.M., Korneva E.A., Van Damme J., Billiau A. (1991). *Fever produced by intrahypothalamic injection of interleukin-1 and interleukin-6*. Cytokine, **3**, 195-8.
- Li S., Wand Y., Matsumura K., Ballou L.R., Morham S.G., Blatteis C.M. (1999). *The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2 (-/-), but not in cyclooxygenase-2 (+/+) mice*. Brain Res, **825**, 86-94.
- Liebermeister C. (1875). *Theorie des Fiebers*. In Handbuch der Pathologie und der Therapie des Fiebers, ed. F.C.W. Vogel, pp. 277-384, Leipzig.
- Liles W.C. & van Voorhis W.C. (1995). *Review: nomenclature and biologic cytokines involved in inflammation and the host immune response*. J Infect Dis, **172**, 1573-80.
- Luderitz O., Galanos C., Lehmann V., Nurminen K., Reitschel E.T., Rosenfelder G., Simon M., Westphal O. (1973). *Lipid A: chemical structure and biological activity*. Infect Dis, **128** (Suppl), 17-29.
- Luheshi G., Miller A.J., Brouwer S., Dascombe M.J., Rothwell N.J., Hopkins S.J. (1996). *Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat*. Am J Physiol, **270**, E91-E95.
- Luheshi G. & Rothwell N. (1996). *Cytokines and fever*. Int Arch Allergy Immunol, **109**, 301-7.
- 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 (sIL-6R)*. Curr Top Microbiol Immunol, **194**, 199-206.
- Lütticken C., Coffey P., Yuan J., Schwartz C., Caldenhoven E., Schindler C., Kruijer W., Heinrich P.C., Horn F. (1995). *Interleukin-6-induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: evidence for a role in interleukin-6 target gene induction*. FEBS Lett, **360**, 137-43.
- Lütticken C., Wegenka U.M., Yuan J., Buschmann J., Schindler C., Ziemiecki A., Harpur A.F., Wilks A.F., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Barbieri G., Pellegrini S., Sendter M., Heinrich P.C., Horn F. (1994). *Association of transcription factor APRF and protein kinase JAK1 with the interleukin-6 signal transducer gp130*. Science, **263**, 89-92.
- Mackiewicz A., Wiznerowicz M., Roeb E., Karczewska A., Nowak J., Heinrich P.C., Rose-John S. (1995). *Soluble interleukin-6 receptor is biologically active in vivo*. Cytokine, **7**, 142-9.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Mackowiak P.A. (1991). *Direct effects of physiologic variations in temperature on pathogenic microorganisms*. In: *Fever: Basic Mechanisms and Management*, ed. P. Mackowiak, pp. 167-182. Raven Press, New York.
- März P., Heese K., Hock C., Golombowski S., Müller-Spahn F., Rose-John S., Otten U. (1997a). *Interleukin-6 and soluble forms of IL-6 receptors are not altered in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients*. *Neurosci Lett*, **239**, 29-32.
- März P., Herget T., Lang E., Otten U., Rose-John S. (1997b). *Activation of gp130 by IL-6 / soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation*. *Eur J Neurosci*, **9**, 2765-73.
- Maeger A. & Gaines-Das R.E. (1994). *International collaborative study of the candidate international standards for human tumor necrosis factor alpha (hTNF α) and beta (hTNF β) and for murine tumor necrosis factor alpha (mTNF α)*. *J Immunol Meth*, **179**, 1-13.
- Magoun H.W., Harrison F., Brobeck J.R., Ranson S.W. (1938). *Activation of the heat loss mechanism by local heating of the brain*. *J Neurophysiol*, **1**, 101-14.
- Maier J.A.M., Voulalas P., Roeder D., Maciag T. (1990). *Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 α antisense oligomer*. *Science*, **249**, 1570-4.
- Majno G. (1975). *The Healing Hand. Man and Wound in the Ancient World*. Harvard University Press, **57**, Cambridge, MY.
- Maness L.M., Kastin A.J., Banks W.A. (1998). *Relative contributions of a CVO and the microvascular bed to delivery of blood-borne IL-1 α to the brain*. *Am J Physiol*, **275**, E207-12.
- Matsuda T., Hori T., Nakashima T. (1992). *Thermal and PGE₂ sensitivity of the organum vasculosum laminae terminalis region and preoptic area in rat brain slices*. *J Physiol Lond*, **454**, 197-212.
- Matsumura K, Watanabe Y., Onoe H., Watanabe Y., Hayaishi O. (1990). *High density of prostaglandin E2 binding sites in the anterior wall of the 3rd ventricle: a possible site of its hyperthermic action*. *Brain Res*, **533**, 147-51.
- Matsumura K., Cao C., Watanabe Y., Watanabe Y. (1998). *Prostaglandin system in the brain: sites of biosynthesis and sites of action under normal and hyperthermic conditions*. In: *Brain function in hot environment*, eds. H.S. Sharma & J. Westman, pp. 275-95, Elsevier, Amsterdam.
- McKinley M.J., Allen A.M., Chai S.Y., Hards D.K., Mendelsohn F.A.O., Oldfield B.J. (1989). *The lamina terminalis and its neural connections: neural circuitry involved in angiotensin action and fluid and electrolyte homeostasis*. *Acta Physiol Scand*, **583**, 113-8.
- McKinley M.J., Clevers J., Denton D.A., Oldfield B.J., Penschow J., Rundgren M. (1987). *Fine structure of the organum vasculosum of the lamina terminalis*. In: *Circumventricular organs and Body Fluids*, ed. P. Gross, **Vol 1**, pp.111-30, CRC Press, Boca Raton, FL.
- McKinley M.J., McAllen R.M., Mendelsohn D.K., Allen A.M., Chai S.Y., Oldfield B.J. (1990). *Circumventricular Organs: Neuroendocrine Interfaces between the Brain and the Hemal Milieu*. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **11**, 91-127.
- Milton A.S. (1989). *Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever*. *Ann NY Acad Sci*, **559**, 392-410.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Milton A.S. & Wendtland S. (1970). *A possible role for prostaglandin E1 as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat.* J Physiol (Lond), **218**, 325-66.
- Minami M., Kruaishi Y., Satoh M. (1991). *Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 β , TNF- α and LIF in the rat brain.* Biochem Biophys Res Comm, **176**, 593-8.
- Miyajima A., Kitamura T., Harada N., Yokota T., Arai K. (1992). *Cytokine receptors and signal transduction.* Annu Rev Immunol, **10**, 295-331.
- Morimoto A., Murakami N., Takada M., Teshirogi S., Watanabe T. (1987). *Fever and the acute phase response induced in rabbits by human recombinant Interferon- γ .* J Physiol (Lond), **391**, 209-18.
- Morimoto M., Murakami N., Nakamori T., Watanabe T. (1988): *Multiple control of fever production in the central nervous system of rabbits.* J Physiol (Lond), **397**, 269-80.
- Mosman T. (1983). *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Meth, **65**, 55-63.
- Mucke L. & Eddleston M. (1993). *Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system.* FASEB J, **7**, 1226-32.
- Müllberg J., Schooltink H., Stoyan T., Gunther M., Graeve L., Buse G., Mackiewicz A., Heinrich P.C. (1993). *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding.* Eur J Immunol, **23**, 473-80.
- Müller M., Briscoe J., Laxton C., Guschin D., Ziemiecki A., Silvennoinen O., Harpur A.G., Barbieri G., Witthuhn B.A., Schindler C., et al. (1993). *The protein kinase JAK1 complements defects in interferon- α and - γ signal transduction.* Nature, **366**, 129-35.
- Murakami H., Narazaki M., Hibi M., Yawata H., Yasukawa K., Hamaguchi M., Taga T., Kishimoto T. (1991). *Critical cytoplasmic region of the interleukin-6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family.* Proc Natl Acad Sci, USA, **88**, 11349-53.
- Murakami H., Hibi M., Nakagawa N., Taga T., Kishimoto T. (1993). *IL-6 induced homodimerization of gp130 and associated activation of tyrosin kinase.* Science, **260**, 1808-1810.
- Naka T., Narazaki M., Hirata M., Matsumoto T., Minamoto S., Aono A., Nishimoto N., Kajita T., Taga T., Yoshizaki K., Akira S., Kishimoto T. (1997). *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor.* Nature, **387**, 924-9.
- Narazaki M., Witthuhn B.A., Yoshida K., Silvennoinen O., Yasukawa K., Ihle J.N., Kishimoto T., Taga T. (1994). *Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin-6 signal transducer gp130.* Proc Natl Acad Sci, USA, **91**, 2285-9.
- Narazaki M., Fujimoto M., Matsumoto M., Morita Y., Saito H., Kajita T., Yoshizaki K., Naka T., Kishimoto T. (1998). *Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin-6 signaling.* Proc Natl Acad Sci USA, **95**, 13130-4.
- Navarra P., Tsagarakis S., Faria M.S., Rees L.H., Besser G.M., Grossman A.B. (1991). *Interleukins-1 and -6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway.* Endocrinology, **128**, 37-44.
- Neuman H. & Wekerle H. (1998). *Neuronal control of immune response in the central nervous system: Linking brain immunity to neurodegeneration.* Neuropathol Exp Neurol, **57**, 1-9.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Neta R., Sayers T.J., Oppenheim J.J. (1992). *Relationship of TNF to interleukins*. In: Tumor Necrosis Factor, eds. B.B. Aggarwal & J. Vilc ek, pp. 499-566, Marcel Dekker Inc, New York.
- Nicholson S.E., Willson T.A., Farley A., Starr R., Zhang J.-G., Baca M., Alexander W.S., Metcalf D., Hilton D.J., Nicola N.A. (1999). *Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction*. EMBO J, **18**, 375-85.
- Nicholson S.E., De Souza D., Fabri L.J., Corbin J., Willson T.A., Zhang J.G., Silvy A., Asimakis A., Farley A., Nash A.D., Metcalf D., Hilton D.J., Nicola N.A., Baca M. (2000). *Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130*. Proc Natl Acad Sci USA, **97**, 6493-8.
- Niimi M., Wada Y., Sato M., Takahara J., Kawanishi K. (1997). *Effect of continuous intravenous injection of interleukin-6 and pretreatment with cyclooxygenase inhibitor on brain c-fos expression in the rat*. Neuroendocrinol, **66**, 47-55.
- Norris J.G., Tang L.-P., Sparacio S.M., Benveniste E.N. (1994). *Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 β and tumor necrosis factor α* . J Immunol, **152**, 841-50.
- Oers M., Van den Heyden A., Aarden L. (1988). *Interleukin-6 in serum and urine of renal transplant recipients*. Clin Exp Immunol, **71**, 312-8.
- Ohya K., Kajigaya S., Yamashita Y., Miyazato A., Hatake K., Miura Y., Ikeda U., Shimada K., Ozawa K., Mano H. (1997). *SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase*. J Biol Chem, **272**, 27178-82.
- Old L.J. (1987). *Polypeptide mediator network*. Nature, **326**, 330-1.
- Oldfield B.J., Hards D.K., McKinley M.J. (1991). *Projections from the subfornical organ to the supraoptic nucleus in the rat: ultrastructural identification of an interposed synapse in the median preoptic nucleus using a combination of neuronal tracers*. Brain Res, **558**, 13-9.
- Oldfield B.J. & McKinley M.J. (1995). *Circumventricular organs*. In: The Rat Nervous System 2nd edition, ed. G. Paxinos, pp. 391-403, Academic press.
- Opp M., Obal F., Jr., Cady A.B., Johannsen L., Krueger J.M. (1989). *Interleukin-6 is pyrogenic but not somnogenic*. Physiol Behav, **45**, 1069-72.
- Ota K., Katafuchi T., Takaki A., Hori T. (1997). *AV3V neurons that send axons to hypothalamic nuclei respond to the systemic injection of IL-1 β* . Am J Physiol, **272**, R532-40.
- Overduin M., Rios C.B., Mayer B.J., Baltimore D., Cowburn D. (1992). *Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl*. Cell, **70**, 697-704.
- Pan W.H., Zadina J.E., Harian R.E., Weber J.T., Banks W.A., Kastin A.J. (1997). *Tumor necrosis factor alpha: A neuromodulator in the CNS*. Neurosci Biobehav Rev, **21**, 603-13.
- Paxinos G. & Watson C. (1998). *The rat brain in stereotactic coordinates*. Academic Press, USA.
- Perry V.H., Andersson P.-B., Gordon S. (1993). *Macrophages and inflammation in the central nervous system*. Trends Neurosci, **16**, 268-73.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Peters M., Odenthal M., Schirmacher P., Slessing M., Ciliberto G., Meyer zum Büschenfelde K.H., Rose-John S. (1997a). *Soluble IL-6 receptor leads to paracrine modulation of the hepatic acute phase response in double transgenic mice*. J Immunol, **159**, 1474-81.
- Peters M., Schirmacher P., Goldschmitt J., Odenthal M., Peschel C., Dienes H.P., Fattori E., Ciliberto G., Meyer zum Büschenfelde K.H., Rose-John S. (1997b). *Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in IL-6/sIL-6R double transgenic mice*. J Exp Med, **185**, 755-66.
- Philipps M.I., Balhorn L., Leavitt M., Hoffmann W. (1974). *Scanning electron microscope study of the rat subfornical organ*. Brain Res, **80**, 95-110.
- Philipps M.I. & Camacho A. (1987). *Neural connections of the organum vasculosum laminae terminalis*. In: Circumventricular Organs and Body Fluids, ed. P.M. Gross, pp. 157-69, **Vol 1**, CRC Press, Boca Raton.
- Plata-Salaman C.R. (1996). *Anorexia induced by activators of the signal transducer gp130*. Neuroreport, **7**, 841-4.
- Plotkin S.R., Banks W.A., Kastin A.J. (1996). *Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain-barrier*. J Neuroimmunol, **67**, 41-7.
- Pugin J., Schurer-Maly C.C., Leturcq D., Moriarty A., Ulevitch R.J., Tobias P.S. (1993). *Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14*. Proc Natl Acad Sci USA, **90**, 2744-8.
- Putnam T.J. (1922). *The intermolecular tubercle: An undescribed area in the anterior wall of the third ventricle*. Bull John Hopkins Hosp, **38**, 181-2.
- Raetz R.H.C., Ulevitch J.R., Wright D.S., Sibley H.C., Aihao D., Nathan F.C. (1991). *Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction*. FASEB J, **5**, 2652-60.
- Richards C.D. & Gauldie J. (1994). *The acute-phase protein response*. In: Textbook of Immunopharmacology, eds. M.M. Dale, J.C. Foreman & T.P. Fan, pp. 269-76, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Rietschel E.T., Kirikae T., Brade H., Loppnow H., Ulmer A.J., Heine H., Zabel P., Flad H.D., Schade F.U. (1993). *Molekulare Aspekte der endotoxin-induzierten Zytokinbildung in Makrophagen*. In: Schriftenreihe der Gesellschaft für Fortschritte in der Inneren Medizin, ed. W. Wilman, pp. 34-49, 22. Symposium „Zytokine“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Rietschel E.T., Kirikae T., Schade U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow G., Ulmer A.J., Zähringer U., Seydel U., Di Pavdova F., Schreier M., Brade H. (1994). *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J, **8**, 217-25.
- Ringheim G.E., Burgher K.L., Heroux J.A. (1995). *Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain*. J Neuroimmunol, **63**, 113-23.
- Ringheim G.E., Szczepanik A.M., Petko W., Burgher K.L., Zhu S.Z., Chao C.C. (1998). *Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor / interleukin-6 complex*. Brain Res Mol Brain Res, **55**, 35-44.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Roberts N.J. (1991). *The immunological consequences of fever*. In: *Fever: Basic Mechanisms and Management*, ed. P. Mackowiak, pp. 125-142, Raven Press Ltd., New York
- Rose-John S. & Heinrich P.C. (1994). *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. *Biochem J*, **300**, 281-290.
- Roth J. (1996). *Mechanismen der Fieberentstehung und der endogenen Antipyrese – ein Experimentalmodell zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Immun- und Nervensystem*. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Roth J. (1998). *Immunological and neuroendocrine modulation of fever in stress*. *J Prog Brain Res*, **115**, 177-92.
- Roth J., Conn C.A., Kluger M.J., Zeisberger E. (1993). *Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and TNF during endotoxin fever in guinea pigs*. *Am J Physiol*, **265**, R653-8.
- Roth J. & de Souza G.E.P. (2001). *Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation*. *Braz J Med Biol Res*, **34**, 1-14.
- Roth J., McClellan J.L., Kluger M.J., Zeisberger E. (1994). *Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea-pigs*. *J Physiol*, **477**, 177-85.
- Rothman P., Kreider B., Azam M., Levy D., Wegenka U., Eilers A., Decker T., Horn F., Kashleva H., Ihle J. (1994). *Cytokines and growth factors signal through tyrosine phosphorylation of a family of related transcription factors*. *Immunity*, **1**, 457-68.
- Rothwell N.J., Busbridge N.J., Le Feuvre R.A., Hardwick A.J., Gauldie J., Hopkins S.J. (1991). *Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat*. *Can J Physiol Pharmacol*, **69**, 1465-9.
- Rothwell N.J. & Hopkins S.J. (1995). *Cytokines and the central nervous system II. Actions and mechanism of actions*. *Trends Neurosci*, **18**, 130-6.
- Rotondo D., Abul H.T., Milton A.S., Davidson J. (1988). *Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever*. *Eur J Pharmacol*, **154**, 145-52.
- Rott O., Tontsch U., Fleisher B., Cash E. (1993). *Interleukin-6 production in "normal" and HTLV-1 tax-expressing brain-specific endothelial cells*. *Eur J Immunol*, **23**, 1987-91.
- Ruff-Jamison S., Chen K., Cohen S. (1993). *Induction by EGF and interferon-gamma of tyrosine phosphorylated DNA binding proteins in mouse liver nuclei*. *Science*, **261**, 1733-6.
- Ruff-Jamison S., Zhong Z., Wen Z., Chen K., Darnell J.E., Jr., Cohen S. (1994). *Epidermal growth factor and lipopolysaccharide activate Stat3 transcription factor in mouse liver*. *J Biol Chem*, **269**(35), 21933-5.
- Sagar S.M., Price K.J., Kasting N.W., Sharp F.R. (1995). *Anatomic patterns of Fos immunostaining in the rat brain following systemic endotoxin administration*. *Brain Res Bull*, **36**, 381-92.
- Sanctorius (1614). *Ars de statica medica*. Lipsiae, Z. Schurer & M. Götz.
- Saper C.B. & Breder C.D. (1994). *The neurologic basis of fever*. *N Engl J Med*, **330**, 1880-6.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Sawada M., Suzumura A., Marunouchi T. (1992). *TNF- α induces IL-6 by astrocytes but not by microglia*. Brain Res, **583**, 296-9.
- Sawada M., Itoh Y., Suzumura A., Marunouchi T. (1993). *Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells*. Neurosci Lett, **160**, 131-4.
- Scammell T.E., Elmquist J.K., Griffin J.D., Saper C.B. (1996). *Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways*. J Neurosci, **16**, 6246-54.
- Schindler C. & Darnell J.E., Jr. (1995). *Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT Pathway*. Annu Rev Biochem, **64**, 621-51.
- Schmidt H.H., Lohmann S.M., Walter U. (1993). *The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action*. Biochem Biophys Acta, **1178**, R153-75.
- Schöbitz B., Voorhuis D.A.M., de Kloet E.R. (1992). *Localization of interleukin-6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain*. Neurosci Lett, **136**, 189-92.
- Schöbitz B., de Kloet E.R., Sutanto W., Holsboer F. (1993). *Cellular localization of interleukin-6 mRNA and interleukin-6 receptor mRNA in the rat brain*. Eur J Neurosci, **5**, 1462-35.
- Schöbitz B., Pezeshki G., Pohl T., Hemman U., Heinrich P.C., Holsboer F., Reul J.M.H.M. (1995). *Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo*. FASEB J, **9**, 659-64.
- Schuringa J.J., Timmer H., Lüttichhuizen D., Vellenga E., Kruijer W. (2001). *c-Jun and c-Fos cooperate with STAT3 in IL-6-induced transactivation of the IL-6 response element (IRE)*. Cytokine, **14**, 78-87.
- Sehic E. & Blatteis C.M. (1996). *Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs*. Brain Res, **726**, 160-6.
- Shibata M & Blatteis M.J. (1991). *Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis*. Brain Res, **562**, 323-6.
- Shuai K., Ziemiecki A., Wilks A.F., Harpur A.G., Sadowski H.B., Gilman M.Z., Darnell J.E. (1993). *Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins*. Nature, **366**, 580-3.
- Siegel R.E. (1968). *Galen's System of Physiology and Medicine*. Open omnia, vol II, Karger, New York.
- Song M.M. & Shuai K. (1998). *The suppressors of cytokine signalling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities*. J Biol Chem, **273**, 35056-62.
- Sprang S.R. & Bazan J.F. (1993). *Cytokine structural taxonomy and mechanism of receptor engagement*. Curr Opin Struct Biol, **3**, 815-27.
- Stahl N., Boulton T.G., Farrugella T., Ip N.Y., Davis S., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen A., Barbieri G., Pellegrini S., Ihle J.N., Yancopoulos G.D. (1994). *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptors*. Science, **263**, 92-95.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Stahl N., Farrugella T.J., Boulton T.G., Zhong Z., Darnell J.E., Yancopoulos G. (1995). *Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors*. Science, **267**, 1349-53.
- Stahl N. & Yancopoulos G.D. (1993). *The alphas, betas and kinases of cytokine receptor complexes*. Cell, **74**(4), 587-90.
- Starr R., Willson T.A., Viney E.M., Murray L.J.L., Rayner J.R., Jenkins B.J., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J. (1997). *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature, **387**, 917-21.
- Stephanou A., Isenberg D.A., Akira A., Kishimoto R., Latchman D.S. (1998). *The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL-6) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signalling pathways co-operate to mediate the activation of the hsp90beta gene by interleukin-6 but have opposite effects on its inducibility by heat shock*. Biochem J, **330**, 189-95.
- Sternberg E.M. (1988). *Monokines, lymphokines and the brain*. In: The Year of Immunology, eds. J.M. Crose & R.E. Lewis, pp. 205-17, Karger, Basel.
- Steuer R.J. & Saunders J.B. (1959). *Ancient Egyptian and Cnidian Medicine*. University of California Press, pp. 1-17.
- Stitt J.T. (1985). *Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats*. J Physiol (Lond), **368**, 501-11.
- Stitt J.T. (1990). *Passage of immunomodulators across the blood-brain-barrier*. Yale J Biol Med, **63**, 121-31.
- Stitt P.J. (1992). Prostaglandins, the OVLT and fever. In: Neuroimmunology of fever, eds. T. Bartfai & D. Ottonson, pp. 155-65, Pergamon Press, Oxford.
- Stoyan T., Michaelis E., Schooltink H., Van Dam M., Rudolph R., Heinrich P.C., Rose-John S. (1993). *Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in Escherichia coli, renaturation and purification*. Eur J Biochem, **216**, 239-45.
- Strijbos P.J., Hardwick A.J., Relton J.K., Carey F., Rothwell N.J. (1992). *Inhibition of central actions of cytokines on fever and thermogenesis by lipocortin-1 involves CRF*. Am J Physiol, **263**, E632-6.
- Strömberg H., Svensson S.P., Hermanson O. (2000). *Distribution of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 in the rat central nervous system and dorsal root ganglia*. Brain Res, **853**, 199-207.
- Suzuki S., Tanaka K., Nogawa S., Dembo T., Kosakai A., Fukuuchi Y. (2001). *Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) after focal cerebral ischemia in rats*. Exp Neurol, **170**, 63-71.
- Taga T., Hibi M., Hirata Y., Yamasaki K., Yasukawa K., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T. (1989). *Interleukin-6 (IL-6) triggers the association of its receptor (IL-6R) with a possible signal transducer, gp130*. Cell, **58**, 1149-57.
- Taga T. & Kishimoto T. (1992). *Cytokine receptors and signal transduction*. FASEB J, **6**, 3387-96.
- Taga T. & Kishimoto T. (1997). *gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. Annu Rev Immunol, **15**, 797-819.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Takahashi Y., Smith P., Ferguson A., Pittman Q.J. (1997). *Circumventricular organs and fever*. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, **273**, R1690-5.
- Takeda K. & Akira S. (2000). *STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses*. Cytokine Growth Factor Rev, **11**, 199-207.
- Tanner J.E. & Tesato G. (1992). *Regulation of B-cell growth and immunoglobulin gene transcription by interleukin-6*. Blood, **79**, 452-9.
- Terstegen L., Gatsios P., Bode J.G., Schaper F., Heinrich P.C., Graeve L. (2000). *The Inhibition of Interleukin-6-dependent STAT Activation by Mitogen-activated Protein Kinases Depends on Tyrosine 759 in the Cytoplasmic Tail of Glycoprotein 130*. J Biol Chem, **275**, 18810-7.
- Thomas W.E. (1992). *Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions*. Brains Res Rev, **17**, 61-74.
- Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J. (1986). *Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant form rabbit serum*. J Exp Med, **164**, 777-93.
- Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J. (1989). *Identification of a lipid A binding site in the acute phase response reactant lipopolysaccharide binding protein*. J Biol Chem, **264**, 10867-71.
- Tobias P.S., Soldau K., Kline L., Lee J.S., Kato K., Martin T.P., Ulevitch R.J. (1993). *Crosslinking of lipopolysaccharide for CD14 on THP-1 cells mediated by lipopolysaccharide binding protein*. J Immunol, **150**, 3011-21.
- Turnbull A.V. & Rivier C.L. (1999). *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action*. Physiol Rev, **79**, 1-71.
- Ulevitch R.J. & Tobias P.S. (1994). *Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signalling*. Curr Opin Immunol, **6**, 125-30.
- 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**, 281-4.
- Vallières L., Lacroix S., Rivest S. (1997). *Influence of interleukin-6 on neural activity and transcription of the gene encoding corticotrophin-releasing factor in the rat brain: an effect depending on the route of administration*. Eur J Neurosci, **9**, 1461-72.
- Vallières L. & Rivest S. (1997). *Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1 β* . J Neurochem, **69**, 1668-83.
- Vallières L. & Rivest S. (1999). *Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neuronal activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia*. Endocrinology, **149**, 3890-903.
- Van Dam A.-M., Brouns M., Man-A-Hing W., Berkenbosch F. (1993). *Immunocytochemical detection of prostaglandin E2 in microvasculature and in neurons of rat brain after administration of bacterial endotoxin*. Brain Res, **613**, 331-6.
- Van Snick J. (1990). *Interleukin-6: an overview*. Annu Rev Immunol, **8**, 253-78.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Van Wagoner N.J. & Benveniste E.N. (1999). *Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes*. J Neuroimmunol, **100**, 124-39.
- 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**, 5236-44.
- Vaughn L.K., Bernheim H.A. & Kluger M.J. (1974). *Fever in the lizard dipsosaurus dorsalis*. Nature, **252**, 473-474.
- Velazquez L., Fellous M., Stark G.R., Pellegrini S. (1992). *A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway*. Cell, **70**, 313-22.
- Vilcék J. & Le J. (1994). *Immunology of cytokines: an introduction*. In: The cytokine handbook, ed. A.W. Thomson, pp. 1-20, Academic press, Limited London.
- von Staden H. (1989). *Herophilus: the Art of Ancient Medicine in Early Alexandria*. Edition, translation and essays. Cambridge University Press, Cambridge – New York – Melbourne.
- Watkins L.R., Maier S.F., Goehler L.E. (1995) *Cytokine to brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms*. Life Sci, **57**, 1011-26.
- Watling D., Guschin D., Muller M., Silvennoinen O., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Rogers N.C., Schindler C., Stark G.R., Ihle J.N. et al. (1993). *Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway*. Nature, **366**, 166-70.
- Wegenka U.M., Buschmann 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**, 276-88.
- Wegenka U.M., Lütticken C., Buschmann J., Yuan J., Lottspeich F., Müller-Esterl W., Schindler C., Roeb E., Heinrich P.C., Horn F. (1994). *The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transduction and activator of transcription (Stat) factor family*. Mol Cell Biol, **14**, 3186-96.
- Weinberg E.D. (1984). *Iron withholding: a defense against infection and neoplasia*. Physiol Rev, **64**, 65-102
- Weindl A. (1973). *Neuroendocrine aspects of circumventricular organs*. In: Frontiers in Neuroendocrinology, eds. W.F. Ganong & L. Martini, pp. 3-32, Oxford University Press, London.
- Weindl A. & Joynt R.I. (1971). *The median eminence as a circumventricular organ*. In: Brain-Endocrine Interaction: Median Eminence: Structure and Function, eds. K.M. Knigge, D.E. Scott, A. Weindl, pp.280-297, Karger, Basel.
- Welch W.H. (1888). *The Cartwright Lectures on the General Pathology of Fever*. Medical News, Philadelphia, **52**, 365-371, 393-405, 539-544, 565-568.
- Wesselingh S.L., Gough N.M., Finlay-Jones J.J., McDonald P.J. (1990). *Detection of cytokine mRNA in astrocyte cultures using the polymerase chain reaction*. Lymph Cyt Res, **9**, 177-85.
- Westphal O. & Luderitz O. (1954). *Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien*. Angew Chem, **66**, 407-17.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Wilks A.F., Harpur A., Kurban R.R., Ralph S.J., Zurcher G., Ziemiecki A. (1991). *Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of proteine kinase*. Mol Cell Biol, **11**(4), 2057-65.
- Williams K.C. & Hickey W.F. (1996). *Traffic of hematogenous cells through the central nervous system*. Curr Top Microbiol Immunol, **202**, 221-45.
- Wilson J.T. (1906). *On the anatomy of the calamus region in the human bulb, with an account of a hitherto undescribed "nucleus postremus"*. J Anat Physiol, **40**, 210-41; **40**, 357-86.
- Witthuhn B.A., Silvennoinen O., Miura O., Lai K.S., Cwik C., Liu E.T., Ihle J.N. (1994). *Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukin-2 and 4 in lymphoid and myeloid cells*. Nature, **370**, 153-7.
- Wolpe S.D., Sherry B., Juers D., Davatelis G., Yurt R.W., Cerami A. (1989). *Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2*. Proc Natl Acad Sci USA, **86**, 612-6.
- Work E. (1971). *Production, chemistry and properties of bacterial pyrogens and endotoxins*. In: Pyrogens and Fever, ed. G.E.W. Wolstenholme & J. Birch, pp. 23-47. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Wunderlich C.A. (1868). *Das Verhalten der Eigenwärme in Krankheiten*. Verlag Otto Wiegand, Leipzig.
- 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.
- Yamamoto K., Quell F.W., Thierfelder W.E., Kreider B.L., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Copeland N.G., Silvennoinen O., Ihle J.N. (1994). *Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation*. Mol Cell Biol, **14**, 4342-7.
- Yamamoto T., Sekine Y., Kashima K., Kubota A., Sato N., Aoki N., Matsuda T. (2002). *The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation*. Biochem Biophys Res Com, **297**, 811-7.
- Yamasaki K., Taga T., Hirata Y., Yawata H., Kawanishi Y., Seed B., Taniguchi T., Hirano T., Kishimoto T. (1988). *Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN β)₂ receptor*. Science, **241**, 825-8.
- Yan H.Q., Banos M.A., Herregodts P., Hooghe R., Hooghe-Peters E.L. (1992). *Expression of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury*. Eur J Immunol, **22**, 2963-71.
- Yasin S.A., Costa A., Forsling M.L., Grossman A. (1994). *Interleukin-1 beta and interleukin-6 stimulate neurohypophysial hormone release in vitro*. J Neuroendocrinol, **6**, 179-84.
- Yasukawa K., Hirano T., Watanabe Y., Muratani K., Matsuda T., Nakai S., Kishimoto T. (1987). *Structure and expression of human B-cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene*. EMBO J, **6**, 2939-45.
- Yasukawa H., Misawa H., Sakamoto H., Masuhara M., Sasaki A., Wakioka T., Ohtsuka S., Imaizumi T., Matsuda T., Ihle J.N., Yoshimura A. (1999). *The Jak-binding protein JAB inhibits Janus tyrosin kinase activity through binding in the activation loop*. EMBO J, **18**, 1309-20.
- Yost R.M., Jr. (1950). *Sydenham's philosophy of science*. Osiris, **9**, 84-104.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

Zähringer U., Lindner B., Rietschel E.T. (1994). *Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharide*. Adv Carbohydr Chem Biochem, **50**, 211-76.

Zeisberger E. & Merker G. (1992). *The role of the OVL1 in fever and antipyresis*. In: Progress in Brain Research, eds. A. Ermisch, R. Landgraf, H.J. Rühle, pp. 403-8, **Vol 91**, Elsevier, Amsterdam.

Zeisberger E. & Roth J. (1998). *Tolerance to pyrogens*. In: Molecular Mechanisms of Fever, eds. M.J. Kluger, T. Bartfai, C.A. Dinarello, pp. 116-131, **856**, Ann N. Y. Acad Sci.

Zeisberger E. (2000). *From humoral fever to neuroimmunological control of fever*. J Thermal Biol, **00** (Rev), 1-40.

Zhang J.G., Farley A., Nicholson S.E., Willson T.A., Zugaro L.M., Simpson R.J., Moritz R.L., Cary D., Richardson R., Hausmann G., Kile B.J., Kent S., Alexander W.S., Metcalf D., Hilton D.J., Nicola N.A., Baca M. (1999). *The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation*. Proc Natl Acad Sci USA, **96**, 2071-6.

Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E., Jr. (1994). *Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6*. Science, **264**, 95-8.

Zolnhöfer D., Graeve L., Rose-John S., Schooltink H., Dittrich E., Heinrich P.C. (1992). *The hepatic interleukin-6-receptor: down-regulation of the interleukin-6-binding subunit (gp80) by its ligand*. FEBS Lett, **306**, 219-22.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften veröffentlicht und auf Kongressen vorgestellt.

Originalarbeiten in Fachzeitschriften:

1. Hübschle T., Harré E.-M., Meyerhof W., Pehl U., Roth J. & Gerstberger R. (2001). *The Central Pyrogenic action of interleukin-6 is related to nuclear translocation of STAT3 in the anteroventral preoptic area of the rat brain*. Journal of Thermal Biology, 26, 299-305.
2. Harré E.-M., Roth J., Kueth M., Pehl U., Gerstberger R. & Hübschle T. (2002). *Molecular Biology of Thermoregulation: Role of IL-6 in LPS induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats*. Selected Contribution, Journal of Applied Physiology, 92, 2657-66.
3. 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 Research, in press.
4. Roth J., Harré E.-M., Rummel C., Gerstberger R. & Hübschle T. (2003). *Signalling the brain in systemic inflammation: Role of the sensory circumventricular organs*. Frontiers in Bioscience, in revision.

Veröffentlichte Abstrakts:

1. Hübschle T., Harré E.-M., Meyerhof W., Pehl U., Roth J. & Gerstberger R. (2001). *The central pyrogenic action of interleukin-6 is related to nuclear translocation of STAT3 in the anteroventral preoptic area of the rat*. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society, **32** [Suppl].

2. Harré E.-M., Hübschle T., Kueth M., Pehl U., Roth J. & Gerstberger R. (2002). *Systemic treatment with the pyrogens IL-6 and LPS induces nuclear STAT3 translocation predominantly in the rat brain vascular organ of the lamina terminalis*. European Journal of Physiology, Suppl (443), Pflügers Archiv, **443** [Suppl].

3. Harré E.-M., Roth J., Gerstberger R. & Hübschle T. (2003). *Cellular origin of nuclear STAT3 signals within the CVOs occurring during fever response after systemic LPS- or IL-6 application*. Pflügers Archiv, **445** [Suppl].

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei dem gesamten "Team Gerstberger" bedanken. Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich, daß er es mir ermöglicht hat, diese Doktorarbeit anzufertigen. Weiterhin danke ich meinem Betreuer Dr. Thomas Hübschle, der mir die Methode der Immunhistochemie sowie die Thematik der Fieberentstehung nähergebracht und durch seine exzellente Betreuung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ein großer Dank geht auch an Dr. Joachim Roth, der mir ebenfalls jederzeit mit "RAT" und Tat zur Seite stand (und mich manches Mal vor dem akuten Hungertod bewahrte). Mein ganz spezieller Dank gilt Herrn Matthias Küth, der mir den Einstieg am Max-Planck-Institut in Bad-Nauheim sehr erleichtert hat und jederzeit zur Stelle war, wenn – nicht gerade seltene – computerbedingte Schwierigkeiten auftraten. Ein großes Dankeschön geht auch an Daniela Hild und Sandra Nobel für die "kommunikativen" Arbeitspausen.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes der Veterinärphysiologie für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinem Freund Michael möchte ich für seine Unterstützung während dieser Zeit danken. An letzter Stelle erwähnt, aber dennoch um so wichtiger gebührt meine tiefe und innige Dankbarkeit meinen Eltern. Ihnen soll diese Arbeit gewidmet sein, weil sie den Grundstein dafür gelegt haben.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlicher 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.“